

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés

THESE DE DOCTORAT

**Isolement et criblage de souche bactérienne
productrice de protéase alcaline en vue d'une
application industrielle**

Par

BENKIAR Amina

Soutenue le 10/12/2016, Devant le jury composé de :

L. BENHADJA	Professeur, U. de Blida	Présidente
M. ABOUSAOUD	Professeur, U. de Médéa	Examineur
A. ZITOUNI	Professeur, ENS Kouba., Alger	Examineur
H. LARIBA	Maître de conférences (A), U. de Blida	Examinatrice
A. BOUANNANE	Maître de conférences(A), U.S.T.H.B., Alger	Examinatrice
B.JAOUADI	Maître de conférences (A), CBS. Tunisie	Invité
A. BADIS	Professeur, U. de Blida	Directeur de thèse

RESUME

Dans le cadre de la recherche de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases alcalines, une souche DZ100 a été isolée à partir des effluents d'abattoirs de la wilaya de Blida (Algérie) et identifiée moyennant les méthodes taxonomiques classiques couplées à la biologie moléculaire (séquençage du gène d'ARNr 16S). L'analyse de la séquence obtenue par alignement a permis de rattacher cette nouvelle souche DZ100 à l'espèce «*Bacillus circulans*» avec 99% de similarité. Cette dernière présente une activité protéolytique initiale de l'ordre de 4500 UI/ml. Par la suite, nous avons procédé à l'optimisation des conditions de croissance et de production des protéases. Après l'étape d'optimisation sur un milieu liquide à base de caséine et peptone de soja, nous avons triplé cette activité, soit 15000 UI/ml.

Dans une autre partie du travail, nous avons purifié à homogénéité la protéase SAPDZ en quatre étapes [traitement thermique (30 min à 80°C), précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40% à 70%), chromatographie sur une colonne de filtration sur gel (Bio-Sil SEC 125) suivie d'une chromatographie échangeuse de cations (Mono S)]. Cette technique de purification nous a permis d'aboutir à une solution enzymatique pure avec un facteur de purification de 61,22 fois et un rendement d'environ 25% et montre une activité spécifique de 75000 U/mg

Ainsi, par techniques d'électrophorèse (PAGE-SDS) et spectroscopie de masse (MADI-TOF/MS), nous avons montré que la SAPDZ est une enzyme monomérique qui présente une masse moléculaire de 32019,10 Da. Par ailleurs, l'analyse de la séquence N-terminal des 25 résidus d'acides aminés de la SAPDZ : **AQTVPYGMAQIKDPAVHGQGYKGAN** présente une grande homologie avec les subtilisines. L'étude de l'effet de certains inhibiteurs a montré que le PMSF et le DFP inhibent totalement l'activité enzymatique ce qui rattache cette enzyme à la famille des protéases à serine. Les optima de pH et température de la SAPDZ sont respectivement pH 12,5 et 85°C.

Du point de vue application biotechnologique, cette nouvelle protéase SAPDZ ayant des caractéristiques biochimiques particulières (alcalinité, thermostabilité élevée et une stabilité importante en présence de différents détergents solides et liquides) pourrait être utilisée avec succès dans des

applications industrielles notamment dans la valorisation des déchets de plumes, le traitement de cuirs et la synthèse des peptides et la détergence.

Mots-clés: Protéases; Kératinases; *Bacillus circulans*; Dégradation de la kératine.

ABSTRACT

As a part of the research of the new bacteria strain produced alkaline protease, a newly strain DZ100 was isolated from wastewater of the slaughterhouse of Blida (Algeria) and identified by standard taxonomic methods coupled with molecular biology based on sequencing the 16S rRNA gene. The analysis of the sequence obtained by alignment has linked this new strain DZ100 to the genus "*Bacillus circulans*" with 99 % of similarity. The last one has a proteolytic activity of the order of 4500 IU/ml. Thereafter, we proceeded to optimize the growth and production of the proteases. After the optimization step on a liquid medium containing casein and soy peptone, we tripled the activity to 15000IU/ml.

In another part of the work, we purified at homogeneity SAPDZ protease on four steps [thermal (30 min at 80°C), Fraction precipitation with ammonium sulfate (40 and 70%), Chromatography in column of filtration of gel (Bio-Sil SEC 125) ordered of an exchange chromatography of cations (Mono S)]. This technical we permitted to obtain a pure enzymatic solution with a factor of purification about 61.22-fold greater than with a rate almost 25% and reached a specific activity of 75000 U/mg.

Also, by electrophoresis techniques (SDS-PAGE) and mass spectroscopy (MADI-TOF/MS), we showed that SAPDZ was monomeric enzyme with has a molecular weight of 32019.10 Da. Moreover the analysis of the N- terminal sequence of 25 amino acids of SAPDZ: **AQTPYGM A QIKDPAVHGQGYKGAN** present a high homology with subtilisine. The study of the effect of some inhibitors showed that PMSF and DFP completely inhibit the enzyme activity which means it belong to the family of serine proteases. The optimum pH and temperature of SAPDZ are respectively pH 12.5 and 85°C.

The SAPDZ which has specific biochemical characteristics (alkalinity, high thermal stability and important stability in the presence of liquid and solid detergents) could be successfully used in biotechnological applications, especially in the recovery of waste feathers, leather treatment and peptide synthesis and detergency.

Keywords: Proteases; keratinases; *Bacillus circulans*; Degradation of keratin

ملخص

في اطار البحث عن سلالات بكتيرية جديدة منتجة لبروتينات قاعدية تم عزل سلالة (DZ100) من مياه صرف المذبح البلدي لولاية البليدة تم تحديدها بواسطة تقنيات تصنيفية كلاسيكية مقترنة بتقنيات البيولوجية الجزيئية (تسلسل الحمض النووي الريبوزي للمورثة ARN16S). حيث بين لنا تحليل التسلسل الجيني المتحصل عليه انتماء هذه السلالة الجديدة الي نوع «*Bacillus circulans*» بنسبة 99% . هذه الاخيرة نشاطها البروتوليزي يصل الي 4500 وحدة /مل. ثم قمنا بضبط الشروط المثلى لنمو و انتاج البروتياز. بعد مرحلة ضبط الشروط المثلى في وسط سائل اساسه الكزبن و مركز البيبتون وجدنا ان النشاط الإنزيمي تضاعف ثلاثة مرات حيث اصبح يعادل 15000 وحدة/مل.

في الجزء الموالي لهذا العمل قمنا بتقنية البروتياز عبر أربعة مراحل (العلاج الحراري (30 د في 80 درجة مئوية), الترسيب الجزئي بسلفات الامونيوم (40 الي 70 %), كروماتوجرافيا علي عمود الترشيح علي مادة هلامية (Bio-Sil SEC 125) تتبع بكروماتوجرافيا تبادلية للكاتيونات (MONO S). سمحت لنا تقنية التصفية هذه للتحصل علي محلول إنزيمي نقي بدرجة نقاوة مضاعفة ب 61.22 مرة و بمردود يناهز 25 % و يظهر نشاط خاص يعادل 75000 وحدة/مغ.

فمن خلال تقنيات الهجرة الكهربائية (PAGE-SDS) و التحليل الطيفي الشامل (MADI-TOF/MS) بينا أن الانزيم (SAPDZ) أحادي و له وزن جزيئي يقدر ب 32019.10 دالتون. ومن جهة اخري تحليل سلسلة الأحماض الأمينية (N-terminal) التي تحوي 25 حمض اميني لإنزيم (SAPDZ) و هي : **AQTVPYGMAQIKDPAVHGQGYKGA** بنسبة تماثل عالية مع بروتيازات اخرى من نوع السبتوليزين.

كما ان دراسة تأثير بعض المثبطات PMSF و DFP بينت انها تثبط كليا النشاط الانزيمي مما يجعل هذا الانزيم يصنف ضمن عائلة بروتياز سيرين. اما درجتا الحموضة والحرارة المثلتان لنشاط انزيم (SAPDZ) هما على التوالي 12.5 و 85 درجة مئوية.

من الناحية التطبيقية فان هذا الانزيم الجديد (SAPDZ) الذي أظهر خصائص بيوكيميائية خاصة (استقرار في pH قاعدي و درجات الحرارة العالية) يمكن أن يستخدم بنجاح في تطبيقات التكنولوجيا الحيوية وخاصة في اعادة تحويل الريش, علاج الجلود, انتاج البيبتيدات والمنظفات.

الكلمات المفتاحية : البروتياز؛ الكيراتيناز؛ «*Bacillus circulans*»؛ تحليل الكيراتين.

DEDICACES

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Je dédie cette thèse

A mon très cher père KHALED

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère FAZIA

Honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes très chère sœurs RABEA, NADJIBA, YASMINA et SARAH, leurs MARIS et leurs PETITS

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous.

Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon cœur

Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère.

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A mon très cher mari ANOUAR-KARIM

Quand je t'ai connu, j'ai trouvé l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin.

Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises.

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long parcours commun et serein, que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mon très cher ACIL

Mon cher petit, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi.

Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse.

Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A tous les membres de ma famille, petits et grands

Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.

REMERCIEMENTS

Les remerciements constituent traditionnellement les pages les plus lues des mémoires de thèse et permettent de s'exprimer en toute liberté. L'opportunité de remercier ses collègues est, de plus, rarement offerte en début de carrière. A l'heure où ma thèse va prendre fin par la remise définitive de ce manuscrit, je me plie donc à l'exercice difficile mais finalement très agréable de rappeler à ma mémoire et à celle de mes lecteurs l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce que ce travail soit achevé.

Ce travail a été réalisé en grande partie au sein du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie des Enzymes (LBMIE) au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), Sfax, TUNISIE, sous la direction scientifique de Monsieur le **Professeur Abdelmalek BADIS**, Professeur à l'Université Blida 1 et chercheur au Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) à Bou Ismaïl, Tipaza (Algérie). Ce travail entre dans le cadre du Projet de Recherche Conjoint bilatéral Algéro-Tunisien 2012-2016_Code : TA/04/2012_Acronyme : TNDZ-MicrooZymes JAOUADI/BADIS entre le LBMIE-CBS, le CNRDPA et l'Université de Blida 1. Intitulé du projet : « *Criblage, étude biochimique et moléculaire, amélioration et application industrielle et environnementale de protéases et peroxydases de microorganismes pour la détergence, la tannerie et le biotraitement des eaux de mer polluées* » sous la coordination scientifique du **Professeur BADIS Abdelmalek** (côté Algérien) et **Dr. Bassem JAOUADI** (côté Tunisien).

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Monsieur le **Professeur Abdelmalek BADIS**, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et m'avoir encadré avec efficacité. Je pense en particulier à sa grande exigence, dont mon travail a pu bénéficier. Je vous remercie sincèrement et de tout mon cœur, vous m'avez fait découvrir les méandres du monde de la recherche, ses plaisirs comme ses embûches. Merci pour votre patience inébranlable, votre aide sans limites et votre disponibilité sans relâches sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu voir le jour. Plusieurs années de travail fastidieux, laborieux, parfois douloureux nous ont permis ensemble de finaliser cette thèse et pendant lesquelles vous m'avez appris la rigueur scientifique, l'esprit de l'exactitude et de l'objectivité dans le travail de recherche. Vous m'avez soutenu jusqu'à la dernière minute, un soutien et une

attention que je n'oublierais jamais. Je vous exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance envers tout ce que vous avez fait pour finaliser ce travail.

Je remercie très sincèrement Madame **BENHADJA Lynda**, Professeur à l'université de Blida 1, de m'avoir honoré de présider mon jury de thèse.

Je remercie infiniment Madame **BOUANNANE DARENED Amel** Maître de Conférences à USDB, d'avoir accepté de juger ce présent travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Madame **LARIBI Hassiba**, Maître de Conférences à l'université de Blida 1, d'avoir accepté d'être membre examinateur dans le jury de la thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à Monsieur **ABOUSAUD Mahmoud**, Professeur à l'université de Médéa, et à Monsieur **ZITOUNI Abdelghani**, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, qui ont accepté d'être membres de ce jury.

Je tiens à remercier infiniment Monsieur le **Professeur Sami SAYADI**, Directeur Général du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS) & **Monsieur Abdallah CHOURA**, Secrétaire Général du CBS, pour leur accueil et leurs encouragements. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond respect et mon immense gratitude.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance au **Dr. Bassem JAOUADI**, Maître de Conférences au LBMIE-CBS, qui m'a soutenue et assisté pendant la réalisation de ce travail et avec lequel j'ai pu apprendre le vrai sens du professionnalisme, de l'assiduité et de la modestie du vrai scientifique, je le remercie de m'avoir honoré comme invité dans le jury.

Je remercie également Monsieur le **Professeur Samir BEJAR**, Directeur du LBMIE-CBS, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé pendant mes stages, pour son aide précieuse, ses conseils et ses encouragements.

Je remercie également Monsieur le Professeur **Mohamed EL HATTAB**, Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSN-BioM) à la Faculté des Sciences, Université de Blida 1, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé lorsque j'ai rejoint son laboratoire.

Un grand merci à Dr. **Nadia ZARAI JAOUADI**, Mme **Monia-MEZGHANI ABID**, Mme **Inés-KARRAY REBAI**, Dr. **Monia BLIBECH** & Mr. **Adel HADJBRAHIM**, qui par leur gentillesse, leur tendresse, leur compréhension et leur soutien continu ainsi que leurs encouragements pendant les moments difficiles.

Que vous trouvez ici l'expression de mon infinie reconnaissance et mon profond respect. Avec mes vœux de succès et de bonheur.

Mes vifs remerciements à tous mes collègues et amis du LBMIE-CBS pour les discussions scientifiques que nous avons eu, pour leur sympathie, leur encouragement, leur gentillesse ainsi que pour leur amitié qui n'a cessé de croître au fil du temps, qu'ils soient assurés que je n'oublierais pas ces années passées presque quotidiennement en leur compagnie. Je leur souhaite plein de succès dans leurs projets et je cite : **Mouna BEN ELHOUL, Maroua OMRANE BENMRAD, Sondes MECHRI, Emna MOUJEHED, Hatem REKIK, Sahar TRABELSI Fatma GHARBI, Mouna SAHNOUN, Rihab BEN AMAR, Houda HMANI & Lobna DAOUD.**

Je tiens à remercier aussi, Mme **Bouthaina MNEJJA-KCHAOU**, secrétaire du LBMIE-CBS, Mme **Sawssen BENJMAA-KCHAOU** Mlle **Nozha HARRABI & Mlle Fatma KERKENI** pour leur sympathie et leur bienveillance à nous besoins dans le laboratoire et au CBS.

J'adresse mes remerciements également à nos collaborateurs de la **Société Sahelienne du Cuir (SO.SA.CUIR)** à M'Saken/Sousse, tout particulièrement Monsieur **Mohamed Ezzedine MOUSSA**, Gérant de la société & Monsieur **Mohamed Salah BCHIR**, Ingénieur principale de la société, pour leur sérieux et leurs aides techniques pour la réalisation de quelques expériences, à l'échelle semi-industrielle, de l'enzyme SAPDZ en tannerie lors de traitement du cuir.

Ma reconnaissance à tout le personnel de CBS qui m'ont permis de réaliser mes travaux de recherche dans une ambiance amicale très agréable. Je resterais toujours marquée par le milieu de vie extraordinaire et la belle ambiance du Laboratoire.

Je n'oublie pas, surtout pas, mes amis très proches tout au long de ces années et qui m'ont apporté des sourires, des sérénités, des lucidités, des espoirs indélébiles.

Je ne terminerais pas mes remerciements sans avoir une pensée sympathique pour l'équipe de l'institut national spécialisé de la formation professionnel en Industrie Agroalimentaire-Abou Baker Belkayedde Blida, avec laquelle j'ai passé de très agréables moments.

Mes plus vifs remerciements sont également adressés à l'ensemble d'enseignants du Département De Génies Des Procédés de l'Université Yahia Fares de Médéa.

Je remercie également Monsieur le **Professeur Nadji MOULAI MOSTEPHA** pour son aide précieuse, les conseils qu'il m'a toujours offert. Qu'il trouve ici l'assurance de ma reconnaissance et mes remerciements les plus distingués.

TABLES DES MATIERES

Resume	
Dedicaces	
Remerciments	
Tables des matieres	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des annexes	
Abreviations et unites utilisees	
Introduction générale.....	24
Chapitre 1 : synthese bibliographique	
1.1. Introduction.....	28
1.2. Les enzymes protéolytiques.....	29
1.2.1. Classification des enzymes protéolytiques.....	30
1.2.2. Origine des protéases.....	45
1.3. Les subtilisines.....	48
1.3.1. Définition.....	48
1.3.2. Structure des subtilisines.....	48
1.3.3. Mécanisme d'action.....	59
1.3.4. Bases moléculaires de la thermostabilité.....	60
1.3.5. Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la subtilisine.....	61
1.4. Les keratinases.....	62
1.4.1. Physiologie de la production des kératinases.....	64
1.4.2. Propriété physico-chimiques des kératinases.....	64
1.4.3. Etude des relations structure-fonctions des kératinases.....	66
1.4.4. Les substrats kératiniques.....	67
1.5. Application biotechnologique.....	69
1.5.1. Détergence.....	70
1.5.2. Tannerie.....	74
1.5.3. Industrie agroalimentaire.....	78
1.5.4. Industrie pharmaceutique.....	79
1.5.5. Synthèse peptidique.....	79
1.5.6. Traitement de la soie.....	80

1.5.7. Traitement des films photographiques.....	80
1.5.8. Traitement des rejets industriels.....	81
1.5.9. Autres applications des protéases.....	81
1.6. Conclusion.....	82

Chapitre 2 : Materiel et methodes

2.1. Sites d'échantillonnages.....	83
2.2. Matériel.....	84
2.2.1. Matériel biologique.....	84
2.2.2. Produits chimiques et réactifs utilisés.....	85
2.3. Méthodes.....	92
2.3.1. Technique d'isolement et d'incubation.....	92
2.3.2. Choix des isolats.....	92
2.3.3. Purification et conservation des souches.....	93
2.3.4. Identification phénotypique de la souche sélectionnée.....	93
2.3.5. Cinétique de croissance.....	95
2.3.6. Dosage de l'activité enzymatique.....	95
2.3.7. Technique d'extraction et manipulation de l'ADN.....	99
2.3.8. Technique de purification des protéases.....	105
2.3.9. Méthodes analytiques.....	108
2.3.10. Expression et purification des protéases SAPDZ recombinants.....	110
2.3.11. Caractérisation physico-chimique des protéases.....	111
2.3.12. Applications biotechnologiques de la SAPDZ de la souche DZ100.....	113
2.3.13. Méthodes bioinformatique.....	116

Chapitre 3 : Resultats et discussion

3.1 : Isolement, criblage et identification de nouvelles souches productrices de proteases alcalines.....	118
3.1.1. Introduction.....	118
3.1.2. Isolement et criblage de souches bactériennes sécrétrices de protéases.....	119
3.1.3. Cinétique de croissance et de production des protéases sur milieu liquide.....	120
3.1.4. Propriétés physico-chimiques des préparations enzymatiques retenues.....	123
3.1.5. Identifications de la souche DZ100.....	129

3.1.6. Optimisation de la production de protéase de la souche <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	134
3.1.7. Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche de <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	137
3.1.8. Conclusion.....	138
3.2 : caractérisation biochimique et moléculaire de la protéase SAPDZ produite par la souche de <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	140
3.2.1. Introduction.....	140
3.2.2. Purification et caractérisation biochimique de protéase de la souche <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	140
3.2.3. Paramètres cinétiques de la SAPDZ.....	153
3.2.4. Caractérisation moléculaire de la SAPDZ.....	154
3.2.5. Conclusion.....	160
3.3 : Application biotechnologiques de la protease SAPDZ produite par la souche <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	162
3.3.1. Introduction.....	162
3.3.2. Application biotechnologiques de la protéase SAPDZ produite par la souche <i>bacillus circulans</i> DZ100.....	162
3.3.3. Conclusion.....	172
Conclusions et perspectives.....	173
References bibliographiques.....	178
Annexes.....	197
Liste des publications et des communications.....	206

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon Barrett.....	31
Figure 1.2 : Comparaison structurale entre la chymotrypsine (A) et la subtilisine (B).....	34
Figure 1.3 : Topologie spatiale du site actif et les résidus d'acides-amino impliqués dans le mécanisme catalytique chez la chymotrypsine (A) en comparaison à ceux chez la subtilisine (B).....	34
Figure 1.4 : Représentation schématique des deux étapes du mécanisme catalytique des protéases à sérine.....	36
Figure 1.5 : Etude structurale de la chymotrypsine.....	37
Figure 6.6 : Spécificité de coupure des protéases à sérine (chymotrypsine, trypsine et élastase).....	38
Figure 1.7 : Nomenclature de Schechter et Berger (1967) de la spécificité de coupure suite à l'interaction du complexe protéase-substrat. Le lien peptidique hydrolysé est en position P1-P1' et les sites d'interactions sur l'enzyme sont identifiés par S1 et S1'.....	39
Figure 1.8 : Structure en ruban de la papaïne code-pdb : 1hkp et de la représentation des sites de fixation du substrat.....	41
Figure 1.9 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à acide aspartique.....	42
Figure 1.10 : Classification des métallo-protéases à zinc sur la base de la nature des acides aminés qui forment le site de fixation du zinc.....	43
Figure 1.11 : Schéma illustrant les mécanismes d'actions des pro-peptides de type.....	51
Figure 1.12 : Structure aux R-X du complexe pro-peptide (domaine IMC)-subtilisine BPN'.....	57
Figure 1.13 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des subtilisines.....	60
Figure 1.14 : Représentation de la spécificité vis-à-vis du substrat de quelques kératinases.....	63

Figure 1.15 : A) Schéma représentant le mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, (B) Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.....	64
Figure 1.16 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l' α -kératine de la chevelure humaine.....	68
Figure 1.17 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la β -kératine et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine.....	69
Figure 1.18 : Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes.....	72
Figure 2.1 : Cartes de restriction des vecteurs de clonages pCR-Blunt et pCR 2.1.....	88
Figure 2.2 : Carte de restriction du vecteur de séquence pGEM-T Easy.....	88
Figure 2.3 : Cartes de restriction des vecteurs d'expression chez E. coli ; pUT57(A) et ptrc99A (B). Ces deux vecteurs possèdent un site de clonage multiple contenant les sites EcoRI et HindIII.....	89
Figure 3.1 : (A) Site d'échantillonnage de la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100. (B) Mise en évidence d'activité protéolytique produite par les souches bactériennes sur gélose nutritive au lait (test-semi qualitatif). (C) Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche bactérienne DZ100 sur gélose nutritive au lait.....	119
Figure 3.2: Cinétique de croissance et de production de protéase par sur milieu liquide.....	122
Figure 3.3 : Effet du pH sur la stabilité des 4 souches retenues (DZ007, DZ020, DZ055 et DZ100)	125
Figure 3.4 : Effet de la température sur la stabilité des 4 souches retenues.....	126
Figure 3.5 : Effet des ions métallique sur l'activité des souches retenues.....	128
Figure 3.6 : Aspect des cellules bactériennes de la souche DZ100 sous microscope optique G \times 100 (Photos originales).....	129
Figure 3.7 : Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche DZ100.....	131
Figure 3.8 : Catre de restriction du plasmide pDZ-16S (4535 pb).....	132

Figure 3.9 : Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (1520 pb) de la souche DZ100.....	132
Figure 3.10 : Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche DZ100.....	133
Figure 3.11 : Cinétique de production de protéases et de croissance bactérienne de la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	138
Figure 3.12 : Profil d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel de l'activité protéase (temps de rétention = 15 min), en utilisant le système HPLC.....	142
Figure 3.13: Profil de chromatographie sur Mono S - Sepharose de la purification de la protéase SAPDZ de la souche DZ100.....	143
Figure 3.14: Analyse par SDS/PAGE de SAPDZ produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	144
Figure 3.15 : Effet du pH sur l'activité de la SAPDZ produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	148
Figure 3.16: Effet du pH sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	148
Figure 3.17: Effet de la température sur l'activité de la SAPDZ produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	149
Figure 3.18: Effet de la température sur l'activité de la SAPDZ produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ10.....	150
Figure 3.19: Gels d'agarose (1%) présentant le produit de la PCR du gène <i>sapDZ</i> (A) et les produits de digestion du vecteur recombinant pABT1 (4760 pb) par EcoRI. MT : Marqueur de taille λ -HincII (4,58 ; 3,51 ; 3,27 ; 2,84 ; 2,19 ; 1,96 ; 1,79 ; 1,67 ; 1,61 ; 1,34 ; 1,26 ; 1,1 ; 0,86 ; 0,73 ; 0,56 kb).....	155
Figure 3.20: Carte de restriction du plasmide pABT1 (4680 pb) pour le clonage du gène <i>sapDZ</i>	155
Figure 3.21: Alignement de séquences de la SAPDZ avec diverses kératinases de <i>Bacillus</i>	157
Figure 3.22: Modèle structural de la protéase SAPDZ généré sur basé sur la structure 3D de la subtilisine E (code PDB: 1SCJ).....	159
Figure 3.23: Cartes de restriction des plasmides pABT1 et pABT2.....	160
Figure 3.24: Dégradation de différents substrats kératinolytiques par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	163

Figure 3.25: Effet d'épilage de la protéase SAPDZ dans le traitement des cuirs.....	166
Figure 3.26 : Hydrolyse de la farine des plumes par les SAPDZ, KERAB, KerA, SAPB-L311/T33S/N99Y et BPN'.....	167
Figure 3.27: Effet de différent détergent liquide sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche Bacillus circulans DZ10.....	169
Figure 3.28: Effet de différents détergents solides sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche Bacillus circulans DZ100.....	169
Figure 3.29: Performances des protéases SAPDZ et BPN' dans le détergent liquide commerciale iSiS à 7 mg/ml sur différentes taches de sang (en haut) et du chocolat (en bas). (a) traitement par l'eau de robinet ; (b) traitement par iSiS (7 mg/ml) ; (c) Traitement par BPN' (500 U/ml) + iSiS (7 mg/ml) ; (d) Traitement par SAPDZ (500 U/ml) + iSiS (7 mg/ml). I: tissus non traitées (contrôle) et II : tissus traités.....	171

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Clans et familles des peptidases à sérine.....	33
Tableau 1.2 : Diversité des microorganismes kératinolytiques et propriétés biochimiques de leurs kératinases.....	65
Tableau 1.3 : Opérations de tannage et produits chimiques utilisés.....	75
Tableau 2.1 : Plasmides générés (nommés pDZ).....	90
Tableau 2.2 : Les séquences des différents oligonucléotides utilisés.....	90
Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL (test semi-qualitatif) des 12 souches bactériennes nouvellement isolées...	120
Tableau 3.2 : Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu liquide initial des 12 souches bactériennes retenues parmi les 136 souches isolées. Les valeurs de la DO et du pH correspondent pour le temps de culture où nous avons observé la meilleure production.....	121
Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des activités relatives des préparations protéolytiques des 4 souches bactériennes retenues en fonction du pH.....	123
Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des activités relatives des préparations protéolytiques des 4 souches bactériennes retenues en fonction de la température.....	125
Tableau 3.5 : Résultats préliminaires des tests d'identification.....	130
Tableau 3.6 : Résultats de la galerie API 50 CH (fermentation de 49 carbohydrates) de la souche DZ100.....	130
Tableau 3.7 : Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases.....	134
Tableau 3.8 : Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	135
Tableau 3.9 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche de <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	136
Tableau 3.10: Optimisation de la concentration de peptone de soja sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases par la souche de <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	136
Tableau 3.11 : Bilan de purification de la protéase SAPDZ100 produite par la souche <i>Bacillus circulans</i> DZ100.....	143

Tableau 3.12 : Effet de différents inhibiteurs et des gents réducteurs sur la stabilité de la SAPDZ purifiée produite par la souche Bacillus circulans DZ100 (rapport molaire inhibiteur/protéase =100).....	146
Tableau 3.13 : Effet des ions métalliques sur l'activité d la SAPDZ purifiée produite par la souche Bacillus circulans DZ100.....	147
Tableau 3.14 : Spécificité de la protéase SAPDZ produite par la souche Bacillus circulans DZ10 vis-à-vis divers substrats.....	152
Tableau 3.15 : Les paramètres cinétique des enzymes SAPDZ, KERAB, KerA et SAPB-L31I/T33S/N99Y pour m'hydrolyse des substrats (protéines, esters et peptide synthétiques).....	153
Tableau 3.16: Différence en acides aminés entres les protéases alcalines produite par Bacillus circulans (SAPDZ), B. pumilus (SAPB), B. circulans (SAPP1) et B. pumilus (KERK12) moyennant un alignement de séquence protéique en utilisant le logiciel BioEdit.....	158
Tableau 3.17 : Comparaison de la surexpression du gène SAPDZ sous le contrôle de différents promoteurs.....	160
Tableau 3.18 : Effets des substrats à base de kératine sur l'activité kératinolitique de SAPDZ après 36 h d'incubation.....	164

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Les paramètres de l'étude physiologique

Annexe 2 : Principe d'utilisation de l'ARN 16S

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine (dosage de protéases).

Annexe 4 : Courbe d'étalonnage du BSA (quantité de protéines).

Annexe 5 : Détermination des extrémités NH₂-terminales par la méthode d'Edman automatisée (dégradation d'Edman).

Annexe 6 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

Annexe 7 : Localisation des amorces F-TBA, R-TBA, TBAe1, TBAe2, TBAi1 et TBAi2 dans le gène de la protéase alcaline (nommé *sapDZ*) de *Bacillus circulans* DZ100.

Annexe 8 : Carte de restriction du gène *sapDZ* par des enzymes coupant une seule fois (A), deux fois (B) et trois fois (C). Cette analyse est faite par le programme NEBcutter Version 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

ABREVIATIONS ET UNITES UTILISEES

A	Aa	: Acide aminé
	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
	ADN	: Acide désoxyribonucléique
	ADNp	: ADN plasmidique
	Arg (R)	: Argine
	ARN	: Acide ribonucléique
	ARNr	: ARN ribosomique
	AS	: Activité spécifique
	Asn (N)	: Asparagine
	Asp (D)	: Acide aspartique
	ATEE	: <i>N</i> -Acetyl-L-tyrosine ethyl ester monohydrate
B	BAEE	: <i>N</i> -benzol-L-arginine ethyl ester
	BAPNA	: α -benzoyl-L-tyrosine <i>p</i> -nitroanilide
	BET	: Bromure d'éthidium
	BSA	: Albumine sérum bovine ou «Bovine serum albumin»
	BTEE	: <i>N</i> -benzol-L-tyrosine ethyl ester
	β -ME	: Béta- mercaptoéthanol
C	CaCl ₂	: Chlorure de calcium
	Cys (C)	: Cystéine
D	Da	: Dalton (Da, kDa)
	DBO	: Demande biologique en oxygène
	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
E	EC	: «Enzyme commission»
	EDTA	: Acide éthylène-diamine-tétra-acétique
	EGTA	: Acide éthylène glycol-bis-(β -aminoethyl éther)-N,N-tétra-acétique
F	FIC	: Etat de repliement incomplète ou «Folding-incompetent State»
	FPLC	: «Fast Pressure Liquid Chromatography»
G	Gly (G)	: Glycine
	GNL	: Gélose nutritive au lait
H	HCl	: Acide chlorhydrique
	HEPES	: Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazineéthane sulfonique
	His (H)	: Histidine
	HPLC	: Chromatographie en phase liquide à haut performance
I	Ile (I)	: Isoleucine
	IMC	: Chaperonne intramoléculaire ou «Intramolecular chaperon»
	IPTG	: Isopropyl- α -D-thiogalactopyranoside
	IUBMB	: Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire
K	KERUS	: «Serine keratinase from <i>Brevibacillus brevis</i> US575»
	Kb	: Kilo base
	KCl	: Chlorure de potassium
L	Leu (L)	: Leucine
	Lys (K)	: Lysine
M	MES	: Acide 2-(N-morphino) éthane sulfonique
	Met (M)	: Méthionine
	MM	: Masse Moléculaire
	MT	: Marqueur de taille
N	NaCl	: Chlorure de sodium
	NaOH	: Hydroxyde de sodium
	NEM	: N-éthylmaléimide
	NK	: Nattokinase

P	PAGE	: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	
	pb	: Paire de base	
	PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne ou «Polymerase chain reaction»	
	PEG	: Polyéthylène glycol	
	Phe (F)	: Phénylalanine	
	PMSF	: Phénylméthylsulfonyl fluorure ou «Phenyl methyl sulfonyl fluoride»	
	<i>p</i> -NA	: <i>p</i> -nitroanilide	
	Pro (P)	: Proline	
	Q	qsp	: Quantité suffisante pour
		R	rpm
S	SAPDZ		: «Serine alkaline protease from <i>Bacillus circulans</i> DZ100»
	SAPB	: «Serine alkaline protease from <i>Bacillus pumilus</i> CBS»	
	SC	: Subtilisine Carlsberg	
	SDS	: «Sodium dodecyl sulfate»	
	Ser (S)	: Serine	
T	TCA	: Acide trichloroacétique	
	Thr (T)	: Thréonine	
	TLCK	: <i>Np-p</i> -tosyl L-lysine chloro-méthyl cétone	
	TPCK	: <i>Np</i> -tosyl L-phényl alanine chloro-méthyl cétone	
	Tris	: Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane	
	Trp (W)	: Tryptophane	
	Tyr (Y)	: Tyrosine	
	3D	: Tridimensionnelle	
U	U	: Unité enzymatique internationale	
	U.V.	: Ultra-violet	
X	X-gal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside	

INTRODUCTION GENERALE

Depuis des siècles, l'homme exploite les capacités des systèmes biologiques en vue d'améliorer son existence et le monde dans lequel il vit. Sans doute, les biotechnologies ont vu le jour il y a des milliers d'années, quand l'homme a commencé à sélectionner des traits spécifiques chez certains végétaux et à fabriquer des aliments à l'aide de microorganismes.

Les biotechnologies vivent depuis quelques dizaines d'années une grande révolution marquée par l'importance qu'elles occupent dans les programmes économiques des pays développés ou en voie de développement, ainsi que par la mise en application industrielle de plusieurs procédés qui n'étaient, peu de temps avant, que de la pure recherche au laboratoire. Les pionniers de la biotechnologie n'auraient jamais pu imaginer ce que peut se faire aujourd'hui : modifier le patrimoine génétique des plantes pour les rendre résistantes aux maladies, amener des animaux à produire certains médicaments qu'on extrait de leur lait ou encore fabriquer des particules minuscules capables de cibler les cellules cancéreuses et de les détruire. Pour autant, les biotechnologies représentent plus qu'un ensemble de manipulations génétiques : c'est aussi une trousse d'outils qui nous permettent de comprendre les systèmes biologiques et d'en tirer profit.

La biotechnologie industrielle est l'ensemble de technologies qui adaptent et modifient des organismes, des processus, des produits et des systèmes biologiques que l'on retrouve dans la nature afin de produire des marchandises et des services. En effet, elle a évolué au cours de ces dernières années et offre un ensemble d'outils puissants pour développer et optimiser l'efficacité des procédés biotechnologiques et les caractéristiques spécifiques des produits dérivés de la biotechnologie. Cette augmentation de l'efficacité et de la sélectivité offre des possibilités immenses pour une industrie durable et permettra un plus grand usage des ressources renouvelables sans dégradation de l'environnement et sans impact négatif sur la qualité de la vie.

Parmi les outils les plus utilisés en biotechnologie, les enzymes occupent une place majeure. Elles sont employées dans la recherche scientifique, en diagnostic médical et en industries : alimentaire, pharmaceutique, textile et autres. Tout domaine confondu, les enzymes, catalyseurs biologiques reconnues par

leurs qualités intéressantes (spécificité, compatibilité avec l'environnement, action dans des conditions modérées...), ont partiellement ou complètement remplacé les catalyseurs chimiques.

Les enzymes demeurent les outils clés de la biotechnologie. Ces biocatalyseurs sont des protéines extraites à partir de microorganismes, de végétaux et d'animaux. Elles peuvent être utilisées pour catalyser biologiquement des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité. Ainsi, par rapport aux procédés chimiques conventionnels, les procédés biocatalytiques consomment normalement moins d'énergie, produisent moins de perte et sont moins polluants puisqu'ils utilisent moins de solvants organiques. Leur propriété de "turnover", c'est-à-dire la capacité pour une même molécule enzymatique de catalyser un nombre considérable de fois la même réaction, a fait des enzymes comme un outil de choix dans le secteur des biotechnologies.

Le marché des enzymes est estimé à 8 milliards de dollars en 2015 selon <http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>. Ceci est dû à leur efficacité dans divers processus biotechnologiques et pharmacologiques, du fait qu'elles diminuent les coûts et améliorent la qualité des produits désirés (élimination des produits secondaires en plus de leur rôle environnemental). Par ailleurs, en imitant l'évolution naturelle et la sélection, les enzymes naturelles peuvent évoluer et être améliorées rapidement par modification génétique. En effet, elles peuvent être orientées pour catalyser des réactions chimiques spécifiques et optimiser la performance dans certaines conditions telles que les températures élevées ou l'acidité. De ce fait, l'ingénierie des protéines constitue un outil performant qui permet d'adapter ces entités biologiques aux besoins humains. Cette ingénierie se base sur les études des relations structure-fonctions des protéines moyennant les techniques de cristallisation, de mutagenèse dirigée et de modélisation moléculaire.

Les hydrolases sont les plus utilisées dans le secteur industriel. Parmi elles les protéases, enzymes qui catalysent la coupure des liaisons peptidiques des protéines et des peptides, sont les plus vendues dans le monde [1]. Les protéases sont utilisées en brasserie, en tannerie, en panification, en alimentation animale, en textile, en fromagerie, en industrie pharmaceutique, en médecine, en détergence,...

Les protéases sont largement répandues dans le monde animal et végétal, ainsi que chez les microorganismes. Cependant, l'incapacité des protéases d'origines animale et végétale à subvenir au besoin mondial de plus en plus croissant, a conduit à une augmentation de l'intérêt des enzymes microbiennes. Les microorganismes représentent une source excellente d'enzymes grâce à leur vaste diversité biochimique et leur susceptibilité aux manipulations génétiques [2], d'autant plus que les protéases microbiennes sont préférées aux protéases animales et végétales puisqu'elles possèdent à peu près toutes les caractéristiques pour les applications biotechnologiques [2]. Environ 70% de la production mondiale des protéases sont assurés par des microorganismes [3], notamment par les champignons du genre *Aspergillus*, mais surtout par les bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Lactococci*,... [1].

Les protéases détergentes et celles utilisées en tannerie forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques polluants et toxiques, traditionnellement utilisés dans l'industrie. Ces enzymes permettent de catalyser des réactions chimiques avec beaucoup d'efficacité et de spécificité dans des conditions plus douces et de développer des procédés très sélectifs et moins polluants. Ainsi, le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'isolement de nouvelles souches bactériennes, d'origine Algérienne, productrices de protéases alcalines. Il a pour objet l'extraction, la purification et la caractérisation biochimique et moléculaire d'une nouvelle protéase alcaline ayant une puissante activité kératinolytique d'une part, et d'autre part sa mise en œuvre dans le domaine de biotechnologie industrielle.

A cet effet, la démarche adoptée pour cette recherche est la suivante :

✚ Une première partie consiste à isoler, cribler, purifier et identifier la souche bactérienne DZ100;

✚ La seconde partie est consacré à extraire, purifier et caractériser, au niveau biochimique et moléculaire, la protéase (nommée SAPDZ) sécrétée par la souche DZ100;

✚ La troisième partie est réservée à la mise en évidence des propriétés

et performances de l'enzyme dans différentes applications industrielles biotechnologiques en l'occurrence la tannerie et la détergence.

Chapitre 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction

Depuis plusieurs années, l'intérêt pour les enzymes en industrie a considérablement augmenté proportionnellement au nombre croissant d'applications qu'elles ont démontré. Au niveau mondial, le marché des enzymes est réparti en plusieurs secteurs d'activité telle l'alimentation humaine et animale, les pâtes de papier, ainsi que les textiles et détergents. La plus grosse part du marché va au domaine dit technique c'est-à-dire aux pâtes de papier, aux textiles, aux cuirs et aux détergents.

Les enzymes sont une clé pour la compréhension de la vie, car agissant en séquences organisées, elles catalysent certaines étapes réactionnelles des voies métaboliques qui permettent aux molécules nutritives d'être dégradées ; à l'énergie d'être conservée et transformée ; aux macromolécules biologiques d'être synthétisées à partir de précurseurs simples. Ce sont des outils clés de la biotechnologie et des bio-industries qui catalysent dans le génie microbiologique les réactions mises en jeu et assurent leur régulation.

Aujourd'hui, les protéases représentent le groupe d'enzymes le plus commercialisé et le plus utilisé en biotechnologie industrielle grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques. En effet, ce groupe des hydrolases couvre 65% du marché total des enzymes [4, 5] et représente 67% des ventes mondiales d'enzymes détergentes pour lessives et 50% d'enzymes pour lave-vaisselle automatique [1]. Actuellement, 89% des poudres lessiviellles en Europe et en Amérique du Sud contiennent au moins une enzyme. Toutefois, la part de ces protéases dans le marché mondial est essentiellement dominée par les protéases alcalines microbiennes, avec près de 40% de ce marché [3, 6, 7]. En valeur marchande, le secteur de la détergence est celui qui consomme le plus d'enzymes, avec environ 45% du marché mondial d'enzyme. Ce dernier est dominé par de grandes sociétés multinationales telles que Novozymes A/S-Danmark (40%), Gist-Bricades-Hollande (20%), Genencor International-USA (10%) et Miles Laboratories-USA (10%). Par ailleurs, les protéases utilisées en tannerie sont d'immense importance. En effet, le traitement

enzymatique en tannerie, plus précisément dans l'étape de confitage, a été préféré aux méthodes conventionnelles qui requièrent l'utilisation de grandes quantités de produits chimiques polluants. Cette approche enzymatique présente de nombreux 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 [3]. Par ailleurs l'utilisation de ces protéases peut être étendue vers l'opération d'épilage enzymatique en tannerie.

1.2. Les enzymes protéolytiques

Les protéases figurent parmi les enzymes hydrolytiques les plus importantes et les plus largement étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Ces enzymes catalysent des réactions d'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines et des peptides [8]. Les enzymes protéolytiques ou protéases peuvent être rencontrées chez tous les organismes vivants, elles occupent une place privilégiée sur le plan physiologique et commercial [9]. Elles sont largement répandues dans les trois règnes : végétal, animal et microbien.

Les enzymes protéolytiques sont ubiquitaires, présentes dans tous les organismes vivants et elles interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques complexes. En fait, ces enzymes participent à un grand nombre de processus biologiques dont le clivage de pro-hormones permettant leur activation, la coagulation sanguine et la fibrinolyse [10, 11], l'assemblage de structures macromoléculaires comme les fibres de collagène, la fertilisation, le "turnover" des protéines cellulaires, le contrôle de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines [3, 12].

Les protéases ne sont pas seulement une nécessité physiologique, elles peuvent également devenir un problème si elles ne sont pas contrôlées, pouvant ainsi détruire les composants protéiques des cellules et des tissus.

D'une manière générale, 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 [13].

Malgré leur grande diversité, les protéases peuvent être dotées d'une très grande spécificité d'action. Cette caractéristique a rendu leurs exploitations et leurs applications physiologiques et biotechnologiques intéressantes [8].

1.2.1. Classification des enzymes protéolytiques

Les recommandations pour la nomenclature des enzymes ont été regroupées dans une liste EC (« Enzyme Commission »), publiée la première fois en 1954 puis en 1992 par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, IUBMB, (NC-IUBMB, 1992). Selon le comité de nomenclature de l'IUBMB, les protéases appartiennent au sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) d'où l'adoption de la nomenclature EC 3.4. D'une manière générale, les protéases sont classées selon plusieurs critères majeurs tout en se basant sur ; leur mode d'action, la nature du résidu nucléophile de leur site actif, leur structure tridimensionnelle et leur origine évolutive.

Selon leur mode d'action, les protéases sont divisées en deux groupes majeurs : les protéases intracellulaires et extracellulaires.

- Les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules.
- Les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques comme la sporulation, la différenciation, la maturation d'hormones et d'enzymes [1] .

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action : les endopeptidase et les exopeptidases (figure 1.1). Les deux types sont divisés en plusieurs classes et sous classes.

1.2.1.1. Les exopeptidases

Les exopeptidase sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques des chaînes protéiques à partir soit de l'extrémité N-terminale (aminopeptidase), soit de l'extrémité C-terminale (carboxypeptidase) [8]. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie.

1.2.1.1.1. Aminopeptidase

Ce sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide. Beaucoup d'aminopeptidase sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases [8].

1.2.1.1.2. Carboxypeptidases

Ce sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous-classes, soit les sérines carboxypeptidases, les métallo-carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique [8].

1.2.1.2. Les endopeptidases

La plus part des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N-terminales et C-terminales. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répressur sur l'activité de ces protéases.

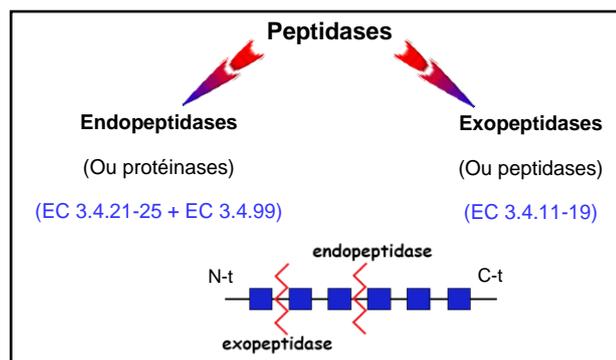


Figure 1.1 : Schéma représentant la nomenclature des peptidases selon Barrett [14].

Certains auteurs ont proposé de regrouper les peptidases qui sont similaires à la fois dans leur structure 3D et dans leur origine d'un point de vue évolutif [15, 16]. Ce nouveau système de classification des peptidases est à la base de la banque de données MEROPS qui est disponible sur internet depuis 1996 (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>) et est à la base également du livre des enzymes protéolytiques édité en 1998 [17].

D'après ces auteurs, les peptidases sont classées en familles en fonction de l'homologie de séquences et de structure en acides aminés et les familles sont regroupées en clans dans la mesure où il existe l'évidence qu'elles partagent une origine ancestrale commune.

En se basant sur leur mécanisme catalytique, les endopeptidases sont subdivisées en cinq sous-sous-classes distinctes: les endopeptidases à sérine, les endopeptidases à cystéine, les endopeptidases à acide aspartique, les endopeptidases à métal et les endopeptidases à thréonine [1, 18].

1.2.1.2.1. Protéases à sérine

Les protéases à serine sont très répandues dans la nature et forment une famille d'enzymes apparentées entre elles ainsi qu'avec certaines estérases. Les peptidases à sérine possèdent un mécanisme catalytique qui dépend du groupement hydroxyle d'un résidu sérine. Ce dernier agit comme un nucléophile qui attaque alors une liaison peptidique. Les peptidases à sérine étaient classées en deux super-familles, chymotrypsine et subtilisine [14, 19].

La structure tridimensionnelle de plusieurs protéases à serine et de leur zymogène est connue par résolution atomique, parmi les premiers qui ont été résolues, citons celle de α -chymotrypsine et de la trypsine. Depuis, d'autres structures de protéases ont été déterminées et la liste s'allonge régulièrement.

Toutes ces protéases possèdent les mêmes groupes catalytiques. Par conséquent, elles sont regroupées en 36 familles en fonction des comparaisons de séquences en acides aminés.

Ces familles ont elles mêmes été regroupées en 12 clans. En plus de ces 12 clans, il existe un clan supplémentaire où sont regroupées 7 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan particulier (tableau 1.1). Ces peptidases ont une faible masse moléculaire (MM) entre 18 et 35 kDa à

l'exception de la protéase de *B. subtilis* qui fait 90 kDa [20] et ont un optimum de pH de 7,0 à 12,0 [21]. Elles sont d'un grand intérêt de point de vue activité et stabilité à des pH basiques. Ces protéases sont caractérisées par la présence de la triade aspartate, sérine et histidine au niveau du site actif [14, 19].

Tableau 1.1 : Clans et familles des peptidases à sérine. Ces informations proviennent de la base de données MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk/>).

Clans	Familles	Exemples de peptidases
<u>SB</u>	<u>S8</u>	subtilisine Carlsberg (<i>Bacillus licheniformis</i>)
	<u>S53</u>	sedolisine (<i>Pseudomonas sp.</i> 101)
<u>SC</u>	<u>S9</u>	oligopeptidase prolyl (<i>Sus scrofa</i>)
	<u>S10</u>	carboxypeptidase Y (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	<u>S15</u>	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase (<i>Lactococcus lactis</i>)
	<u>S28</u>	carboxypeptidase lysosomal Pro-Xaa (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>S33</u>	aminopeptidase prolyl (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)
	<u>S37</u>	peptidase PS-10 (<i>Streptomyces lividans</i>)
<u>SE</u>	<u>S11</u>	carboxypeptidase A D-Ala-D-Ala (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
	<u>S12</u>	carboxypeptidase B D-Ala-D-Ala (<i>Streptomyces lividans</i>)
	<u>S13</u>	peptidase C D-Ala-D-Ala (<i>Escherichia coli</i>)
<u>SF</u>	<u>S24</u>	répresseur LexA (<i>Escherichia coli</i>)
	<u>S26</u>	signal peptidase I (<i>Escherichia coli</i>)
<u>SH</u>	<u>S21</u>	assembleine de cytomegalovirus (human herpesvirus 5)
	<u>S73</u>	peptidase gpO (<i>Enterobacteria phage P2</i>)
	<u>S77</u>	peptidase gp21 procapside (<i>Enterobacteria phage T4</i>)
	<u>S78</u>	peptidase procapside (<i>Enterobacteria phage HK97</i>)
	<u>S80</u>	peptidase gp175 procapside (<i>Pseudomonas phage phiKZ</i>)
<u>SJ</u>	<u>S16</u>	peptidase Lon-A (<i>Escherichia coli</i>)
	<u>S50</u>	protéase Vp4 de birnavirus de nécrose infectieuse pancréatique
	<u>S69</u>	peptidase Tellina virus 1 VP4 (Tellina virus 1)
<u>SK</u>	<u>S14</u>	peptidase Clp (<i>Escherichia coli</i>)
	<u>S41</u>	peptidase-C-terminal de développement 1 (<i>Escherichia coli</i>)
	<u>S49</u>	signal peptide peptidase A (<i>Escherichia coli</i>)
<u>SO</u>	<u>S74</u>	phage K1F (<i>Escherichia coli</i>) endosialidase protéines autoclivable CIMCD (<i>Enterobacteria phage K1F</i>)
<u>SP</u>	<u>S59</u>	nucleoporine 145 (<i>Homo sapiens</i>)
<u>SR</u>	<u>S60</u>	lactoferrine (<i>Homo sapiens</i>)
<u>SS</u>	<u>S66</u>	LD-carboxypeptidase mureine tetrapeptidase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
<u>ST</u>	<u>S54</u>	rhomboid-1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)
<u>SX</u>	<u>S48</u>	peptidase HetR (<i>Anabaena variabilis</i>)
	<u>S62</u>	peptidase influenza A PA (influenza A virus)
	<u>S68</u>	PIDD Unité 1 de protéine auto- développement (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>S71</u>	MUC1 mucine d'auto-cleavage (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>S72</u>	dystroglycane (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>S79</u>	CARD8 protéine d'auto-cleavage (<i>Homo sapiens</i>)
	<u>S81</u>	destabilase (<i>Hirudo medicinalis</i>)

Elles montrent une large spécificité vis-à-vis du substrat et sont inhibées d'une manière irréversible par le phényl-méthyl-sulfonyl-fluorure (PMSF), le

diisopropylfluorophosphate (DEP), le 3,4-dichloroisocoumarine (3,4-DCI) et le tosyl-L-lysine-chlorométhyl-cétone (TLCK). Parmi ces protéases, quelques unes sont en plus inhibées par les réactifs à thiol tel que le p-chloromercuribenzoate (pCMB), du fait de la présence d'une cystéine à proximité du site actif provoque un encombrement stérique suite à une interaction covalente entre le groupement thiol et le réactif [4].

Les protéases appartenant à la famille S1 (chymotrypsine, figure 1.2.A) sont rencontrées chez les microorganismes procaryotes et eucaryotes, les plantes et les animaux vertébrés tandis que celles appartenant à la famille S8 (subtilisine, figure 1.2.B) sont uniquement rencontrées chez les bactéries.

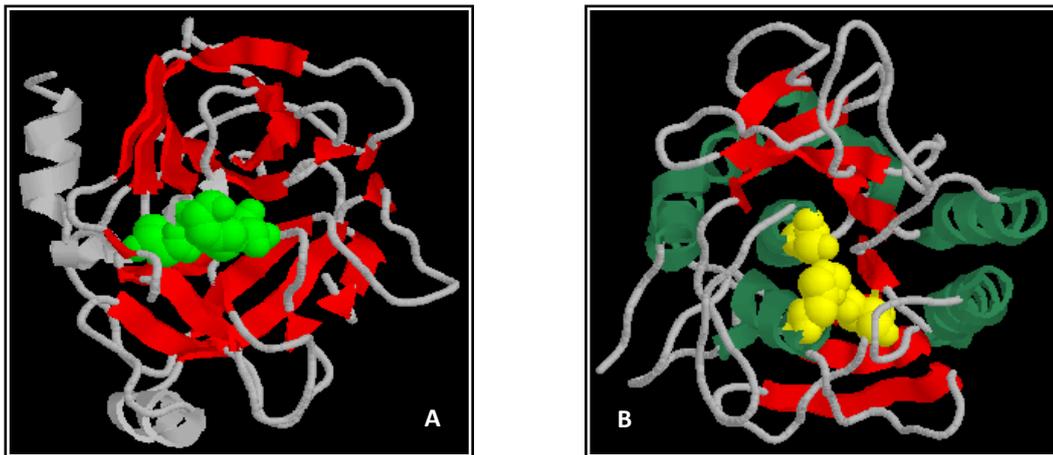


Figure 1.2 : Comparaison structurale entre la chymotrypsine (A) et la subtilisine (B) [22].

Les résidus d'His57, d'Asp102 et de Ser195 forment la triade catalytique de la chymotrypsine. Tandis que, les résidus d'Asp32, d'His63 et de Ser220 ou d'Asp32, d'His64 et de Ser221 forment la triade catalytique pour, respectivement, la subtilisine Carlsberg [23] et la subtilisine Novo [24].

Toutefois, certains auteurs ont montré qu'il existe des différences importantes entre les peptidases à sérine, notamment concernant les résidus d'acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique [25]. Ce dernier implique de manière générale, en plus du résidu de sérine qui porte le nucléophile, un donneur de proton (base). Chez les clans PA(S), SB, SC et SH, le donneur de proton est un résidu d'histidine et il existe une triade catalytique puisqu'un troisième résidu est nécessaire, probablement en raison de l'orientation de l'anneau imidazole de l'histidine. Il s'agit le plus souvent d'un acide aspartique

mais il peut s'agir aussi d'un autre résidu d'histidine, comme c'est le cas pour le clan SH. Chez les clans SE et SF, c'est un résidu de lysine qui possède le rôle de donneur de proton, et dans ce cas, un troisième résidu catalytique n'est pas nécessaire. Chez le clan SF, certaines peptidases ont une diade catalytique Ser/His [17].

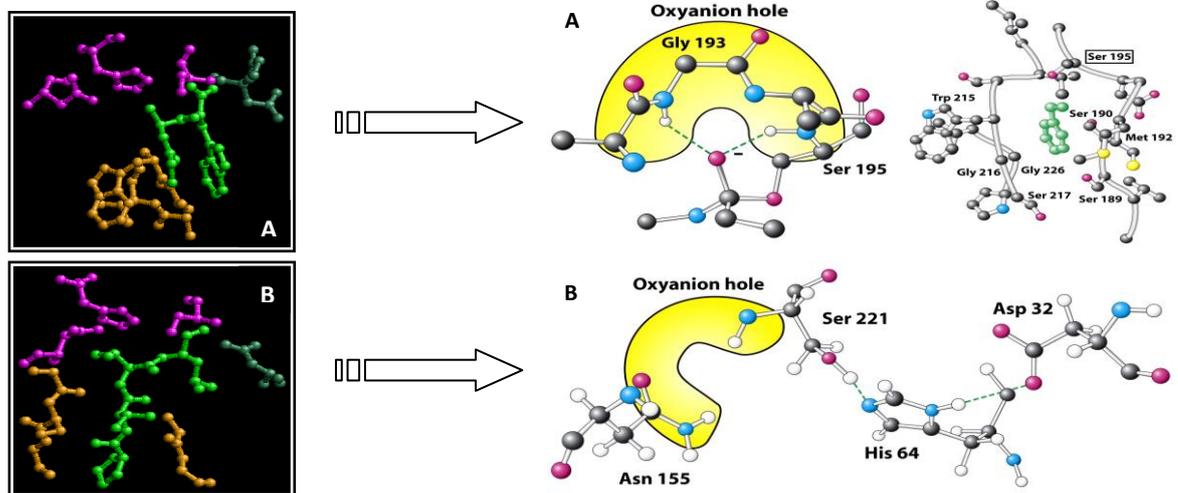


Figure 1.3 : Topologie spatiale du site actif et les résidus d'acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique chez la chymotrypsine (A) en comparaison à ceux chez la subtilisine (B) [22].

Quant à la catalyse proprement parlée, les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure (figure 1.4), basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine sous forme alcoolate. Pour atteindre cet état, une histidine et un aspartate, formant une triade avec la sérine, doivent être positionnés pour que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée. Le mécanisme se déroule en deux temps (mécanisme de type ping-pong) [1] :

1. Dans la première étape, la coupure est effective, le peptide C-terminal est relargué dans le milieu, le peptide N-terminal acyle la sérine (enzyme modifiée). On assiste donc à la formation d'un intermédiaire qui est une enzyme "acyl" entre le substrat et le résidu de sérine. La formation de cet intermédiaire covalent se maintient à l'aide d'un état de transition intermédiaire tétraédrique chargé négativement jusqu'au clivage de la liaison peptidique.

2. Dans la seconde étape, l'eau (second nucléophile) coupe la liaison acyle, ce qui permet de libérer le second peptide, régénérant la forme initiale de l'enzyme. Pendant cette étape l'intermédiaire enzyme "acyl" est hydrolysé par une

molécule d'eau pour éliminer le peptide et restaurer le groupement hydroxyle du résidu de sérine de l'enzyme. La désacylation, qui implique également la formation d'un état de transition intermédiaire tétraédrique, se déroule suivant la réaction inverse à l'acylation. Dans ce cas, c'est la molécule d'eau qui est le nucléophile et non le résidu de sérine.

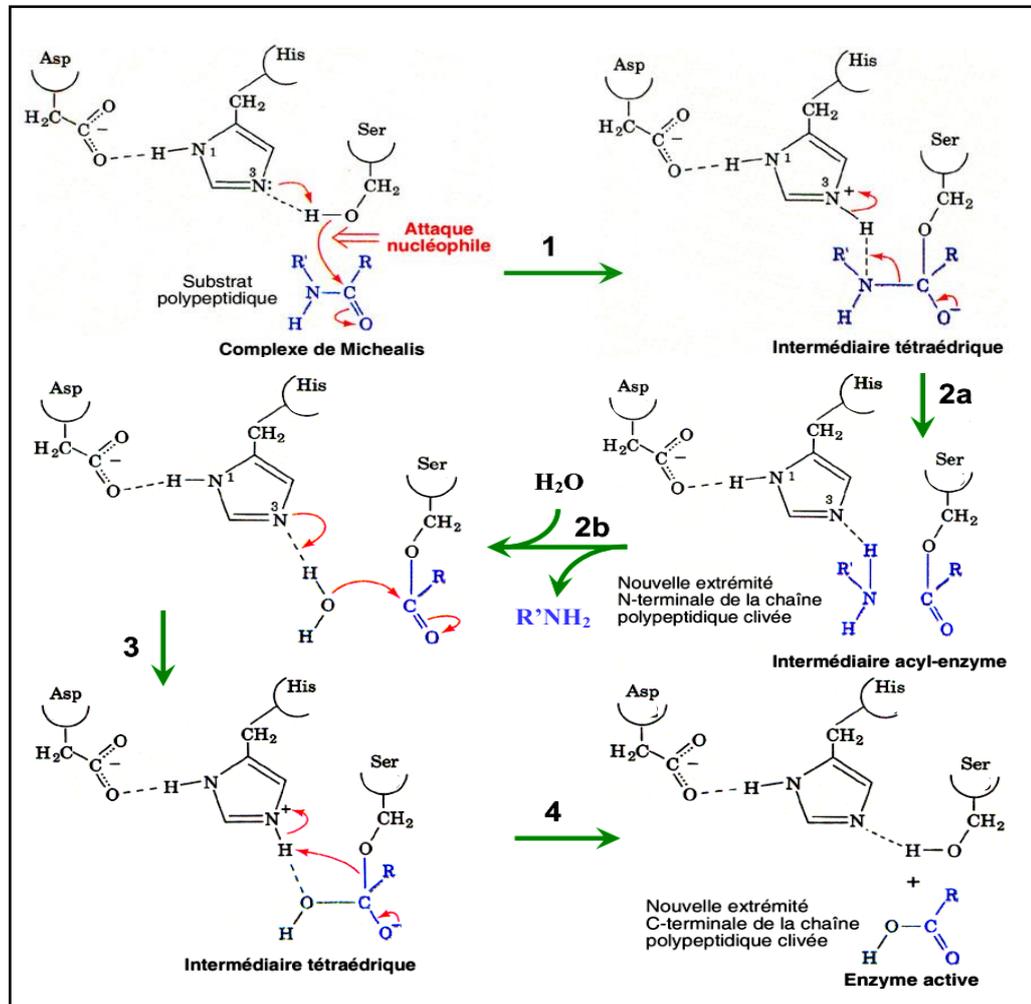


Figure 1.4 : Représentation schématique des deux étapes du mécanisme catalytique des protéases à sérine [26].

Parmi les protéases qui fonctionnent selon ce mécanisme, on trouve la chymotrypsine (résidus hydrophobes), la trypsine (résidus basiques), l'élastase (résidus peu encombrant) et la subtilisine (résidus hydrophobes pas trop gros), ainsi que la thrombine, la plasmine, la kallikréine et l'acrosine. Les 3 premières font partie de la même super-famille de chymotrypsine (analogie assez forte de séquences partageant la même poche de spécificité).

Étant donné que les études biochimiques, moléculaires et structurales ont été plus avancées chez la chymotrypsine que chez la subtilisine ; nous allons détailler le mécanisme catalytique de ce type d'enzyme en relation avec sa fonction. La structure de la chymotrypsine bovine est constituée de deux domaines (1 et 2), chacun étant constitué essentiellement d'un tonneau β , formé de 6 brins β antiparallèles. Il y a une certaine similarité de séquences entre les deux domaines, si bien que l'on suppose qu'ils découlent d'un gène unique ancestral, dupliqué ensuite, et qui a fait l'objet de mutations indépendantes. Les éléments de la triade sont fixés sur les deux domaines, qui participent ainsi tous les deux au même acte catalytique : D et H sont sur le domaine 1, tandis que S est sur le domaine 2 (figure 1.5).

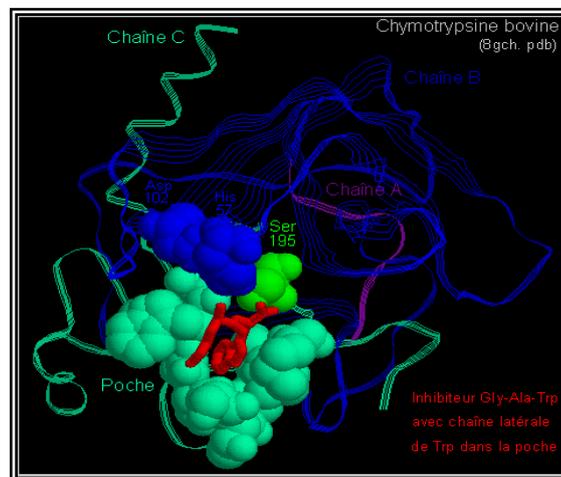


Figure 1.5 : Etude structurale de la chymotrypsine.

Les éléments structuraux qui expliquent la catalyse, ayant une structure tridimensionnelle détaillée sur la figure 1.6, sont les suivants :

1. La triade catalytique qui polarise la liaison OH de la sérine, qui devient alors très acide, capable de protoner l'histidine, l'ion alcoolate attaquant alors le C du carbonyle de la liaison peptidique qui sera coupée ultérieurement. Les 3 acides aminés de cette triade sont localisés dans les deux domaines de la chymotrypsine (fonction complémentaire des domaines et non différente).

2. La poche capable de stabiliser l'intermédiaire réactionnel tétrahédrique est un oxyanion instable (ici sur l'exemple de l'élastase, elle forme un complexe covalent avec un inhibiteur particulier).

3. La poche capable d'interagir avec la chaîne latérale (sur cet exemple un acide aminé hydrophobe (tryptophane) interagit avec la chaîne latérale de la chymotrypsine).

4. Enfin des liaisons hydrogènes non spécifiques participent à la stabilisation du complexe enzyme-peptide.

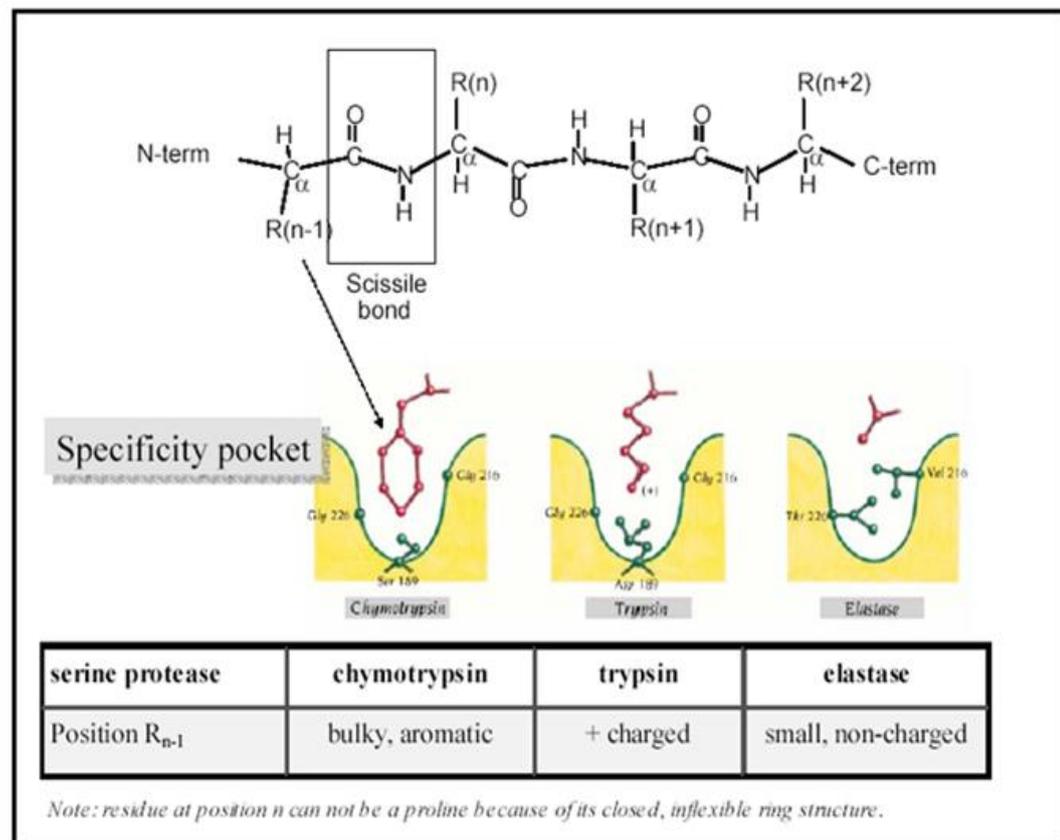


Figure 1.6 : Spécificité de coupe des protéases à sérine (chymotrypsine, trypsine et élastase) [27].

La spécificité de la coupe est apportée par les acides aminés autour de la liaison peptidique coupée (P_1 - P_1') dans la nomenclature: P_4 - P_3 - P_2 - P_1 - P_1' - P_2' - P_3' - P_4' (figure 1.7). Pour mieux visualiser la spécificité des protéases, Schechter et Berger ont proposé une nomenclature. Selon cette nomenclature, le lien peptidique hydrolysé se situe entre les résidus P_1 et P_1' sur la protéine, alors que les sites d'interaction sur l'enzyme sont représentés par S_1 et S_1' [26].

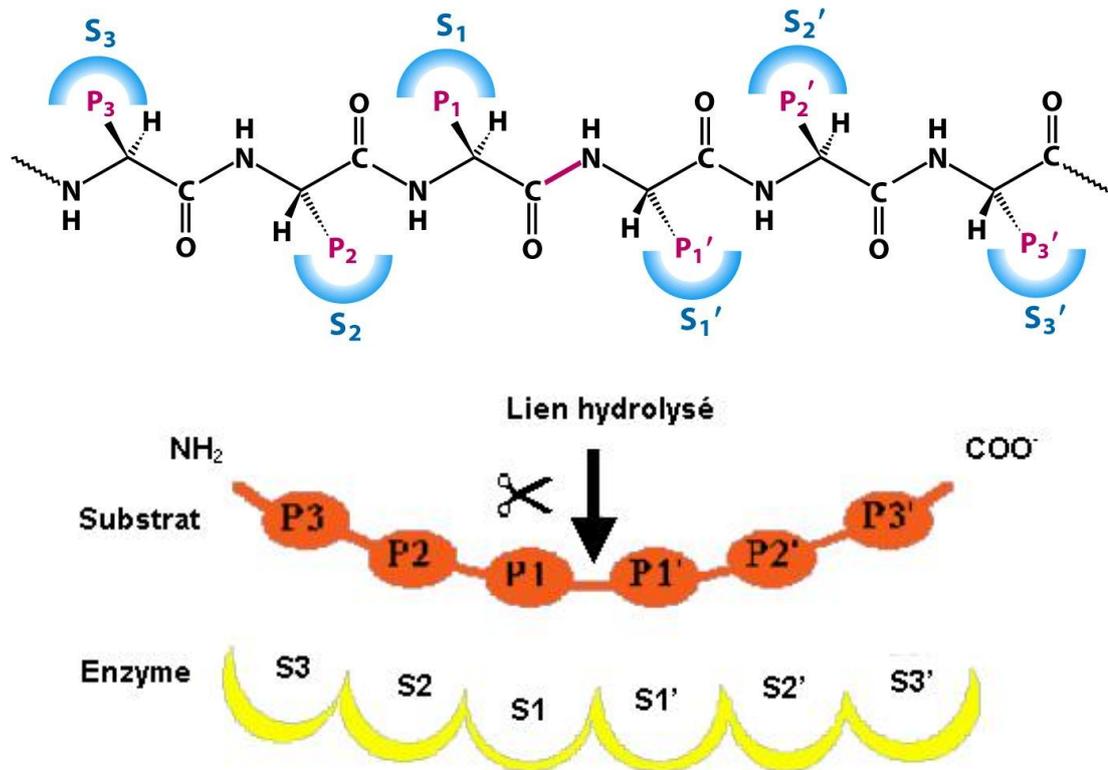


Figure 1.7 : Nomenclature de Schechter et Berger de la spécificité de coupure suite à l'interaction du complexe protéase-substrat. Le lien peptidique hydrolysé est en position P₁-P₁' et les sites d'interactions sur l'enzyme sont identifiés par S₁ et S₁' [26].

Dans le cas de la chymotrypsine, trypsine et élastase (code-pdb : 1EAT), l'interaction de la chaîne latérale du dernier résidu avec la poche qui l'accueille détermine à lui seul la spécificité de l'interaction. Dans les autres protéases, les acides aminés situés plus loin autour du site de coupure jouent également un rôle important dans l'accomplissement de l'acte catalytique. Pour les 3 premières enzymes, il suffit donc de changer la structure de cette poche pour modifier la spécificité. C'est ce qui apparaît sur la figure 1.6, qui montre que :

- Si la poche contient un résidu négatif, elle choisira une chaîne basique (trypsine).
- Si la poche contient deux résidus encombrants, elle choisira une chaîne très petite (élastase).

Les protéases à sérine ont toutes ces caractéristiques sans pour autant posséder la même structure tertiaire. Le cas de la subtilisine est très distingué par rapport aux trois protéases précédentes du fait que sa structure tertiaire qui de

type α/β avec une topologie de la triade catalytique aussi différente. Néanmoins, le mécanisme d'action est sensiblement le même avec les trois zones importantes : la poche spécifique, la participation non spécifique de la chaîne en amont et le site de fixation de l'oxyanion intermédiaire. Le substrat est une petite protéine qui inhibe la subtilisine.

Il n'y a probablement aucun lien phylogénique entre ces endopeptidases à sérine (chymotrypsine et subtilisine), compte-tenu de la faible homologie de séquence entre elles. Cela montre qu'en partant de gènes différents, la sélection peut faire converger vers des fonctions identiques et que plusieurs chemins peuvent conduire au même mécanisme enzymatique.

1.2.1.2.2. Protéases à cystéine ou à thiol

Ces protéases sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Leur activité dépend de la présence de la diade catalytique cystéine et histidine. Généralement, les protéases à thiol sont inhibées par la présence d'agents réducteurs comme le p-chloro-mercuribenzoate (pCMB), l'iodoacétamide et la N-éthylmaléimide, mais ne sont pas affectées par la présence de PMSF et le DFP (inhibiteur des protéases à sérine) ou d'agent chélateur. Les protéases à thiol ont un pH optimum d'activité se situant au voisinage de la neutralité. Cependant, un petit nombre d'entre elles, telles que les protéases lysosomales, présentent un maximum d'activité aux pH acides [1].

Ces protéases à cystéine semblaient être composées d'au moins 4 superfamilles [14]. La plus étudiée de ces protéinases est la papaïne (EC 3.4.22.2), présente dans le latex de la plante *Carica papaya* et qui appartient à la superfamille à qui elle a donné son nom. Comme pour les peptidases à sérine, les connaissances se sont accélérées durant ces dernières années et en se basant sur le nouveau système de classification, les peptidases à cystéine se divisent en 60 familles et 9 clans : CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO et CP. En plus de ces 9 clans, il existe un clan supplémentaire CX où sont regroupées 9 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan particulier. Chez ces peptidases le nucléophile est un groupement sulfhydryque d'un résidu cystéine. Le mécanisme catalytique est similaire à celui des peptidases à sérine dans la mesure où un nucléophile et un donneur de protons (base) sont nécessaires. Le donneur de

proton, chez toutes les peptidases à cystéine, est un résidu histidine (comme pour la majorité des peptidases à sérine). Bien qu'il existe l'évidence, chez certaines familles, de la nécessité d'un troisième résidu pour orienter l'anneau imidazole de l'His, la plupart des peptidases à cystéine n'ont besoin que d'une dyade catalytique. Le mécanisme catalytique se déroule donc à travers la formation d'un intermédiaire covalent où sont impliqués les deux résidus Cys25 et His159 (selon la numérotation de la papaïne, qui jouent le même rôle que la Ser195 et His57 chez les protéases à sérine). Le nucléophile est un ion thiolate qui est stabilisé par la formation d'une paire d'ion avec le groupement imidazole voisin de l'His159 [25]. La papaïne (figure 1.8) fait partie de la famille C1 et du clan CA. Les structures cristallographiques de la papaïne et de plusieurs peptidases de la famille C1 ont été déterminées et les résidus catalytiques ont été identifiés : cystéine, histidine et asparagine. Un quatrième résidu (glutamine) précédant le résidu cystéine semble également essentiel pour l'activité catalytique [17].

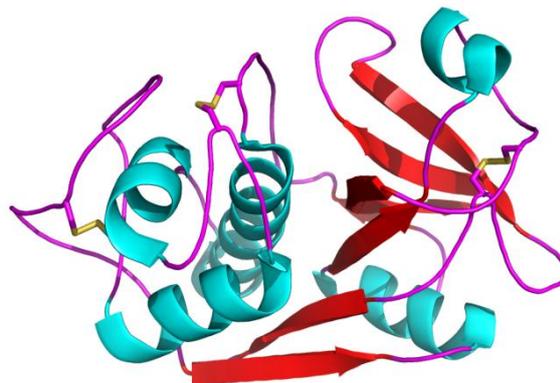


Figure 1.8 : Structure en ruban de la papaïne code-pdb : 1hkp et de la représentation des sites de fixation du substrat [28].

1.2.1.2.3. Protéases à acide aspartique

Les protéases acides agissent à pH acide et possèdent un acide aspartique dans leur site actif. Plusieurs mécanismes d'action des protéases acides ont été proposés. Celui qui est généralement admis est un mécanisme général acide-base basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (figure 1.9). Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone

carbonyle (carbone avec double liaison à une molécule d'oxygène) du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage [29]. Ces protéases à acide aspartique (EC 3.4.23) étaient divisées en deux super-familles, eucaryotes et rétrovirales, distinguées en fonction de leur taille et de leur source d'origine. La plupart de ces protéases atteignent un maximum d'activité à des pH bas (pH 3 à 4), leurs MM varient de 30 à 45 kDa et elles sont inhibées par la pepstatine A [30, 31]. Si nous considérons à présent la nouvelle classification, les peptidases à acide aspartique sont divisées en 16 familles et en 5 clans : AA, AC, AD, AE et AF. En plus de ces 5 clans, il existe un clan supplémentaire AX, où sont regroupées 2 de ces familles qui n'ont pas encore pu être attribuées à un clan en particulier. Le meilleur exemple de ce type de protéase est certainement la pepsine, enzyme responsable de la digestion des protéines alimentaires dans l'estomac des animaux supérieurs et qui est sans aucun doute la protéinase à acide aspartique la plus étudiée. Cette enzyme scinde préférentiellement les liaisons peptidiques incluant la fonction amine de la tyrosine ou de la phénylalanine. Chez la pepsine, les chaînes latérales de deux résidus d'acide aspartique maintiennent une molécule d'eau en place.

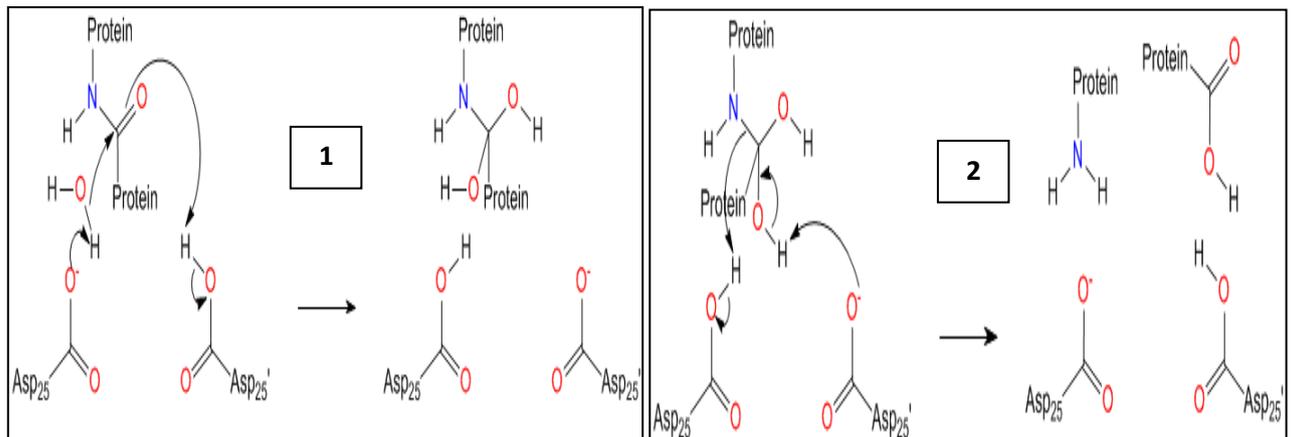


Figure 1.9 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des protéases à acide aspartique.

1.2.1.2.4. Peptidases à métal

Les métallo-protéases (EC 3.4.24) représentent le groupe d'enzymes le plus diversifié. Elles se caractérisent par leur besoin en ions bivalents pour leurs activités catalytiques. Dans la majorité des cas, il s'agit du Zn^{2+} [32]. Les métallo-protéases à zinc sont produites aussi bien par les eucaryotes que par les procaryotes et sont subdivisées en quatre groupes : DD-carboxy-peptidases, carboxy-peptidases, zincines et inverzincines (figure 1.10).

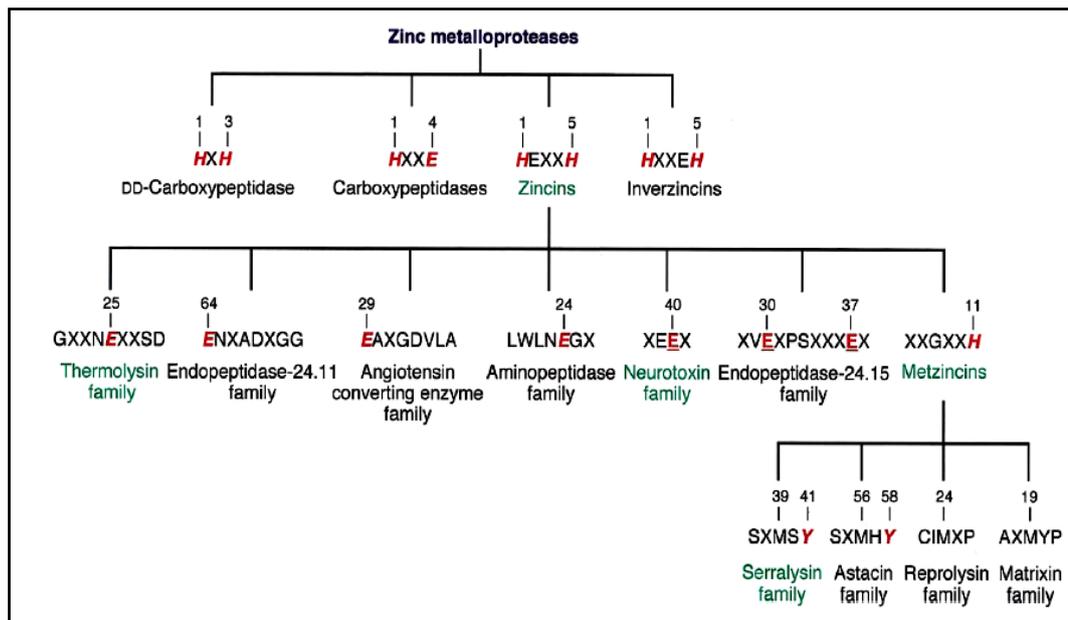


Figure 1.10 : Classification des métallo-protéases à zinc sur la base de la nature des acides aminés qui forment le site de fixation du zinc [33].

Dans ces enzymes, un cation, généralement le zinc, active une molécule d'eau. L'ion métallique est maintenu en place par trois acides aminés. Les acides aminés qui peuvent remplir cette fonction sont His, Glu, Asp ou Lys. Parmi les métalloprotéases connues, environ la moitié contiennent le motif HEXXH, qui se situe à l'endroit de la liaison du cation métallique [34]. Le groupe de métalloprotéases possédant ce motif est appelé la superfamille des « zincins ». Cette superfamille est divisée en au moins dix autres familles selon la localisation du troisième ligand du zinc. Les métalloprotéases bactériennes appartiennent à trois familles : thermolysine, serralysine et neurotoxine dont les enzymes types sont produites par *Bacillus*

thermoproteolyticus, *Serratia marcescens* et *Clostridium botulinum* ou *C. tetani*, respectivement [33].

Dans ce type d'enzymes, l'atome de zinc participe à la catalyse en polarisant fortement la liaison carbonyle appartenant à la liaison peptidique coupée. Le carbone du carbonyle devient alors beaucoup plus électrophile, permettant une attaque par l'eau (assisté d'un groupement Glu) pour donner un intermédiaire instable bi-anionique. Cet intermédiaire se coupe en libérant l'acide aminé C-terminal, le peptide restant se libère par la suite.

Ces enzymes sont inhibées par les agents chélateurs tels que l'EDTA ou l'EGTA. Les métalloprotéases les plus étudiées sont actives dans des conditions de pH légèrement alcalins (7,0 à 9,0), leur MM sont comprises entre 35 et 45 kDa [35-37].

1.2.1.2.5. Peptidases à thréonine

Les peptidases à thréonine sont regroupées en 3 familles (T1, T2 et T3) et un clan BP(T) constitué d'un nombre relativement restreint comparé aux autres peptidases. En effet ce nouveau type catalytique n'a été découvert que très récemment grâce aux recherches effectuées sur les protéasomes. Un protéasome est un complexe de protéases impliquées dans la dégradation protéique. Il est d'une grande importance pour la croissance et la viabilité de la cellule en raison de ses fonctions dans le cycle mitotique et dans le contrôle de la demi-vie de la plupart des protéines cellulaires.

La recherche chez les procaryotes de particules ressemblant au protéasome eucaryote a conduit à la découverte d'un complexe protéolytique chez *Thermoplasma acidophilum* [38, 39]. Dans un premier moment, la particule était dénommée protéinase multicatalytique (prosome) puis, le nom protéasome, a été ensuite adopté. Ce nom a été choisi pour décrire son activité protéolytique (« protéa-») mais aussi sa taille et sa complexité («-some »).

Les premières recherches sur les activités protéolytiques du protéasome ont conduit à des résultats controversés. Ceci découle du fait que même après les mutations de tous les résidus conservés du protéasome de *Thermoplasma*, à savoir les sérines, les deux résidus d'histidine, l'unique résidu de cystéine et les deux résidus d'acide aspartique, ce dernier présentait toujours une activité

enzymatique. Cependant, la suppression de la thréonine N-terminal ou sa mutation par une alanine a conduit à l'inactivation totale de l'enzyme [40-43]. Cela semblait indiquer que le protéasome n'appartenait pas aux groupes de peptidases "classiques" et qu'il fait partie d'une nouvelle classe de peptidases où le résidu de la thréonine N-terminal fonctionne comme un nucléophile.

1.2.1.2.6. Peptidases non classées

En accédant au site de MEROPS, nous avons pu observer la présence de plusieurs peptidases dont le mécanisme catalytique est inconnu. Elles sont regroupées en 12 familles. Ainsi, la section 3.4.99 de la liste EC est réservée aux protéinases dont le mécanisme catalytique n'a pas encore été identifié. Elle peut être considérée comme une liste d'attente pour les enzymes qui, une fois purifiées et caractérisées, vont émerger comme membres d'un des autres groupes et/ou constituera un nouveau groupe. La consultation du site du Comité de Nomenclature de l'IUBMB, montre que presque la moitié (27) des peptidases regroupées dans cette section 3.4.99 (46 membres) ont été soit « éliminées », soit attribuées à un des types catalytiques. Chacune de ces enzymes devraient en effet, avoir déjà été « découverte » et comme nous l'avons déjà mentionné, une même enzyme peut se retrouver avec plusieurs dénominations, entraînant alors une certaine confusion. Comme exemple d'enzyme reclassée, la peptidase 3.4.99.1, devenue 3.4.23.28., il s'agissait donc d'une endopeptidase à acide aspartique.

1.2.2. Origine des protéases

Les protéases se trouvent dans une large diversité de sources telle que : les plantes, les animaux et les microorganismes [1].

1.2.2.1. Protéases d'origine végétale

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

- **Papaïne** : En provenance du latex de fruit *Carica papaya* qui se développe dans les régions subtropicales de l'ouest et le centre d'Afrique, ainsi en Inde. Elle est largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés [44]. C'est une protéase à cystéine, active aux pH 5 - 9 [1].

- **Broméline** : Extraite à partir de l'Ananas (*Ananas comosus merr*). C'est une protéase à cystéine active à des pH allant de 5 à 9 [45].
- **Kératinase** : Certaines plantes produisent des protéases qui dégradent les cheveux. Ainsi, la digestion des cheveux et de la laine peut servir pour la production des Aa(s) essentiels comme la lysine et la prévention du colmatage des systèmes du traitement des eaux usées [1, 46].
- **Ficine** : Issue des figues (*Ficus carica latex* et *Ficus glabrata*) [47-49]. Cette enzyme est utilisée dans l'industrie alimentaire, dans l'industrie de textile, en pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers [50].

1.2.2.2. Protéases d'origine animale

1.2.2.2.1. 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 [51, 52].
- **La rénine** : Elle est produite comme précurseur inactif (prorénine) dans l'estomac des nourrissons de mammifères. Elle devient active par autocatalyse ou après l'action de la pepsine [53], d'où le nom de pepsine-like protéase. Cette enzyme est largement utilisée en industrie laitière pour produire du lait caillé stable avec de bonne saveur. La spécificité d'action de cette enzyme découle de sa spécificité de clivage d'une seule liaison peptidique de la caséine κ pour générer la paracaséine κ insoluble et un glycopeptide C-terminal [44].
- **Pepsine** : C'est une protéase acide qu'on trouve dans l'estomac de presque tous les vertébrés. L'optimum de son activité est situé entre pH 1 et 2. La pepsine scinde préférentiellement les liaisons peptidiques incluant la fonction amine de la tyrosine ou de la phénylalanine [54].

1.2.2.2. Protéases pancréatiques

Ce sont des protéases à sérine, synthétisées sous forme de précurseurs inactifs :

- **Trypsine** : C'est la protéase à sérine la plus spécifique des protéases connues, elle coupe après la lysine ou l'arginine. Son pH optimum d'action est de 8 et elle est responsable de l'hydrolyse des protéines au niveau de l'intestin [55, 56].
- **Chymotrypsine** : Elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques auxquelles participe le carboxyle des Aa aromatiques (Trp, Tyr et Phe). Son pH optimal d'action est compris entre 7 et 8 [57].

1.2.2.3. Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes représentent 40% des enzymes du marché mondial [58]. Le grand succès de ces protéases microbiennes dans les systèmes biotechnologiques est attribué à leur diversité biochimique très large, à la faisabilité de la culture de masse et la facilité des manipulations génétiques [59]. Une large proportion des protéases commerciales disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines sont dérivées de bactéries, particulièrement de souches de *Bacillus* [58, 60]. Leurs propriétés sont adaptées, plus particulièrement pour l'usage en détergence [61]. Ainsi, des protéinases à partir de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* sont commercialement utilisées [62, 63].

D'autre part, une large variété de protéases est également élaborée par les moisissures [64].

Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, ce qui permet une séparation du mycélium du milieu de fermentation par une simple filtration [65, 66]. En outre, ces moisissures sont des souches "Generally Recognized As Safe" (GRAS) et peuvent se développer sur des substrats pas chers [67]. Par rapport aux protéases du genre *Bacillus*, celles produites par les champignons sont plus adaptées pour l'industrie agroalimentaire.

1.3. Les subtilisines

1.3.1. Définition

Ces protéases sont exclusivement produites par les microorganismes, essentiellement les bactéries du genre *Bacillus*. Cette famille de protéases inclut trois sous groupes : les subtilisines proprement dites (>64% d'identité), les protéases hautement alcalines (>55% d'identité) et les protéases intracellulaires (>37% d'identité).

Les subtilisines nommées aussi subtilases représentent le deuxième groupe de protéases à sérine le plus important. Plus de 200 subtilases sont connues, dont 170 ont été complètement séquencées [16]. Les subtilisines d'origine bactérienne possèdent une séquence et une structure tridimensionnelle différente de celles des protéases à sérine des mammifères (trypsine, chymotrypsine,...) et sont produites sous forme d'un précurseur inactif. La pré-pro-subtilisine est capable de traverser la membrane cellulaire pour être ensuite activée de façon auto-catalytique par clivage du pro-peptide [16].

1.3.2. Structure des subtilisines

Les subtilisines sont produites sous la forme d'un précurseur la pré-pro-subtilisine. Elles sont par la suite acheminées au travers de la membrane cellulaire via le pré-peptide (peptide signal) et en fin activées par clivage du pro-peptide pour donner l'enzyme mature [16].

Les subtilisines produites par des bactéries du genre *Bacillus* comme *B. licheniformis* qui produit la subtilisine Carlsberg. Cette dernière a été découverte en 1947 par Lindstrom, Lang et Ottesen dans les laboratoires Carlsberg. Elle est largement utilisée en détergence. En effet, sa production annuelle a été estimée à approximativement 500 tonnes d'enzyme pure [68, 69]. Elle est produite sous forme d'un précurseur de 379 acides aminés : la pré-pro-subtilisine, qui est capable de traverser les membranes cellulaires pour être ensuite activée de façon auto-catalytique par clivage du segment pro- de sorte à donner l'enzyme mature formée de 274 Aa [70].

La subtilisine BPN' produite par *B. amyloliquefaciens* est, quant à elle, d'un intérêt commercial moindre [3]. Cette dernière est produite sous forme de pré-pro-subtilisine [66]: il s'agit d'un précurseur muni d'un peptide signal qui dirige la

sécrétion de la subtilisine et un propeptide aminoterminal qui joue un rôle primordial dans le processus de repliement de l'enzyme sous sa forme active [67, 68]. Les deux subtilisines ont une masse moléculaire de 27,5 kDa, mais elles diffèrent l'une de l'autre par 58 acides aminés. Elles possèdent les mêmes propriétés biochimiques : un pH optimum de 10 et une température optimale de 60°C. Les deux enzymes présentent une large spécificité vis-à-vis du substrat et un site actif formé des acides aminés Asp 32, His 63 (64 pour la subtilisine BPN' car elle possède un acide aminé supplémentaire en position 56) et Ser 220 (221 pour la subtilisine BPN') [3].

La *B. amyloliquefaciens* produit, quant à elle, la subtilisine Novo (BPN') formée de 30 résidus d'acides-amino pour le peptide signal, 75 résidus pour le pro-peptide et 275 résidus pour la protéine mature dont une triade catalytique caractéristique et deux sites de fixation du calcium pour la stabilisation de la structure tridimensionnelle [71]. Cette enzyme est d'un intérêt commercial moindre que la précédente.

Une autre enzyme très étudiée à l'échelle fondamentale a été aussi identifiée, il s'agit de la subtilisine E, produite par *B. subtilis*. Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 381 Aa organisé en peptide signal de 29 résidus suivi par 77 résidus formant le pro-peptide accroché à la protéine mature de 275 résidus [72].

1.3.2.1. Peptide signal

L'exportation des protéines de leur lieu de synthèse, le plus souvent le cytoplasme, vers une autre destination pouvant être localisée à l'intérieur (un autre compartiment cellulaire) ou à l'extérieur de la cellule, est un mécanisme commun aux cellules procaryotes et eucaryotes. Pour réaliser cet export les protéines sont synthétisées sous la forme de précurseurs munis d'un peptide signal à l'extrémité N-terminale ; pouvant être identifié par la machinerie cellulaire qui assure la translocation [71, 72, 73]. Le peptide signal consistant en une courte séquence de 18 à 35 acides aminés avoir achevé sa fonction de transporteur, est clivé au moyen d'une signal-peptidase (SPase) spécifique [74]. D'une manière générale, la pré-protéine est reconnue par un facteur soluble qui l'amène jusqu'à la membrane cible où la protéine est prise en charge par la machinerie de translocation.

Ensuite, la chaîne polypeptidique est transportée à travers un canal. Dans la plupart des cas ce processus de transport est conduit par un moteur de translocation qui lie et hydrolyse les nucléotides triphosphates. Finalement, le peptide signal est clivé, il en résulte la protéine mature qui sera relarguée sous une conformation active dans le compartiment cible [71, 73].

Bien que les structures primaires des différents peptides signaux présentent peu de similitude, trois régions distinctes peuvent néanmoins être identifiées [72]. L'extrémité amino-terminale (N) des peptides signaux contient le plus souvent un ou plusieurs résidus chargés positivement de type arginine ou lysine. Bien que la présence de ces résidus ne soit pas indispensable à l'exportation des protéines; il semble que ces charges positives interagissent d'une part avec la machinerie de translocation [72] et d'autre part avec les phospholipides chargés négativement de la bicouche lipidique de la membrane. La région hydrophobe (H) centrale, localisée à la suite du domaine N-terminal du pro-peptide, est comme son nom l'indique riche en acides aminés hydrophobes et semble adopter une structure hélicoïdale au niveau de la membrane [72]. Le site de coupure du peptide signal est quant à lui localisé dans le domaine C-terminal.

L'étude des mutations qui touchent certaines régions du peptide signal montre que l'addition de charge négative au niveau du noyau hydrophobe abolit complètement le clivage du peptide signal et la translocation [74].

Les travaux de Borchert et Nagarajan (1990), montrent également que la diminution de la taille de la région hydrophobe a pour effet de ralentir la vitesse de la réaction de clivage du peptide signal et celle de la translocation [75]. De plus, il semble que l'on trouve, au niveau des positions -1 et -3 des peptides signaux des protéines des bactéries du genre *Bacillus*, préférentiellement des acides aminés petit et neutre alors que tout acide aminé est toléré en position +1 de la protéine mature [75]. Ces mêmes travaux ont permis de montrer que lorsque deux des trois charges positives de la région amino-terminale du peptide signal de la levansucrase de *B. amyloliquefaciens* sont éliminées, le clivage du peptide signal est extrêmement ralenti comparé au peptide signal non muté. L'élimination de la troisième charge positive empêche la translocation et une dégradation de la protéine est observée. D'une manière générale les peptides signaux peuvent être subdivisés en 5 classes distinctes sur la base du site de clivage de la SPase et de

la voie via la que la pré-protéine est exportée [76].

1.3.2.2. Pro-peptide : classification, fonction et structure

Un certain nombre d'enzymes est secrété sous la forme d'un précurseur inactif, pro-enzyme. Le pro-peptide est ensuite clivé par autocatalyse pour libérer la forme mature active de l'enzyme [77].

1.3.2.2.1. Classification des pro-peptides

Sur la base de nombreux travaux, il apparait que les pro-peptides fonctionnent tels des «modulateurs post-transcriptionnels» de la structure et de la fonction de la protéine. D'une façon générale, les pro-peptides peuvent être classés en deux catégories : les pro-peptides de classe I et les pro-peptides de classes II [78].

Les pro-peptides de classe I représentent les extensions polypeptidiques qui assurent directement le repliement de la protéine à laquelle ils sont associés sous une forme active (figure 1.11). Ces protéines exigent pour acquérir une conformation biologiquement active l'information contenu dans leurs pro-peptides [75] et sont incapables de se replier sous une configuration biologiquement fonctionnelle en son absence qui agissent tels des chaperons intermoléculaires (IMC).

Les pro-peptides de classes II peuvent avoir différentes fonctions (transport des protéines, association protéine-protéine, oligomérisation, modulation de l'activité et de la stabilité, etc) et n'agissent qu'indirectement sur le repliement de la protéine.

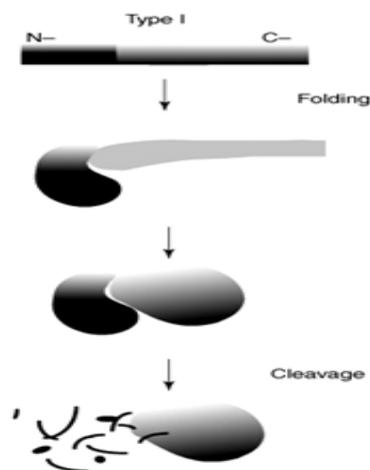


Figure 1.11 : Schéma illustrant les mécanismes d'actions des pro-peptides de type I [74, 79].

1.3.2.2.2. Fonctions du pro-peptide

- Chaperon intermoléculaire

La fonction d'une protéine est portée par sa structure tridimensionnelle qui résulte de l'enchaînement des acides aminés et la nature de chaque acide aminé [80]. Les règles de traduction de l'information codée par l'ADN en une séquence d'acides aminés sont connues. Par contre, les règles qui permettent à une séquence d'acides aminés de se replier en une structure tridimensionnelle univoque sont encore inconnues. En effet, la rapidité des phénomènes de repliement rend leur étude expérimentale difficile [81, 82] et le fait que les travaux expérimentaux soient menés essentiellement in vitro pose le problème de définir en quoi le repliement in vitro ressemble ou diffère de celui in vivo [80].

Il a longtemps été postulé que le repliement d'une chaîne se faisait in vivo par les mêmes mécanismes que ceux démontrés in vitro. Ce point de vue a été modifié par la découverte des chaperons moléculaires [74, 79]. Les chaperons par leur association transitoire avec des protéines naissantes ou déstructurées par un stress, sont capables d'empêcher un mauvais repliement ou une agrégation par association au chaperon par des liaisons hydrophobes. Ce rôle de chaperon a été, entre autre, attribué à la pro-séquence de nombreuses protéines telles que les subtilisines [80], la protéase α -lytique [83] et les carboxypeptidases [84].

La pro-séquence est, à un stade précoce de la maturation, liée de façon covalente (liaison peptidique) à l'extrémité N-terminale du domaine catalytique. Ainsi, chaque pro-peptide assure le repliement de la molécule d'enzyme à laquelle il est lié, en lui communiquant une information stérique. Ces particularités lui ont valu l'appellation de chaperon interamoléculaire [74, 79]. In vivo, la liaison covalente entre le pro-peptide et la subtilisine est clivée par un mécanisme intramoléculaire faisant intervenir la triade catalytique Asp, His et Ser. Dans certaines conditions, il est possible qu'un clivage intermoléculaire survienne [85]. De toutes les façons, le pro-peptide agit comme un substrat pour la subtilisine [81].

Cependant, Barr en 1991, a montré que la liaison covalente du pro-peptide à l'extrémité N-terminale de la subtilisine n'est pas un critère nécessaire pour le repliement. Ainsi, l'addition exogène du pro-peptide à la subtilisine dénaturée peut aussi orienter son repliement vers une forme active [81].

Afin de mieux établir le rôle du pro-peptide dans le repliement de ces protéines Shinde et Inouye (1996) ont éliminé le pro-peptide de la subtilisine E. ils ont ainsi démontré que l'absence de la pro-séquence entraîne la production d'une subtilisine catalytiquement inactive ayant une structure du type « Molten Globule : globule fondu » [74, 79]. La délétion partielle de pro-peptide (résidus -77 à -68 ou -77 à -64) permet d'obtenir une subtilisine active. L'efficacité de ce petit pro-peptide est de 30 à 40% par rapport au pro-peptide d'origine.

D'autres travaux menés par Bryan et al (1995) ont montré que la subtilisine mutée de sorte que l'un des deux sites de fixation du calcium soit aboli pouvait être, après une dénaturation acide (25 mM H_3PO_4 , pH 1.85), complètement renaturée à des concentrations élevées de sel (KCl 0.6 M) et en absence du pro-peptide [86]. Cependant, Eder et al (1993) ont suggéré qu'il s'agissait en fait d'une structure de type « Molten Globule » [87, 88]. En effet, le fait que la subtilisine puisse se replier en absence de son pro-peptide est surprenant et semble être en contradiction avec les résultats antérieurs obtenus par Shinde et al (1993) [75]. Dans cette même perspective, ils ont montré que lorsque la subtilisine dénaturée par une solution de Guanidine-HCl est incubée, pendant 20 jours, en absence de son pro-peptide à une concentration ionique proche de celle in vivo, seul 1% de l'activité est restauré. Alors qu'à la suite d'une dénaturation acide, l'activité restaurée est de 2 à 3% dans les mêmes conditions expérimentales. La dénaturation acide des subtilisines permet de maintenir une ébauche de structure [80]. Ce petit élément de structure pourrait être responsable de la renaturation en absence de pro-peptide (60 min d'incubation dans une solution de KCl 6M).

Toutefois, on note que la subtilisine possède deux sites de fixation du calcium qui pourraient être responsable de la structure résiduelle observée à la suite d'une dénaturation acide.

Pour évaluer le rôle de l'ion calcium dans le repliement de la protéine, Shinde et al (1993) ont réalisé la dialyse de la subtilisine, dénaturée par traitement acide, contre une solution de Tris HCl 50 mM (pH 7) additionnée de 1 à 3 mM EGTA. L'étude a montré qu'il n'existe pas de différences significatives, ce qui indique que le calcium n'est pas responsable de la structure résiduelle [75].

L'une des raisons pour lesquelles la forte concentration en sel facilite le repliement est que le pro-peptide lui-même est très fortement chargé. La séquence en acides aminés du pro-peptide comporte 17 acides aminés basiques

(15 lysines et 2 histidines) ainsi que 11 résidus acides. Plus de tiers du pro-peptide (36%) est donc très fortement chargé. Cependant, la distribution de ces résidus chargés est inégale, mais ils se retrouvent tout de même à la surface de la structure tridimensionnelle du pro-peptide. Cet environnement fortement ionisé, fourni par le pro-peptide, peut dans une certaine mesure être mimé par une forte salinité [75, 78].

- *Inhibiteur compétitif*

Bien que le mécanisme de la réaction enzymatique des protéases à sérines soit bien étudié, le rôle structural de leur pro-peptide, dans la relation avec l'activité de l'enzyme durant le processus de maturation, n'est pas encore connu en détail [77]. Il est intéressant de savoir qu'au cours du repliement de la subtilisine, le pro-peptide, tel un substrat, se fixe au niveau de la région du site actif de l'enzyme et agit comme un inhibiteur compétitif [75] avec une constante d'inhibition (K_i) comparable à celle de l'inhibiteur de *Streptomyces*, un inhibiteur fort de la subtilisine. De même, un pro-peptide synthétique peut exercer un effet inhibiteur sur la subtilisine mature. Le même comportement inhibiteur est aussi observé dans d'autres familles de protéases telles que les métalloprotéases, les protéases aspartiques et les protéases à cystéine [75].

La fonction du chaperon intramoléculaire du pro-peptide de la subtilisine est en corrélation avec sa capacité inhibitrice vis-à-vis sa propre protéase. Ceci indique que l'affinité entre le pro-peptide et la subtilisine a une influence directe sur l'efficacité du repliement [89]. Ces fonctions parallèles du pro-peptide sur sa propre protéase ont un rôle biologique dans la protection des protéines intracellulaires de la digestion enzymatique durant le processus de maturation de la protéase [75]. De plus, il existe une sélectivité de la fonction inhibitrice du pro-peptide vis-à-vis de diverses protéases de différentes classes, par exemple : le pro-peptide de la sérine protéase alpha-lytique inhibe spécifiquement sa propre enzyme sans toutefois agir sur les autres élastases [72]. Cette sélectivité du pro-peptide est biologiquement importante pour la différenciation intramoléculaire entre les différentes protéases cellulaires, mais elle n'est pas exclusive. En effet, on remarque que dans le cas des subtilisines bactériennes cette sélectivité n'existe pas même si la cinétique d'inhibition est différente. De même, la pro-séquence de la thermolysine inhibe sa propre enzyme mais aussi d'autres

enzymes produites par *Bacillus thermolyticus* qui présentent une homologie significative avec la thermolysine [72].

1.3.2.2.3. Interchangeabilité des pro-peptides

Des travaux réalisés par Shinde et al (1993), montrent que « in vitro » le pro-peptide de la subtilisine E de *Bacillus subtilis* est non seulement capable d'assurer la maturation de la subtilisine E mais aussi celle de la subtilisine BPN' et de la subtilisine Carlsberg [89]. De même, Takagi et al (2001) ont découvert que le pro-domaine des subtilisines thermostables telle que l'aqualysine I (proA) permet le repliement de la subtilisine BPN' quand il est ajouté en trans [90]. A cet effet, un gène chimérique a été construit à partir de la subtilisine E et de l'aqualysine I pour tenter le repliement de la subtilisine E au moyen du pro-peptide de l'AQI en cis ; les résultats indiquent que le pro-peptide de l'aqualysine I peut assurer, dans une certaine mesure, le repliement intramoléculaire de la subtilisine E dénaturée. Ainsi, les pro-peptides de la famille des subtilisines possèdent la même fonction, malgré, la diversité de leurs séquences. De plus, les propriétés enzymatiques de certaines protéines chimères, dont le domaine mature de la subtilisine est partiellement remplacé par celui de l'aqualysine I, sont similaires à celle de l'aqualysine I. Le pro-peptide de la subtilisine ne présente que 21% d'homologie de séquence avec le pro-peptide de l'aqualysine I, pourtant, ce dernier est capable non seulement de se lier à la subtilisine BPN' mature mais aussi de renaturer la subtilisine BPN' dénaturée avec approximativement 50% d'efficacité par rapport à son propre pro-peptide ajouté en trans [90].

1.3.2.2.4. Effet des mutations sur la fonction du pro-peptide

Ikemura et al (1987) et Cash et al (1989) ont montré que la pro-séquence joue un rôle essentiel en guidant le repliement de la subtilisine sous une forme active. Il est donc probable que certaines substitutions au niveau du pro-peptide peuvent être à l'origine d'un défaut dans la production de la subtilisine active [77, 92].

La caractérisation de certaines mutations au niveau du pro-peptide a permis d'élucider sa fonction dans le repliement de la protéine. Plusieurs méthodes chimiques et enzymatiques, induisant une mauvaise incorporation de nucléotides, ont été utilisées pour générer des mutations au hasard « in vitro ».

Grâce à ces méthodes, une variété de gènes a été mutée avec succès mais la faible fréquence des mutations et la difficulté à limiter les mutations en une région définie ont réduit ces applications [72].

Kobayashi et Inouye (1992) ont isolé des pro-peptides mutés incapables d'assurer la maturation correcte de la subtilisine « in vivo » [86]. Li et al (1995) ont sélectionné 6 mutants parmi 25 isolées antérieurement et les ont exprimées dans *E. coli* au moyen du système d'expression T7. Ils ont montré que certaines de ces pro-peptides mutés étaient capables de renaturer les subtilisines dénaturées assez efficacement. Cette aptitude des pro-peptides mutants est en corrélation avec la valeur de leur K_i et indique que l'affinité du pro-peptide mutant vis-à-vis de la subtilisine mature est en relation directe avec sa capacité à assurer sa fonction de chaperon moléculaire. Le choix a porté sur les mutants : *Ile*₋₆₇ → *Val*, *Ile*₋₄₈ → *Thr*, *Gly*₋₄₄ → *Asp*, *Lys*₋₃₆ → *Glu*, *Ala*₋₃₀ → *Thr* et *Pro*₋₁₅ → *Leu*. Les mutants *Ile*₋₆₇ → *Val*, *Ile*₋₄₈ → *Thr* et *Gly*₋₄₄ → *Asp* ne développent pas de halo sur le milieu à base de caséine contrairement aux autres mutants. L'aptitude de ces pro-peptides mutés à renaturer « in vitro » la subtilisine dénaturée par la Guanidine-HCl 6 M a été étudiée [90]. Le mutant *Ala*₋₃₀ → *Thr* est capable de renaturer la subtilisine BPN' dénaturée avec une efficacité de 80% comparé au pro-peptide sauvage. De même, les mutants *Ile*₋₆₇ → *Val* et *Gly*₋₄₄ → *Asp* sont apte à renaturer la subtilisine BPN' avec, respectivement, 18 et 13% d'efficacité.

1.3.2.2.5. Structure du pro-peptide

La structure secondaire du pro-peptide complexé avec la subtilisine native est formée de : 31% d'hélice α , 27% de feuillets β de boucles et 9% de coudes β (figure 1.12). Cependant, l'addition de ri-fluoroéthanol au pro-peptide induit une augmentation de l'hydrophobicité de l'environnement et, par conséquent, une augmentation du pourcentage d'hélice α (38%) [93]. Ces résultats indiquent que le pro-peptide interagit avec un élément hydrophobe, probablement les hélices 5 et 6 de la subtilisine. Ces deux hélices sont très hydrophobes, elles correspondent aux acides aminés 133 à 147 et 220 à 237, respectivement. Le pro-peptide adopte donc une structure de type hélice α pour induire le repliement de la région mature. Il crée la subtilisine mature des relations dynamiques et symbiotiques. Cependant, il est important de noter que le pro-peptide (domaineu-Cim), une fois libéré de la subtilisine, est dépourvu de structures secondaires et tertiaires significatives [75].

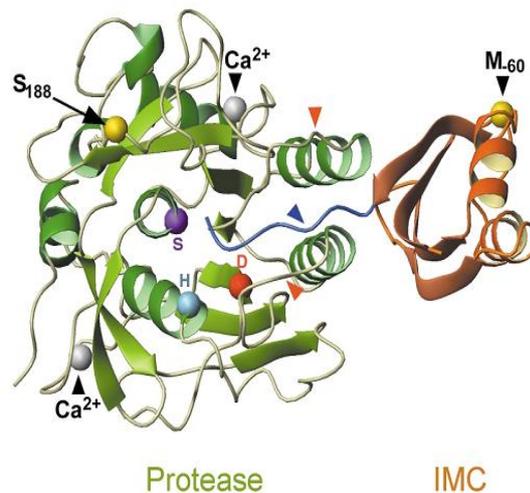


Figure 1.12 : Structure aux R-X du complexe pro-peptide (domaine IMC)-subtilisine BPN'. Le site actif des résidus d'Asp32, d'His64 et de Ser221 sont représentés respectivement en rouge, bleu et violet. La partie C-terminale de l'IMC (représentée en pourpre) interagit avec le domaine de fixation du substrat (flèche rouge). Les 2 sites de fixation du calcium sont représentés en gris [78].

L'alignement de ses séquences primaires de pro-peptide de la famille des subtilisines permet de mettre en évidence des observations intéressantes. Bien que les séquences présentent généralement un faible niveau d'homologie, deux régions dispersées entre les extrémités N- et C-terminales affichent une conservation de séquence significative. Ces régions contiennent des résidus hydrophobes (Va, Phe, Ile et Leu) et semblent avoir un rôle crucial dans le processus de repliement. Dans ce même sens, Shinde et al (2003) mettent en avant la présence de trois domaines nommés H1, H2 et H3 conservés entre les différents pro-peptides de subtilisines et au niveau desquels se localisent les résidus hydrophobes [75].

Le segment central du pro-peptide non conservé joue, quant à lui, un rôle dans les interactions spécifiques entre le pro-peptide et le domaine catalytique auquel il est associé le repliement et l'inhibition de l'activité. Contrairement aux subtilisines, le pro-peptide de la thermolysine, prototype des TLPs, interagit avec l'enzyme dans une région distincte du site actif et agit comme un inhibiteur non compétitif. Cette inhibition par la pro-séquence est temporaire aussi bien pour la thermolysine que pour la subtilisine puisque les pro-séquences seront dégradées par leurs protéases matures respectives [94].

De plus, Ohata et al (1991) ont suggéré qu'il y a beaucoup plus de résidus chargés négativement au niveau de la séquence des pro-peptides des protéases à sérine alcalines qu'au niveau de celles des protéases neutres [95]. En effet, le pro-peptide de la subtilisine Sendai produite par *Bacillus sp.* présente une charge nette de -19. Cette protéase présente un optimum de pH de 10.5 [95]. Par contre, la subtilisine Carlsberg, protéase alcaline produite par *B. licheniformis*, possède un pro-peptide dont la charge nette est positive (+2).

1.3.2.2.6. Domaine catalytique

L'alignement des structures primaires et secondaires de la subtilisine BPN', subtilisine Carlsberg, thermitase et protéine K [80] a permis de déterminer une région structurellement conservée. Cette région centrale de 190 résidus contient l'ensemble des éléments structurés (hélice α et feuillet β) ainsi que les résidus du site actif (Asp, His et Ser) localisés à l'extrémité C-terminal du feuillet β [95]. Les subtilisines se caractérisent sur le plan structural par une région centrale formée d'un feuillet β parallèle comportant 7 brins (e1 –e7) et de deux hélices α (hC et hF). L'ensemble est entouré par 5 hélices amphipatiques (hB, hD, hE, hG et hH) et deux brins β antiparallèles (e8 –e9).

Les subtilisines possèdent deux sites de fixation du calcium l'un de forte affinité l'autre de faible affinité. Cependant, les membres de la superfamille des subtilases n'ont quelques fois qu'un seul site, mais peuvent en avoir jusqu'à quatre. Ces ions sont essentiels pour la stabilité et l'activité de l'enzyme. Les alignements de séquences et les homologues de structure ont permis de prédire que les sites de fixation du calcium Ca_1 et Ca_3 sont les plus présents au sein des protéases de la famille des subtilases, alors que le site Ca_2 est le moins communément retrouvé. Le site Ca_4 n'a, quant à lui, été mis en évidence qu'au niveau de la protéinase K [80]. Des travaux réalisés par Smith et al (1999) ont montré que la protéase de *Bacillus Ak1* possède quatre sites de fixation de cations : trois d'entre eux sont occupés par des ions Ca^{2+} (Ca_1 , Ca_2 et Ca_3) et le dernier par un ion Na^+ . Les sites Ca_1 et celui de Na^+ sont retrouvés également au niveau des thermitases et des subtilisines. Ca_2 n'a d'homologue qu'au niveau des thermitases alors que Ca_3 est spécifique de la protéases Ak1.

Les subtilisines n'ont pas de pont disulfure, mais l'aqualysine et la protéinase K en possèdent deux chacune. Cette caractéristique leur confère une forte thermostabilité. En résumé, sept ponts disulfures présents naturellement au niveau des subtilases sont aujourd'hui identifiés entre les résidus : 27-118 et 175-247 pour la protéase K, 61-98 et 163-195 pour l'aqualysine, 5-100 et 171-131 pour la protéase basique de *Dichelobacter* et 47-59 pour la subtilisine S41 de *Bacillus*.

L'alignement des séquences de différentes protéines de la famille des subtilases révèle que seuls les résidus formant la triade catalytique (Asp, Ser et His) et un résidu *Gly*₂₁₉ sont conservés au niveau de toutes ces séquences. Quatre autres résidus glycine (35, 65, 83 et 154) ne sont substitués qu'une ou deux fois. A plusieurs autres emplacements des séquences étudiées les variations sont limitées à deux ou trois résidus qui sont généralement semblables sur le plan structural. Les résidus qui forment les hélices internes hC et hF sont également très fortement conservés [68].

1.3.3. Mécanisme d'action

Certes, la subtilisine n'est pas sur un plan phylogénétique, apparentée à la famille des enzymes du type chymotrypsine. Néanmoins, les atomes qui participent à la triade catalytique, à la poche de l'oxyanion et à la liaison avec le substrat sont pratiquement dans les mêmes positions que les atomes équivalents de la chymotrypsine ou des enzymes de ce type. La réaction catalytique se fait en deux étapes. Dans un premier temps (acylation), le groupe-OH du résidu de Ser221 transfère son proton sur le résidu d'His64 suivit de la formation d'une liaison avec le groupe carbonyle de la liaison peptidique qui va subir l'hydrolyse. On aboutit alors à un oxyanion intermédiaire (nommé E-S⁺⁺) dont le carbone possède une configuration tétraédrique, stabilisée par deux liaisons hydrogènes, l'une avec l'Asn155 et l'autre avec l'His64. Dans un deuxième temps (désacylation), il y a formation de l'acétyl-enzyme (E-Ac) avec migration du proton sur le NH₂ libéré. Enfin, une molécule d'eau intervient pour hydrolyser l'acyl-enzyme. Le résidu d'Asn155 intervient aussi dans la catalyse en se liant à l'oxyanion dans l'état de transition E-S⁺⁺ (figure 1.13).

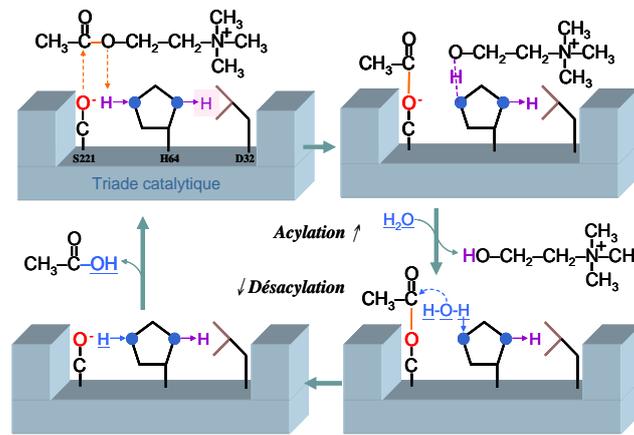


Figure 1.13 : Représentation schématique du mécanisme catalytique des subtilisines [96].

1.3.4. Bases moléculaires de la thermostabilité

1.3.4.1. Effet des ponts disulfures

De nombreuses études suggèrent l'importance des ponts disulfures dans la stabilité structurale des protéines. Pour aborder ce problème, des ponts disulfures ont été créés au niveau d'enzymes telles que la dihydrofolate réductase et la T4 lysozyme [97] par mutagenèse dirigée. Ces ponts disulfures confèrent une certaine stabilité à ces deux protéines aussi bien vis-à-vis de l'inactivation thermique, pour la T4 lysozyme, que vis-à-vis de la dénaturation acide par la Guanidine-HCl 6 M ou par l'urée 8 M, pour la dihydrofolate réductase.

Les subtilisine BPN' et E constituent de bon modèle pour l'étude de l'effet de la formation de ponts S-S sur la stabilité des protéines sécrétées. En effet, deux ponts disulfures : Cys67-Cys99 et Cys163-Cys194 ont été introduit au niveau de la subtilisine E aboutissant a une meilleure thermostabilité [98]. De même, la modélisation moléculaire suggère que des ponts disulfures peuvent, en effet, être introduits au niveau de la subtilisine BPN' entre les résidus de Thr22 et de Ser87 ou de Ser24 et de Ser87. Les enzymes mutées sont sécrétées aussi efficacement que l'enzyme native, et le pont disulfure est formé *"in vivo"*. Ce pont S-S est introduit approximativement à une distance de 24 Å du site catalytique. Il semble n'avoir aucun effet sur l'activité spécifique ou le pH optimum des enzymes mutées [97].

1.3.4.2. Effet d'autres mutations sur la thermostabilité

Plusieurs études ont été réalisées pour comprendre le mécanisme moléculaire de la thermostabilité, afin de générer des enzymes thermostables [99]. A cet effet, ces auteurs ont converti la subtilisine E en une enzyme équivalente, sur le plan fonctionnel, à la thermitase de *Thermoactinomyces vulgaris*. La subtilisine E ne présente que 43% d'homologie (157 Aa sont différents) avec la thermitase ; pourtant seules 8 substitutions sont nécessaires pour convertir la subtilisine E en une enzyme équivalente à la thermitase du point de vue stabilité thermique. En effet, la nouvelle "subtilisine-thermitase" possède une durée de demie vie de 35 min à 83 °C et une température optimale d'activité de 76 °C, similaires à celle de la thermitase, comparée à la subtilisine E qui s'inactive au bout d'une minute à 65 °C.

1.3.5. Clonage, séquençage et expression du gène codant pour la subtilisine

Le clonage, le séquençage et l'expression des gènes codant pour la subtilisine de *B. amyloliquefaciens*, la subtilisine BPN', dans *B. subtilis* I-168 ont été réalisés par Wells et al. en 1983 [100]. En 1985, Jacobs et al. ont cloné et séquencé le gène codant pour la subtilisine Carlsberg de *B. licheniformis* [101]. En 1995, Yamagata et al. ont cloné et séquencé le gène *apr S*, qui code pour la subtilisine Sendai produite par une souche de *Bacillus* sp. G-825-6 [102, 103]. L'étude de la séquence nucléotidique révèle la présence d'un seul cadre ouvert de lecture, initié par le codon TTG et se terminant par le codon stop TAA à la position 1147 (382 Aa). La séquence Shine-Dalgarno (SD : AGGAGG) est localisée à 9 pb en amont du codon initiateur. La séquence potentielle du promoteur (région -35 : TTGTAA ; région -10 : TATAAT ou TAGAAT) est localisée à 47 ou 262 pb de la séquence SD. Les séquences répétées et inversées du terminateur sont localisées entre les positions 1229 et 1270. La séquence en acides aminés, déduite à partir de la séquence nucléotidique, révèle que les 27 premiers acides aminés correspondent probablement au peptide signal. Il s'en suit un site de clivage pour une peptidase, le pro-peptide de 86 résidus et la séquence de l'enzyme proprement dite. La séquence en acides aminés déduite coïncide avec celle déterminée à la suite du séquençage de l'extrémité N-terminale d'un fragment peptidique issu de la digestion de l'enzyme par la lysylendopeptidase.

Au cours de la même année (1995), Jacobs a réalisé le clonage et le séquençage de la région 5'-UTR (5' UnTranslated Region) du gène de la subtilisine Carlsberg (*sub C*) de *B. licheniformis* 6816. L'expression a été étudiée au moyen du gène rapporteur LacZ fusionné à ces régions et intégré dans le chromosome d'un hôte hétérologue, *B. subtilis* [101, 104, 105].

1.4. Les keratinases

Les enzymes kératinolytique ou kératinase sont très répandues dans la nature et sont produites par un ensemble de microorganismes 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 multitude de champignons, parasites pathogènes, dermatophytes et saprophytes tel que : *Aspergillus* [106-108] et par des bactéries tel que le genre *Streptomyces* [109, 110] et le genre *Bacillus* [111-114].

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

Elles appartiennent majoritairement à la classe des protéases à sérine. Les métallo-kératinases ou encore des kératinases à thiol ont été aussi décrites (tableau I.2). Par contre, Jusqu'à nos jours, aucune étude na permis d'identifier une kératinase acide. Des études comparatives *des kératinases avec d'autres protéases indiquent 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, leurs séquences N-terminal indique qu'elles possèdent une homologie de 98% avec les subtilisines. En effet, l'alignement des séquences d'acides aminés des kératinases avec les subtilisines indique que la kératinase de B. licheniformis PWD1 [23] possède une homologie de 99% avec la subtilisine Carlsberg [101]. Même, la triade catalytique (Asp, His et Ser) et la*

région autour d'Asn du trou de l'oxyanion sont bien conservées chez les subtilisines et les kératinases.

Le mode d'action de nombreuses enzymes kératinolytiques a été déterminé moyennant des substrats et des inhibiteurs spécifiques. La spécificité de quelques kératinases est illustrée dans la figure 1.14.

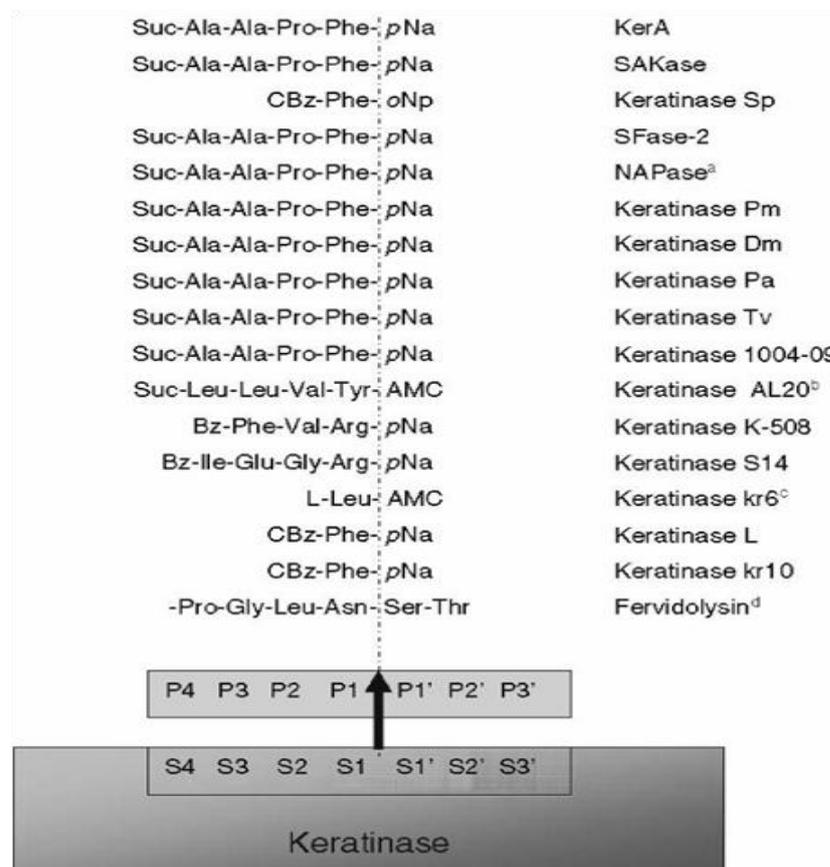


Figure 1.14 : Représentation de la spécificité vis-à-vis du substrat de quelques kératinases.

Ces enzymes 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 [115] (Figure 1.15). 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.

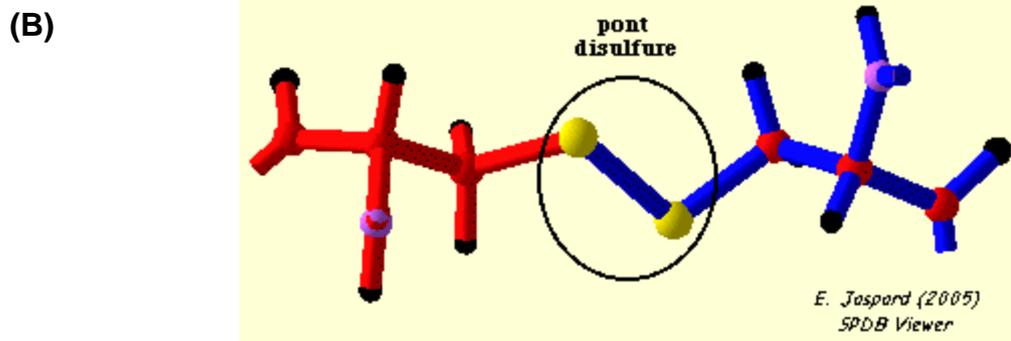
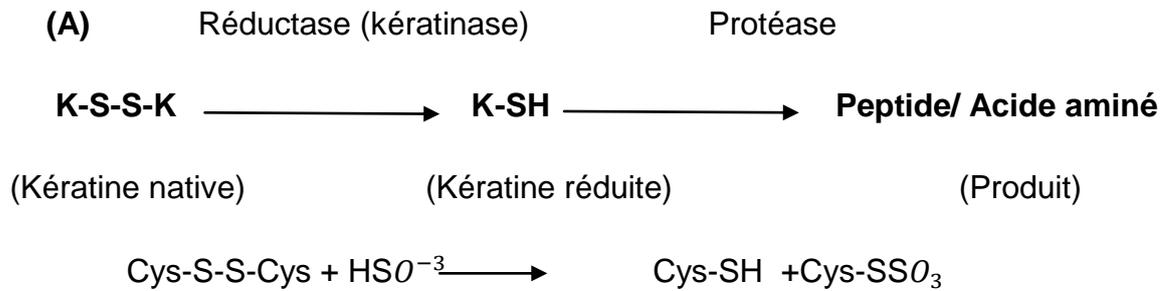


Figure 1.15 : **(A)** Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, **(B)** Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.

1.4.1. Physiologie de la production des kératinases

Les kératinases microbiennes, produites en présence d'un substrat kératinique (source de carbone et d'azote), sont majoritairement extracellulaires et inductibles. Toutefois, une minorité sont membranaires. La plus part 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 : la sulfitolysse ou réduction des ponts disulfures suivis d'une protéolyse. L'étape de la sulfitolysse ce fait soit en présence d'agents réducteurs (tels que sulfate de sodium, dithiotreitol (DTT) et mercaptoethanol) ou de disulfure réductase. 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.

1.4.2. Propriété physico-chimiques des kératinases

Les enzymes kératinolytiques sont des métallo enzymes qui appartiennent à la famille des protéases à sérine où les groupements -SH sont impliqués dans

le maintien de l'activité enzymatique. Elles ont un poids moléculaire allant de 18 à 315 kDa [116]. Leurs activités peuvent être inhibées par un certain nombre d'agents tel que PMSF et l'EDTA. Par contre, les ions métalliques comme le calcium et le zinc stabilisent l'activité enzymatique à des températures très élevées. Ces enzymes ne sont pas glycolysées et sont généralement actives à des pH neutres et alcalins (tableau 1.2) [46, 117].

Tableau 1.2 : Diversité des microorganismes kératinolytiques et propriétés biochimiques de leurs kératinases [46, 117].

Microorganisme	Classification	MM (kDa)	pH opt.	T° opt. (°C)
<i>Brevibacillus brevis</i> US575	Kératinase à sérine	29	8	40
<i>Streptomyces</i> sp. AB1	Kératinase à sérine	29	11,5	75
<i>Bacillus</i> sp. SCB-3	Métallo-kératinase	134	7	40
<i>B. cereus</i> DCUW	Kératinase à sérine	80	8,5	50
<i>B. licheniformis</i> FK14	Kératinase à sérine	35	8,5	60
<i>B. licheniformis</i> K-508	Kératinase à thiol	42	8,5	52
<i>B. licheniformis</i> MSK103	Kératinase à sérine	26	9-10	60-70
<i>B. licheniformis</i> PWD-1	Kératinase à sérine	33	7,5	50
<i>B. licheniformis</i> RPK	Kératinase à sérine	32	9	55
<i>B. pumilus</i> CRLI	Kératinase à sérine	65	8	35
<i>B. subtilis</i> KD-N2	Kératinase à sérine	30,5	8,5	55
<i>B. subtilis</i> KS-1	Kératinase à sérine	25,4	7,5	50
<i>B. subtilis</i> RM-01	Kératinase à sérine	20,1	9	45
<i>Chryseobacterium</i> sp. kr6	Métallo-kératinase	64	8,5	50
<i>Kocuria rosea</i>	Kératinase à sérine	240	10	40
<i>Microsporium canis</i>	Kératinase à sérine	315	9	55
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Métallo-kératinase	42	7,5	50
<i>Nocardiosis</i> sp. TOA-1	Kératinase à sérine	20	>12,5	60
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Kératinase à sérine	36	8	60
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Kératinase à sérine	18	6-9,5	40-70
<i>Aspergillus oryzae</i>	Métallo-kératinase	60	8	50

Les connaissances sur les protéases thermostables sont très peu approfondies et leurs modes de fonctionnements est peu connu en comparaison par des protéases alcalines conventionnelles. Les kératinases thermostables particulièrement et les enzymes thermostables en général trouvent facilement leur place dans le monde industriel en raison de leur grande activité et stabilité. La température optimale d'activité des kératinases s'étend de 30 à 80°C et sur une large gamme de pH allant de 5 à 13. Néanmoins, la kératinase de *S. pactum* DSM40530 reste stable à pH 4. Il a été observé aussi que la kératinase de *Bacillus halodurans* AH-101 est stable à pH 13. De plus, les kératinases de

Chrysosporium keratinophilum et *Fervidobacterium islandicum* AW-1 présentent des températures optimales exceptionnelles de 90 et 100°C, respectivement. Une haute thermostabilité (90 min à 100°C) a été observée pour la kératinase produite par *F. islandicum* AW-1. La stabilisation thermique de l'enzyme en présence de cations divalent comme le calcium a été aussi décrite [46, 117].

D'après la littérature, les kératinases peuvent être aussi inhibées, activées ou stabilisées par des détergents non-ioniques et des solvants. L'augmentation de l'activité en présence du SDS a été observée avec la kératinase produite par *Streptomyces albidoflavus*, tandis qu'une diminution a été démontrée avec les kératinases de deux souches *Streptomyces pactum* DSM 40530 et *Nocardiosis* sp. TOA-1. La kératinase produite par la souche *Chryseobacterium* sp. kr6 s'est révélée stable en présence du SDS. Généralement les kératinases sont stables en présence des solvants organiques, du diméthylsulfoxyde et du Triton X-100 [46, 117].

1.4.3. Etude des relations structure-fonctions des kératinases

La séquence primaire de certaines kératinases a été déterminée ou déduite à partir de ses 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 [118]. 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 [119]. 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 [120] 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 température de demi-vie 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.

1.4.4. Les substrats kératiniques

Les kératines ou substrats kératiniques sont des protéines fibreuses hautement spécialisées connues sous le nom des scléroprotéines qui appartiennent à la famille la plus complexe de filaments intermédiaires des cellules animales, en particulier les épithéliums. Les kératines sont regroupées en kératines dures (plumes, poils, sabot et ongles) et en kératines molles (peau et les cals) en fonction de leur teneur en soufre. Elles sont connues pour leur grande stabilité, insolubilité et leur résistance à la lyse protéolytique d'où leurs fonctions mécanique et protectrice [121-123].

1.4.4.1. Structure des kératines

De point de vue structural, la kératine est hélicoïdale et fibreuse, elle s'enroule autour d'autres molécules de kératines pour former des filaments intermédiaires. En outre, sa structure filamenteuse est stabilisée par le haut degré de réticulation des ponts disulfures, et des interactions hydrophobes. 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. 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. 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 papaine. 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 microfibrilles.

1.4.4.2. Classification des kératines

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

1.4.4.2. 1. La kératine α

Présente chez les mammifères notamment chez l'être humain, et elle a une structure hélicoïdale simple avec un pas à droite (figure 1.16). La résistance de cette protéine est amplifiée par l'enroulement de multiples brins hélicoïdaux en une super-hélice appelée protofibrille. L'enroulement hélicoïdal des super-enroulements possède un pas à gauche c'est-à-dire un sens opposé à celui de l'enroulement des hélices polypeptidiques individuelles. 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 (Phe, Ile, Val, Met et Ala) et par des liaisons covalentes entre les chaînes polypeptidiques à l'intérieur des "cordes" formées de plusieurs hélices et entre des cordes adjacentes.

La résistance de la kératine α à la plupart des protéases est due essentiellement à la présence d'un taux élevé d'acides aminés à base de soufre, principalement la cystéine, qui forme un pont disulfure entre les molécules, conférant sa rigidité à l'ensemble. La chevelure humaine est constituée de 14% de cystéine [121-123].

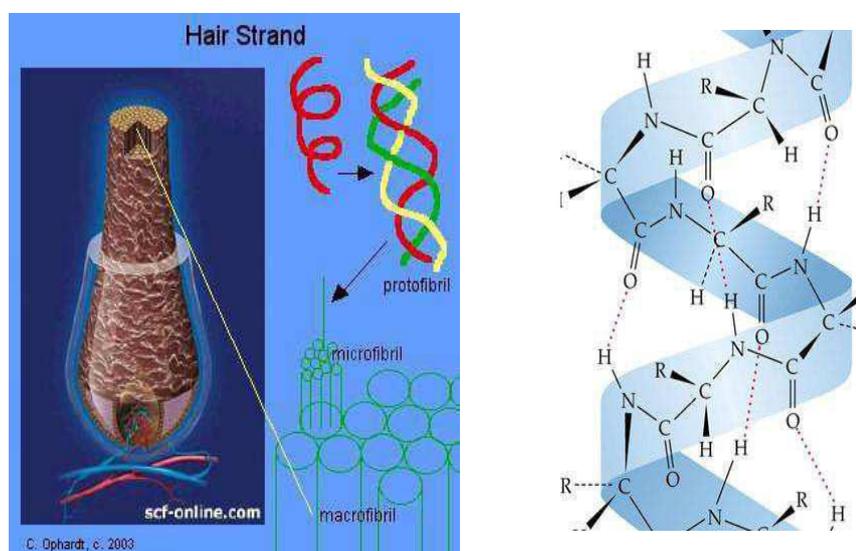


Figure 1.16 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure primaire de l' α -kératine de la chevelure humaine.

1.4.4.2. 2. La kératine β

Présente chez les reptiles et les oiseaux, c'est aussi le constituant majeur de la fibroïne de la soie et la toile d'araignée, elle est plus flexible et plus molle que la kératine α du fait de la richesse en résidus de Gly et d'Ala. L'organisation structurale est dans une conformation β et le squelette de la chaîne polypeptidique s'étend en zigzag. 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 β plissé). Des liaisons hydrogènes peuvent être soit intra- ou inter-chaînes entre les liaisons peptidiques de chaînes polypeptidiques adjacentes [124, 125].

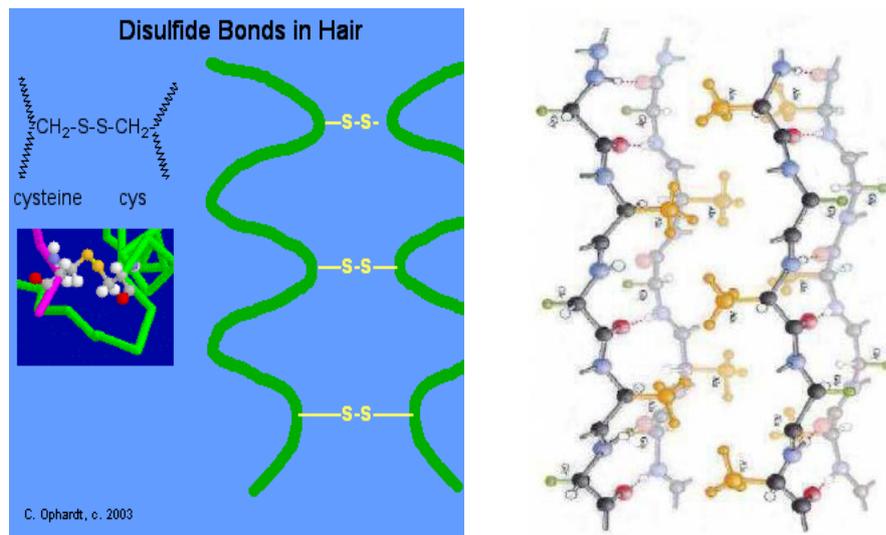


Figure 1.17 : Représentation schématique de l'organisation de la protofibrille de la structure secondaire de la **β -kératine** et des ponts disulfures (S-S) de la chevelure humaine.

1.5. Application biotechnologique

Le marché mondial des enzymes est en nette progression essentiellement du fait de l'intérêt que porte ces dernières à l'environnement et aux industries dites propres. Dans ce marché, les protéases représentent approximativement 60% [3] dont la plus grande part est représentée par les protéases alcalines [126, 127]. Les protéases alcalines bactériennes, notamment celles produites par le genre *Bacillus* représente près de 40% du marché total, trouvent de nombreuses applications dans divers secteurs industriels [1, 3]. Ce type d'enzymes est utilisé essentiellement dans les détergents pour les lessives, les tanneries pour le traitement de cuir, l'industrie pharmaceutique pour la synthèse peptidique, le

traitement des rejets, le traitement de la soie et dans l'industrie alimentaire.

1.5.1. Détergence

Le secteur des détergents est l'industrie qui manipule les plus gros volumes d'enzymes. L'intérêt de développer des enzymes pour les incorporer dans les détergents biologique est lié à la tendance de laver à plus basse température et de vouloir utiliser moins de surfactants afin de préserver l'environnement. De plus, les enzymes sont hautement efficaces conduisant à une élimination complète des taches et sont compatibles avec l'environnement tout en réduisant les durées de lavages.

1.5.1.1. Définition

La détergence, est définie comme étant un processus de nettoyage durant lequel des salissures sont séparées d'un milieu solide par mise en suspension ou en solution dans un bain de nature aqueuse au moyen d'un détergent. Ce dernier assure trois fonctions :

- La fonction d'usage principale est l'élimination de tous les types de salissures et les odeurs corporelles adsorbées sur les fibres textiles ;
- La fonction secondaire correspond à la conservation ou la restauration de la souplesse du linge et au ravivage des couleurs.
- La fonction tertiaire associée à la satisfaction du consommateur et au respect de l'environnement [128-130].

Par ailleurs, les protéases alcalines qui sont utilisées dans les détergents pour éliminer les taches protéiques (taches de sang, d'œuf, de sueur humaine...) par dégradation des protéines en peptides et en acides aminés. Elles sont aussi utilisées pour le nettoyage des lentilles de contact et les appareils dentaires. Afin de pouvoir l'utiliser en détergence, la protéase alcaline doit être active et stable à des températures et des pH élevés, et compatible avec les agents chélateurs et oxydants additionnés aux détergents.

1.5.1.2. Composition du détergent

Les ingrédients qui constituent un détergent peuvent être classés en matières actives et auxiliaires de formulation qui assurent différents rôles. Les enzymes constituent un ingrédient essentiel des détergents mais en aucun cas

suffisant. En effet, les détergents sont constitués de plusieurs éléments dont le rôle permet d'agir sur différents types de salissures et de taches. Les détergents à base de protéases permettent :

- Une meilleure performance de lavage, les lessives aux enzymes enlèveront mieux les taches organiques ;
- De réduire la consommation de l'énergie par utilisation de basses températures ;
- De minimiser le temps de lavage par une dégradation rapide des salissures ;
- De minimiser l'impact environnemental en utilisant moins de surfactants, de phosphates, des chélatants et des agents de blanchiment ;
- De garantir la blancheur du linge, de préserver l'éclat des couleurs et de lutter contre la redéposition de la saleté.

Depuis 1998, les producteurs des lessives 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 diminuer le volume des emballages, 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 [128, 131].

L'industrie des détergents représente le marché de masse par excellence (20 millions de tonnes/an mondial) et de haute technologie, l'industrie des détergents est dominée par quatre sociétés multinationales, à côté de quelques opérateurs locaux dont le marché reste national (figure 1.18) [128].

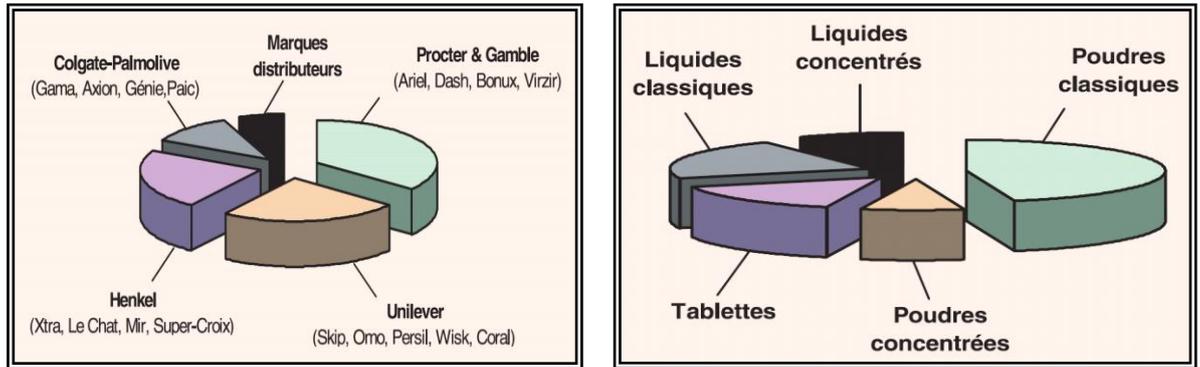


Figure 1.18 : Parts du marché européen par société en 1998 et segmentation des différentes formes de lessives : liquides (classiques, concentrés), poudres (classiques, concentrées) et tablettes.

1.5.1.3. Les enzymes détergentes

En raison du développement des lessives compactes et de l'abaissement des températures de lavage, les enzymes, d'origine bactérienne (genre *Bacillus*), sont actuellement utilisées et représentent très certainement les ingrédients de l'avenir essentiel pour la formulation des détergents de future. 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 [128]. En effet, l'utilisation des enzymes dans les produits détergents sera la clef 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 [132, 133]. Les enzymes détergentes peuvent être utilisées sous forme de poudre, granules ou liquide. Bien que leur incorporation sous forme liquide soit pratique. Les enzymes granulées se sont avérées les plus stables au cours du stockage dans les formulations détergentes solides et liquides [134].

Différents types d'enzymes permettent d'obtenir un haut niveau de performance. Parmi ces enzymes on peut citer les plus utilisées tel que :

L'Alcalase[®] de Novozymes, formée par la subtilisine A de Carlsberg est produite par une souche de *B. licheniformis*. Elle est très employée et active dans les conditions neutres ou légèrement alcalines (pH 7,0-9,0), donc parfaitement adaptée aux détergents ménagers liquides qui présentent en général un pH de 8,0 à 9,0. Sa température optimale d'action est de 60 °C, alors que son pH optimum d'activité est de 7,5 à 8,5. L'enzyme est stable après incubation 1 h à 50 °C, garde environ 45% de son activité initiale à 65 °C et s'inactive après incubation à 70 °C.

La Savinase[®], formée par la subtilisine 309, également de Novozymes agit dans des conditions plus alcalines (pH 8,0-11,0) que l'Alcalase, et elle est particulièrement efficace aux moyennes températures de lavage. Elle présente une activité optimale à 55 °C, mais elle est également efficace à basse température. Cette protéase est la plus vendue dans le monde et employée par de nombreuses grandes marques de détergents ménagers [135]. La Savinase, comme les autres protéases, est sensible aux attaques des agents de blanchiment. Depuis quelques années, Novozymes travaille à la mise au point de variantes de Savinase plus stables au blanchiment, exploitant les dernières techniques d'ingénierie des protéines pour améliorer l'enzyme.

L'**Everlase[™]** est le résultat de ces travaux qui offre une meilleure stabilité au cours du stockage en présence d'agents de blanchiment dans les détergents avec une meilleure performance au lavage.

L'Espérase[®] de Novozymes aussi, conserve son effet lavant en milieu hautement alcalin (jusqu'à pH 12,0) et à haute température. Elle est active dans les conditions qui inactivent les autres protéases. Elle est parfaitement adaptée aux détergents pour blanchisseries industrielles qui fonctionnent à des températures de 60 à 70 °C et à des pH alcalins supérieurs à 10,0. Elle s'est aussi imposée dans les détergents pour lave-vaisselle automatique car ceux-ci présentent pour la plupart un pH élevé et de nombreux programmes de lave-vaisselle fonctionnant à de hautes températures.

La Kannase[™] ou protéase (« cool ») conserve toute son efficacité à des températures de 10 à 20 °C. Cette efficacité à basse température est un élément clé de la performance des protéases dans les détergents, surtout dans certains pays de l'Asie (Japon), de l'Australie ou de l'Amérique latine où la lessive se fait à l'eau froide après une longue période de trempage.

A côté des protéases qui dégradent les taches protéiques telles que le sang, l'œuf ou le lait, de nombreux détergents de lessive contiennent d'autres enzymes, seules ou en combinaison. Les lipases (exemple : **Lipolase[®]**) agissent sur les salissures grasses en catalysant l'hydrolyse des triglycérides insolubles comme ceux du sébum, des huiles végétales ou des produits cosmétiques. Les amylases (exemple : **Termamyl[®]**) scindent les liaisons α -(1,4) des molécules

d'amidon rencontrées dans les pâtes ou les pommes de terre. Enfin, les cellulases (exemple : **Celluzyme**[®]) dégradent les micro-fibrilles qui apparaissent sur le coton au fil des lavages.

1.5.2. Tannerie

1.5.2.1. Généralité sur la tannerie

Le tannage des peaux est l'un des processus industriels aux enzymes les plus anciens. Une tannerie (ou mégisserie) est un atelier où des peaux d'animaux (bœuf, mouton, chèvre, cochon, chameau) sont traitées chimiquement et mécaniquement pour la production de cuir. Le produit utilisé dans l'opération de tannage peut avoir une origine naturelle (tanin en provenance de certaines essences forestières comme le chêne), ou bien être un produit chimique de synthèse. En voici les étapes traditionnelles : séchage, trempage, élimination des poiles et de laine, raclage et tannage.

Les protéases ont été utilisées avec succès, comme alternative aux produits chimiques, dans l'amélioration de la qualité du cuir et dans la réduction de la pollution de l'environnement. En outre, les travaux de Kantt et al. ont montré que cette approche enzymatique est préférée car elle permet l'obtention d'un cuir de qualité meilleure et à réduire la charge en solides totaux, en chlorures et en DCO (demande chimique en oxygène). Les protéases sont ainsi utilisées pour l'hydrolyse sélective du constituant non collagène de la peau et pour la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline [3, 136].

1.5.2.2. Traitement de cuir et caractéristique de l'effluent de tannerie

Le cuir, produit dérivé des activités des abattoirs, peut être transformé en produits finis très variés. Pour chaque produit fini, le procédé de tannage peut être différent, le type et la quantité de déchets produits peuvent énormément varier. Aussi, tanner le cuir sans produire d'effluents toxiques a toujours été le souci de cette industrie réputée polluante. Les produits chimiques traditionnellement utilisés pour le tannage sont des dérivés de plantes, tandis que le procédé le plus utilisé de nos jours est le tannage au chrome.

Partant de matières naturelles, l'industrie du cuir est confrontée à de fortes charges en matières sèches (MES : sable, terre, excréments et chaux), en

demande chimique en oxygène (DCO : 21 kg de O_2 /100 kg de peaux) et en demande biologique en oxygène (DBO : 8,8 kg de O_2 /100 kg de peaux). A cela, s'ajoute une pollution toxique venant du chrome et des sulfures. Il ne faut pas oublier non plus la consommation d'eau qui atteint en moyenne 35 m³ par tonne de peaux. Pour bien comprendre la provenance des polluants, il faut revenir sur le procédé ; ce qui permet d'envisager des traitements spécifiques à la source, plus efficaces qu'un traitement de tous les effluents mélangés en fin de procédé (tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Opérations de tannage et produits chimiques utilisés.

OPERATIONS	PRODUITS
Reverdissage	Chlorure de sodium
Épilage	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

1.5.2.2.1. Le reverdissage

Après abattage, les peaux sont salées avec du chlorure de sodium et séchées pour se conserver des bactéries putréfiantes, jusqu'au traitement en tannerie. La première étape du traitement est le reverdissage dans de l'eau qui élimine ce sel de conservation (300 à 350 kg de sel par tonne de peaux), une charge saline éliminée au fil de l'eau par dilution. Cette étape permet aussi d'assouplir les peaux qui ont perdu leur souplesse en séchant.

1.5.2.2.2. L'épilage pelanage ou chaulage

Pour transformer une peau en cuir, il faut éliminer la graisse et les tissus sous-cutanés, mais surtout l'épiderme et les poils (kératine). Cette étape d'épilage se déroule, dans des pelains (grands bacs rempli d'une solution de chaux), à pH basique 12,5 obtenu avec de la chaux (hydroxyde de calcium) et en présence de sulfure de sodium qui hydrolyse les protéines. La mixture obtenue est comparable

aux liqueurs noires de papeterie. Le dégraissage peut également se faire avec des solvants à base de paraffine.

1.5.2.2.3. Déchaulage

Les peaux sont ensuite déchaulées (neutralisées) pour ramener le pH de 12,5 à 8,5-8,0 par ajout de chlorure ou sulfate d'ammonium. Ce qui génère une pollution azotée, intolérable dans certaines régions.

1.5.2.2.4. Confitage et picklage

Vient ensuite le confitage, une étape peu polluante d'action enzymatique qui dégrade certaines fibres. Avant le tannage proprement dit par le chrome, il faut acidifier la peau (picklage) avec de l'acide sulfurique ou l'acide formique du pH de 8,5-8,0 à 3,0-2,8. Le picklage fait gonfler le cuir pour qu'il absorbe la liqueur tannante dans des conditions optimales en présence d'une solution contenant plus de 100 g/l de chlorure de sodium afin d'éviter l'éclatement du cuir. Ceci est en général effectué dans des foulons d'une contenance de 100 à 200 peaux à la fois.

1.5.2.2.5. Le tannage

Cette étape permet d'imprégner la peau de substances naturelles (écorces de chêne, de sumac, graisses (suif, savon, etc), ou chimiques, qui rendent la peau imputrescible et permettent son assouplissement. Le tannage s'effectue majoritairement au sulfate de chrome: environ 20 kg/t d'anhydride chromique fixé pour 50 à 90% dans la peau. Les rinçages génèrent des solutions diluées de chrome.

1.5.2.2.6. La basification

Consiste à la neutralisation du tannage avec du bicarbonate pour que la peau ne se détanne pas et on la rince abondamment.

1.5.2.2.7. Teinture-Nourriture

On sèche la peau et on la nourrit de matières grasses animales spéciales, au rôle assouplissant. Ces traitements qui donnent les caractéristiques finales (couleur, toucher, souplesse) utilisent des résines acryliques, des tanins végétaux et des polyphénols responsables de 10 à 15% de la pollution globale d'une tannerie. Les colorants ne posent plus vraiment de problèmes puisque le cadmium et la benzidine ne sont plus utilisés.

Les fortes concentrations de sels et de sulfures affectent la qualité de l'eau et peuvent lui donner un mauvais goût et une odeur désagréable. Les corps en suspension (chaux, poils, déchets d'écharnages, etc) rendent l'eau de surface turbide. Les eaux usées des tanneries déversées sur le sol auront des effets néfastes sur la productivité du sol, sa fertilité et sur la qualité des eaux souterraines. Les décharges d'effluents de tanneries non traitées dans les réseaux d'égouts provoquent un dépôt de calcaire et leurs encrassements.

Par contre, le traitement enzymatique diminue les coûts, réduit l'utilisation de produits chimiques qui ont un effet néfaste sur l'environnement et améliore la qualité du produit final qui devient plus résistant à la déchirure et présentant une teinte plus uniforme. Ce procédé biotechnologique, appliqué dans 30 à 50% de la fabrication mondiale, est employé à grande échelle en Australie, en France et au Royaume-Unie. 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 kératolytiques sont très demandées dans ce type d'industrie [3, 136].

Le procédé classique d'ébourrage (enlèvement des poils) fait appel à des produits chimiques puissants tels que le lait de chaux et le sulfure de sodium, qui dissolvent les poils et déstabilisent la structure des fibres. Actuellement les protéases alcalines (Actase P7, P10, P25 ; Enzymar SE12 et Korpon EG) permettent 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.

Lors de l'étape de chaulage, le dégraissage enzymatique, par les protéases, est le meilleur procédé recherché puisqu'il permet d'améliorer les propriétés physiques de la peau par l'hydrolyse sélective des constituants non collagèneux de la peau et la transformation des protéines non fibrillaires comme l'albumine et la globuline. De plus, il permet la dégradation des protéines interfibrillaires au niveau des peaux séchées, ce qui facilite l'adsorption de l'eau et

raccourcit l'opération de trempage [137]. La société Novozymes propose, pour l'épilage, la protéase Aquaderm qui agit à des pH allant de 8,0 à 9,0 et, pour le pèlanage, la protéase Nue qui est active à des pH de 12,0 à 13,0.

Lors de l'étape de confitage, le traitement protéolytique est souhaité. Actuellement les protéases utilisées à l'échelle industrielle sont, à titre d'exemples, Korpon EG, Actase P7, Actase P10, Actase P7, Enzymar SE12, Rinod RN, Pyrase et Confit Pancréatique [136, 138].

Classiquement, le tannage consiste à mélanger l'agent tannant à la protéine de la peau afin de créer un cuir stable, durable, imputrescible. Après le chaulage et l'écharnage (le retrait, mécanique, des graisses collées au revers de la peau), la peau est découpée dans son épaisseur de manière à produire un cuir fin au grain doux une fois tanné. Les peaux sont ensuite déchaulées afin de retirer tous les alcalins du processus de chaulage, ceci est suivi, actuellement, d'un traitement protéolytique léger qu'on appelle déchaulage. Ce dernier affine et adoucit la fleur du cuir et donne au cuir fini son élasticité et sa plasticité. Un dernier traitement avant le tannage rend la peau légèrement acide et s'effectue soit en picklant les peaux dans une solution légèrement acide et salée, soit par le processus de prêtannage approprié.

1.5.3. Industrie agroalimentaire

Les protéases bactériennes sont traditionnellement exploitées dans divers secteurs de l'industrie alimentaire. En fait, la fonction principale des protéases est l'hydrolyse protéique qui a été exploitée pour la préparation des hydrolysats protéiques de haute valeur nutritionnelle. Ces hydrolysats présentent des avantages qui découlent d'une amélioration des propriétés fonctionnelles par rapport aux protéines non-hydrolysées [139]. Ces hydrolysats protéiques sont introduits dans la formulation des produits alimentaires pour nourrissons, dans des produits thérapeutiques spécifiques des régimes alimentaires et dans la fortification des jus de fruits et des boissons non alcoolisées [140].

Une étude récente a montré que l'hydrolyse du blé par la pepsine et la chymotrypsine sous haute pression génère des hydrolysats protéiques présentant des propriétés antigéniques et des affinités aux IgE humaines réduites. L'hydrolyse enzymatique des déchets de crevettes par des protéases a été

également employée pour la récupération de la chitine [141, 142] et les hydrolysats récupérés semblent être une excellente source de rétinol, α -tocophérol et de cholestérol pouvant être incorporés comme additifs alimentaires en aquaculture.

En panification, les protéases fongiques sont responsables de l'amélioration de l'élasticité de la pâte. Les protéases acides sont très utilisées pour la fabrication des fromages, des produits de cuisson et en brasserie. Les protéases ont été également utilisées pour attendrir les viandes.

1.5.4. Industrie pharmaceutique

Les protéases sont aussi utilisées dans le développement de produits d'intérêt médical. Kudrya et Simonenko ont exploité en 1994 l'activité élastase de *B.subtilis* 316 M pour la préparation d'élastotérase qui est utilisée dans le traitement des brûlures, de plaies infectées, des furoncles et des abcès. Kim *et al* (1996) ont, quant à eux, rapporté l'utilisation de protéases alcalines de *Bacillus sp*, ayant une activité fibrinolytique, dans le traitement des thromboses [46, 116].

De plus, diverses protéases sont utilisées pour la production d'agents à usage thérapeutiques. En effet, l'administration orale des protéases Luzym et Nortase produites par *Aspergillus oryzae* permet de corriger le syndrome lié aux déficits en enzymes lytiques. De même, la collagénase clostridiale est utilisée en combinaison avec un large spectre d'antibiotiques dans le traitement des brûlures et des blessures [3].

1.5.5. Synthèse peptidique

Les enzymes protéolytiques sont fréquemment utilisées pour la synthèse de peptides, réaction inverse de l'hydrolyse, catalysée par les enzymes hydrolytiques dans des milieux non conventionnels. Comparée aux méthodes chimiques, la synthèse enzymatique de peptides offre plusieurs avantages. En effet, la réaction peut être stéréospécifique et les réactions n'exigent pas de groupement protecteurs, en plus il y a une augmentation de la solubilité des substrats non polaires ou un changement de l'équilibre thermodynamique en faveur de la synthèse par rapport à l'hydrolyse. De même, cette réaction enzymatique nécessite moins de solvants organiques ou de produits chimiques nocifs, ce qui amène à un coût de production compétitif par rapport à celui des

méthodes chimiques. Cependant, la limitation majeure dans l'utilisation des protéases pour la synthèse peptidique et la réduction importante de l'activité de l'enzyme dans les conditions anhydres. Les protéases sont cependant utilisées, avec succès, pour la synthèse de dipeptides et tripeptides. Récemment une protéase commerciale de *B. subtilis* a été utilisée en synthèse chimique en milieu non conventionnel contenant la pyridine [46, 116].

1.5.6. Traitement de la soie

Parmi les dernières exploitations de l'utilisation des protéases est le traitement de la soie, pour rendre la soie plus soyeuse. La soie est formée de fibres de fibroïne (substance protéique blanche, douce et brillante) et de fibres de séricine (substance protéique raide et terne) qu'il faut éliminer. Cette dernière qui représente 25% de la soie brute a été conventionnellement éliminée par l'utilisation de l'amidon [143]. Ce processus étant généralement coûteux, pour cette raison une méthode alternative suggérant l'utilisation des préparations enzymatiques a été mise au point. Le traitement enzymatique de la soie s'opère en plaçant les fibres dans une solution contenant l'Alcalase de Novozyme A/S à pH 8 et une température comprise entre 55 et 60°C [144].

1.5.7. Traitement des films photographiques

Les films photographiques sont formés de polyester, comme matière de base, enveloppés par une couche de gélatine et une couche d'argent (1,5 à 2% par unité de masse). La gélatine, protéine fibreuse formée par des fibrilles de collagène raccourcies par chauffage intense, n'est pas dégradée par la plus part 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 [145].

Conventionnellement, cet argent est récupéré par le traitement thermique des films, ce qui est à l'origine de la pollution et d'émanation indésirable. De plus, cette méthode ne permet malheureusement pas la récupération du polyester (matière de base du film). Néanmoins, le traitement protéolytique de la couche de gélatine permet l'extraction de l'argent délimité par cette couche de protéine et le recyclage du film de polyester. Plusieurs protéases ont été utilisées dans ce type d'application, telle que la protéase alcaline de *B. subtilis* qui permet la

décomposition de la couche de gélatine et la récupération de l'argent à la suite d'une incubation à 50-60°C pendant 30 min [145, 146].

1.5.8. 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 [147-149]. L'utilisation des protéases kératinolytiques dans le traitement des déchets de volailles [150] et comme agent de nettoyage des conduites bouchées a été rapportée [151]. Un produit contenant des enzymes protéolytiques de *B. subtilus*, *B. amyloliquefaciens* et *Streptomyces* sp. et des agents réducteurs (Thiaglycolate) permettant de dégrader les cheveux susceptibles d'obstruer les canalisations, a été décrit par Hmidet *et al* [152].

1.5.9. Autres applications des protéases

De plus, certaines protéases sont utilisées en :

- Panification pour l'amélioration de l'élasticité de la pâte (les protéases fongiques) ;
- Biscuiterie pour l'amélioration des qualités organoleptiques ;
- Charcuterie pour l'amélioration de la qualité de la viande ;
- Industrie laitière et fromagère pour la coagulation des protéines du lait et son aromatisation par action de la présure ;
- Brasserie pour la prévention du trouble au froid de la bière par action de la papaïne ;
- Préparation des hydrolysats de protéines à usage microbiologique telle que peptone, tryptone...

➤ En plus, la spécificité de clivage de la protéase SAP DZ vis-à-vis de divers esters et substrats synthétiques a été également étudiée. Cette étude montre que lorsqu'on trouve à la position P1 un résidu de Tyr ou de Phe, la protéase SAPDZ montre une activité estérase sur BTEE (100%) et une activité amidase sur ATEE (95%), qui sont des substrats spécifiques des chymotrypsine-like protéases [6]. Cependant, lorsqu'on trouve à la position P1 un résidu d'Arg, la SAPDZ ne montre ni une activité estérase sur BAEE, ni une activité amidase sur BAPNA, qui sont des substrats spécifiques des trypsine-like protéases [6]. Ceci n'est pas étonnant car le profil d'inhibition de la SAPDZ montre bien qu'elle n'est pas sensible aux inhibiteurs spécifiques des chymotrypsines (TPCK) et des trypsines (SBTI et le TLCK).

1.6. Conclusion

La technologie enzymatique traverse actuellement une phase de maturation et d'évolution. La maturation est montrée par le développement de la théorie concernant la façon dont les enzymes fonctionnent et comment cela est lié à leur structure primaire par la formation et la configuration de leur structure tridimensionnelle. L'évolution est marquée par la gamme d'applications enzymatiques dans différents domaines.

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

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

Chapitre 2

MATERIEL ET METHODES

La présente étude s'articule autour de plusieurs points :

- Isolement et la purification ainsi que le criblage des souches bactériennes productrices de protéases alcalines les plus actives ;
- Identification de la souche la plus active et l'optimisation des conditions de productions et de croissance;
- Extraction de l'enzyme et sa purification à homogénéité ainsi que sa caractérisation biochimique et moléculaire;
- Mise en évidence des propriétés de l'enzyme dans des applications industrielles.

La réalisation de cette étude a fait appel à plusieurs organismes:

- Les différents laboratoires (contrôles et analyses microbiologique, physico-chimique, biochimie, traitement des eaux et production des corps gras) de l'institut national spécialisé de la formation professionnelle en Industrie agroalimentaire-Abou Baker Belkayed de Blida;
- Les laboratoires de microbiologie et fermentation de l'unité SAIDAL El Harrach;
- Les différents laboratoires (stérilité, microbiologie, physicochimie et fermentation) du complexe ANTIBIOTICAL SAIDAL de Médéa ;
- Les laboratoires du Hall technologique de l'université Yahia Farès de Médéa;
- L'abattoir communal de la wilaya de Blida;
- L'abattoir municipal de Sfax;
- Le Centre de Biotechnologie de Sfax.

2.1. Sites d'échantillonnage

Les effluents de l'abattoir de la wilaya de Blida sont utilisés au cours de ce travail afin d'isoler les bactéries productrices des protéases alcalines. L'isolement des bactéries est réalisé à partir de plusieurs prélèvements. Les échantillons sont récupérés dans des flacons stériles et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse.

2.2. Matériel

2.2.1. Matériel biologique

2.2.2.1. Souche de « *Bacillus circulans* DZ100 »

La préculture de la souche *Bacillus circulans* DZ100 sur milieu optimisé de protéases est effectuée dans un Erlenmeyer de 250 ml avec un volume utile de 25 ml. L'incubation de la préculture se fait pendant une nuit à 37 °C et sous agitation de 250 rpm. Les cultures de la souche *Bacillus circulans* DZ100 sont réalisées dans des Erlenmeyers de 500 ml avec un volume utile de 50 ml inoculées par un volume approprié en ml de la préculture ayant une valeur de DO initial de 0,1 à 600 nm. L'incubation de la culture se fait pendant 48 h à une température optimisée de 37 °C et sous agitation de 250 rpm.

2.2.1.2. Souche de « *Streptomyces* » (souche de référence)

La souche d'*Actinomycète* de référence *Streptomyces* sp. AB1 a été isolée à partir d'un échantillon du sol de la plaine de la Mitidja. Par ailleurs, elle a été identifiée en utilisant des approches de la taxonomie classique (Galerie API CH 50) [153] et complétée par la technique de biologie moléculaire (la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal, ARNr 16S) [110]. Cette souche a été retenue pour sa capacité de produire une protéinase alcaline prometteuse d'intérêt industriel. Pour cela, elle est utilisée en tant que souche de criblage (référence) lors de notre recherche.

2.2.1.3. Souches de « *Escherichia coli* »

Deux souches d'*Escherichia coli* (DH5 α et BL21) sont utilisées lors des clonages, dont les génotypes sont les suivants :

- **DH5 α** : F⁻ supE44 Φ 80 δ lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 endA1 recA1 hsdR17 (*r_k⁻, m_k⁺*) deoR thi-1 λ ⁻ gyrA96 relA1. Cette souche porte le gène *lacZ* Δ M15 qui permet l' α -complémentation, permettant ainsi la sélection des colonies recombinantes par criblage phénotypique bleu/blanc, sur milieu contenant du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl - β -D-galactoside (X-gal) et d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG).
- **BL21** : *E. coli* BF⁻dcm ompT hsdS (*rB⁻ mB⁻*) gal λ (DE3). Elle est utilisée comme hôte pour la surexpression de l'activité protéasique puisqu'elle porte une copie

chromosomique du gène d'une ARN polymérase bactérienne.

2.2.1.4. Conservation

Pour la conservation, les souches sont mises en culture dans un milieu liquide approprié, additionné ou pas d'antibiotique. La suspension cellulaire est mélangée avec du glycérol stérile à une concentration finale de 20%. Elle est répartie dans des cryotubes puis conservée à -80 °C.

2.2.2. Produits chimiques et réactifs utilisés

Les produits utilisés pour la préparation des solutions et des tampons lors de la réalisation de ce travail sont fournis par Sigma, Fluka, Prolabo, Bio-Rad, Amersham et Pharmacia.

2.2.2.1. Milieux de culture

Tous les milieux préparés dans le but de la réalisation de cette étude sont stérilisés par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

2.2.2.1.1. Milieu LB liquide

Le milieu Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préculture des souches bactériennes. Il est composé de 10 g peptone; 5 g NaCl ; 5 g extrait de levure avant la stérilisation.

2.2.2.1.2. Milieu LB solide

Il est obtenu après l'addition de 15 g d'agar au milieu LB liquide. Il est souvent utilisé pour la conservation des souches bactériennes.

2.2.2.1.3. Gélose nutritive au lait (GNL)

C'est un milieu solide utilisé pour mettre en évidence le pouvoir protéolytique des souches bactériennes en hydrolysant la caséine du lait introduite dans le milieu. Il se compose de: 5 g peptone; 3 g extrait de levure et 15 g d'agar dans 750 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7 avec du NaOH. Après stérilisation et refroidissement jusqu'à une température de 60 °C, 250 ml du lait écrémé sont ajoutés. Après homogénéisation du milieu, il est coulé dans des boîtes de Pétri.

Ce milieu est utilisé pour l'isolement et le criblage des souches productrices de protéases. L'activité protéolytique se manifeste par la diffusion d'un halo transparent dans le milieu qu'indique la sécrétion des protéases par les souches

et l'hydrolyse des protéines du lait (caséines).

2.2.2.1.4. Milieu solide d'isolement de bactéries kératinolytiques (GNFP)

Ce milieu est composé (en g/l) de : farine de plumes, 5 ; peptone de soja, 2; extrait de levure, 3 et 20 g d'agar-agar dans 1000 ml d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH à une valeur désirée. Après stérilisation et refroidissement, le milieu est homogénéisé puis coulé dans des boîtes de Pétri. Le milieu GNFP est utilisé pour l'isolement et le criblage des clones producteurs des kératinases. La technique de diffusion dans l'agar est mise en œuvre pour la détection de l'activité kératinolytique. En effet c'est un test semi-qualitatif qui repose sur le fait que les kératinases, secrétées par les souches kératinolytiques, diffusent dans le milieu gélosé environnant et hydrolysent ainsi les kératines. L'activité enzymatique se traduit par l'apparition d'halo transparent autour des colonies produisant des kératinases [110, 113, 114, 154].

2.2.2.1.5. Milieu de production des protéases

Les protéases alcalines sont produites sur milieu liquide dont la composition est la suivante: 15 g Caséine ; 5 g Peptone; 5 g CaCl₂; 1 g K₂HPO₄ ; 1 g KH₂PO₄ ; 1 g MgSO₄, 7H₂O ; 3 g NaCl dans un litre d'eau distillée. Le pH du milieu est ajusté à 10 avec du NaOH (0.1 N) avant la stérilisation. La gélatine est stérilisée séparément et elle est rajoutée au milieu après refroidissement.

Ce même milieu est amélioré pour la production des protéases en ajoutant 1% (v/v) d'oligoéléments (0.4 g ZnCl₂ ; 2 g FeSO₄ 7H₂O ; 0.065 g H₃BO₃ ; 0.135 g MoNa₂O₄.2H₂O qui sont solubilisés dans l'eau qsp 1 l) [155].

2.2.2.2. Enzymes

2.2.2.2.1. Enzymes de restriction

Elles sont utilisées selon les instructions du fournisseur.

2.2.2.2.2. ARNase pancréatique (ARNase)

Elle est solubilisée dans l'eau distillée à une concentration de 10 mg/ml puis traitée thermiquement pendant 15 min à 100 °C. La solution refroidie est répartie en aliquotes et conservée à -20 °C.

2.2.2.2.3. Protéinase K

La protéinase K est dissoute dans de l'eau distillée stérile à raison de 5 mg/ml puis elle est répartie en aliquotes et gardé à -20 °C.

2.2.2.3. Marqueurs de taille et de masse moléculaire

Les marqueurs de taille pour ADN utilisés sont préparés par une simple digestion de l'ADN du phage Lambda (λ) par les enzymes de restriction *HindIII* ou *HincII*. On a utilisé également le marqueur de taille 1 kbp DNA Ladder. En plus différents marqueurs de masse moléculaires sont utilisés (Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431).

2.2.2.4. Vecteurs

2.2.2.4.1. Vecteurs de clonage

- **pCR-Blunt** (3512 pb) : Ce plasmide porte le gène *lacZ α* codant pour la β -galactosidase, permettant l' α -complémentation et donc la sélection des clones par criblage bleu/blanc. Il est également porteur des gènes de résistance à la kanamycine et à la zéocine, deux marqueurs de sélection, permettant ainsi une sélection positive des plasmides recombinants. Le gène létal *ccdB* (« control of cell death ») est incorporé dans le **site multiple de clonage** ou (« polylinker ») du vecteur et est fusionné au fragment *lacZ α* . Comme l'expression de la protéine CcdB est toxique, le vecteur pCR-Blunt empêche la croissance des bactéries à moins que l'expression de la protéine de fusion LacZ α -CcdB ne soit interrompue du fait de l'insertion d'une séquence d'ADN en son sein.

- **pCR 2.1** (3.9 kpb) : Ce vecteur porte, également, un gène *lacZ* et deux gènes de résistance à l'ampicilline et à la kanamycine. Il contient une désoxy-Thymidine (dTTP) à chaque extrémité 3' et permet ainsi le clonage des fragments amplifiés par l'ADN polymérase de *Thermus aquaticus* (*Taq*[®]) qui génère des produits PCR portant une seule désoxy-Adénine (dATP) à chaque extrémité 3'. Les fragments générés par l'ADN polymérase de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*, Appligene) peuvent également être clonés dans ce vecteur après ajout par PCR de dATP. Enfin, il permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces T3 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage, permettant le séquençage de la séquence insérée.

Les cartes de restriction de ces deux vecteurs sont représentées ci-dessous (figure 2.1).

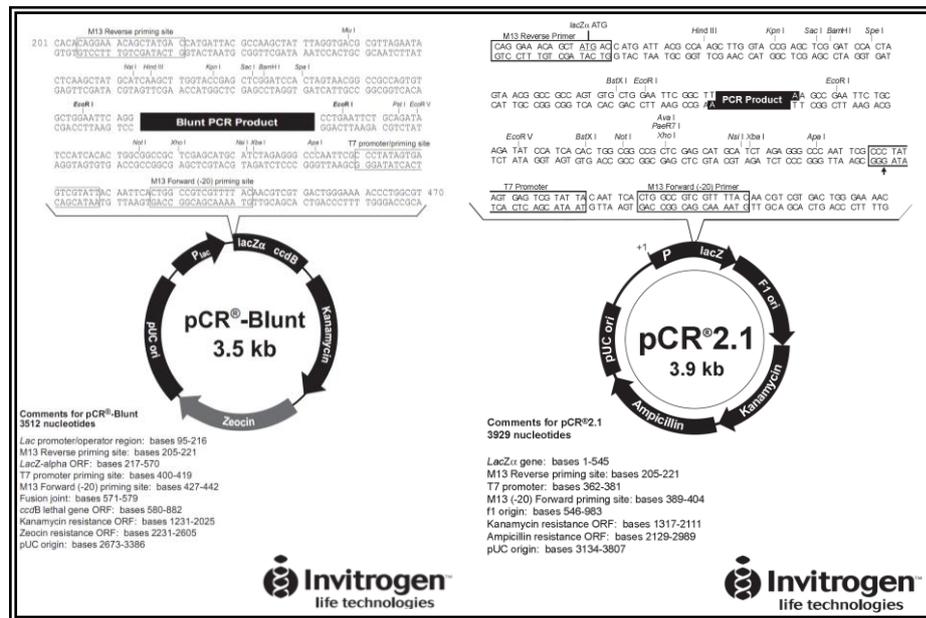


Figure 2.1 : Cartes de restriction des vecteurs de clonages pCR-Blunt et pCR 2.1.

- **pGEM-T Easy (3015 pb)** : Ce vecteur porte un gène de résistance à l'ampicilline en plus du gène *lacZ*. Il diffère du vecteur pCR 2.1 par la présence d'une dTTP à chaque extrémité 3' lui permettant le clonage des fragments PCR ayant un dATP à l'extrémité 3'. Ceci lui permet l'utilisation des amorces universelles et inverses M13 ainsi que les amorces SP6 et T7 s'hybridant de part et d'autre du site de clonage ce qui permet le séquençage de la séquence insérée (figure 2.2).

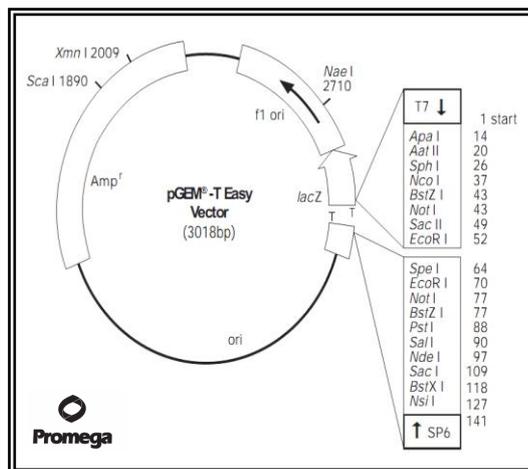


Figure II.2 : Carte de restriction du vecteur de séquence pGEM-T Easy

2.2.2.4.2. Vecteurs d'expressions

Nous avons utilisé deux vecteurs commerciaux ; pUT57, fournis grassement par le Professeur Gérard TIRABY de l'Université de Paul Sabatier, (Toulouse-France, figure 2.3A) et pTrc99A (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède, figure 2.3B).

➤ **pUT57** (2900 pb) : C'est un vecteur ayant un nombre de copie élevé, portant le gène de résistance à l'ampicilline, seul marqueur de sélection et un **site multiple de clonage**. C'est un plasmide dérivé du plasmide pUC19 il contient une partie du plasmide pBR322 et du bactériophage M13mp 19, il est à nombre de copies élevé et il porte aussi le gène *lacZ*. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur assez fort (promoteur Lac) et elle est inducible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lacZ*.

➤ **pTrc99A** (4176 pb) : C'est un vecteur de surexpression renfermant une résistance à l'ampicilline. L'expression dans ce vecteur est sous le contrôle d'un promoteur fort (promoteur Taq ou Trc) et elle est inducible par l'IPTG grâce à la présence du gène *lac I* [156-158].

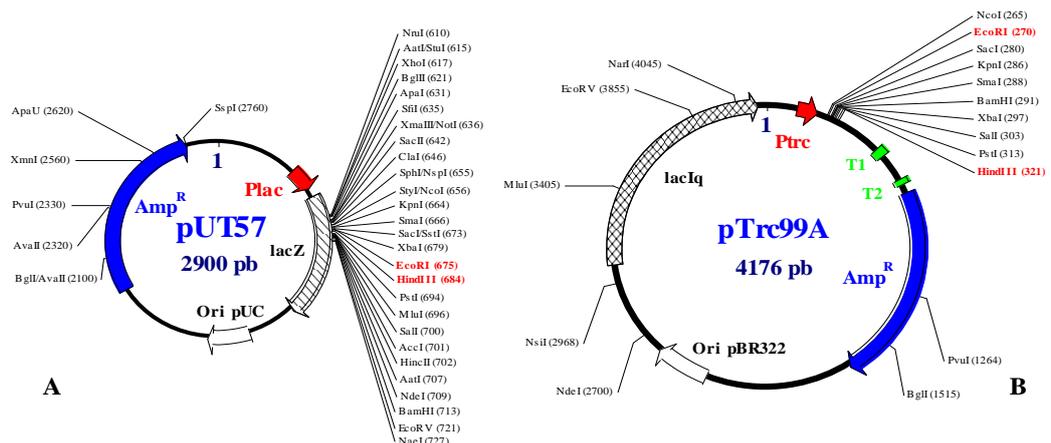


Figure 2.3 : Cartes de restriction des vecteurs d'expression chez *E. coli* ; pUT57(A) et ptrc99A (B).

2.2.2.5. Les plasmides

Les plasmides générés au cours de ce travail sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 2.1 : Plasmides générés (nommés pDZ).

Insert	Vecteurs de clonage			Vecteurs d'expression	
	pCR Blunt	pCR 2.1	pGME-T Easy	pUT-57	pTrc99A
Gène de l'ARNr 16S			pDZ-16S		
Gène <i>sapDZ</i> (sauvage)	pABT0				
Gène <i>sapDZ</i> (recombinant)				pABT1	
Gène <i>sapDZ</i> (recombinant)					pABT2

2.2.2.6. Oligonucléotides

Les oligonucléotides utilisés dans cette étude sont représentés dans le tableau 2.2. Ces amorces sont utilisées pour l'identification de la souche retenue, les amplifications d'ADN génomique (ADNg) et d'ADN plasmidique (ADNp) ainsi que pour le séquençage d'ADN.

Les séquences des différents oligonucléotides utilisés dans cette étude : pour les amplifications du gène de l'ARNr 16S (externes : Oligo D-S73 et Oligo R-S74 et internes : Oligo D-S156 et Oligo R-S157) et du gène *sapDZ* sauvage (Oligos F-TBA, R-TBA, TBAe1, TBAe2, TBAi1 et TBAi2).

Tableau 2.2: Les séquences des différents oligonucléotides utilisés.

Oligonucléotide	Séquences d'oligonucléotide	Taille (pb)	TM (°C)
Oligo D-S73	^{5'} AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ^{3'}	20	48
Oligo R-S74	^{5'} AAGGAGGTGATCCAAGCC ^{3'}	18	51
Oligo D-S156	^{5'} ATTCCACGTGTAGCGGTG ^{3'}	18	52
Oligo R-S157	^{5'} ATCTCACGACACGAGCTG ^{3'}	18	52
Oligo F-TBA	^{5'} GAAAAAGGGATGTGGAATGTGCG ^{3'}	19	52
Oligo R-TBA	^{5'} CAAGCGGCTTCTAACTAATCC ^{3'}	20	56
Oligo TBAe1	^{5'} GAAAAAGGGATGTGGAATG ^{3'}	19	54
Oligo TBAe2	^{5'} GTCACACTTATTTTAGTTAG ^{3'}	20	52
Oligo TBAi1	^{5'} CATGACCCTAGCATTGCTTA ^{3'}	20	58
Oligo TBAi2	^{5'} TAGAATGAGTCACCAAGCGGT ^{3'}	21	56

2.2.2.7. Solutions

Les solutions utilisées au cours de ce travail sont :

- Solution I : 45 ml glucose 20%, 25 ml Tris-HCl 1 M et 20 ml EDTA 0,5 M à

pH 8,0 ;

- Solution II : NaOH 0,2 N et 1% SDS (p/v) ;

- Solution III : d'acétate de potassium 3 M et d'acide acétique glacial 2 M à pH 4,8 ;

- Solution d'acide trichloracétique TCA (20%) ;

- Réactif de Biorad pour le dosage des protéines solubles ;

- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 10% ;

- Solution d'acrylamide (29,2%)/bisacrylamide (0,8%) ;

- Solution de coloration du gel, de bleu de Coomassie : 0,25 g bleu de Coomassie, 45% éthanol, 45% eau et 10% acide acétique glacial ;

- Solution de décoloration : éthanol 20%, eau 70% et acide acétique 10%.

2.2.2.8. Tampons

- Tampon A : tampon Tris-HCl 100 mM, additionné avec 5 mM CaCl_2 et 10 mM NaCl à pH 5,5.

- Tampon B : tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 10 mM NaCl et 0,005% Triton X-100.

- Tampon C : tampon A contenant 5 mM CaCl_2 et 25 mM NaCl à pH 7,5.

- Tampon glycine 100 mM ;

- Tampon I: 50 mM glucose anhydre, 25 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;

- Tampon II: 10 mM Tris-base, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA et 1% du dodécyl sulfate de sodium (SDS) à pH 8,0 ;

- TE 1 : 100 mM Tris-base et 10 mM EDTA à pH 8,0 ;

- TAE 1 : 40 mM Tris-acétate et 5 mM EDTA ;

- TBE 1 : 90 mM Tris-borate et 20 mM EDTA ;

- Tampon CaCl_2 -MOPS-glucose : 100 mM CaCl_2 ; 10 mM MOPS et 0,5% glucose ;

- Tampon acétate 100 mM ;

- Tampon Tris HCl 100 mM ;
- Tampon de dépôt : Tris-HCl 10 mM pH 8 ; EDTA 1mM ; SDS 2,5% ; β -mercaptoéthanol 5% ; Glycérol 10% et Bleu de bromophénol 0,05% ;
- Tampon de migration : Tris-HCl 25 mM ; Glycine 14,4 g/l et SDS 1% ;
- Tampon CaCl_2 -MOPS-glucose : 100 mM CaCl_2 , 10 mM MOPS et 0,5% glucose.

2.3. Méthodes

2.3.1. Technique d'isolement et d'incubation

La méthode des prélèvements des échantillons utilisée est celle des suspensions-dilutions et d'isolement par étalement sur les milieux GNL et GNFP coulés en boîtes de Pétri stériles [113, 154].

La suspension-mère est préparée par addition de 1 ml d'effluent prélevé d'une façon homogène dans 9 ml d'eau distillée stérile (dilution 10^{-1}). Après homogénéisation vigoureuse par vortex et traitement thermique à 80 °C pendant 30 min afin d'éliminer tout type de végétales, cinq autres dilutions (10^{-2} jusqu'à 10^{-6}) sont préparées par dilution 1/10. Un volume de 0,1 ml est étalé sur les milieux d'isollements (GNL et GNFP) et trois répétitions sont effectuées pour chacune des dilutions. Les boîtesensemencées sont mises en incubation en aérobie et anaérobie à différentes températures (30, 37 et 45 °C) dans l'étuve pendant 24, 48 et 72 h.

2.3.2. Choix des isolats

Après incubation, les boîtes de Pétriensemencées sont examinées tous les 24 h. Les colonies qui sont entourées par un halo transparent sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile, puis dispersées dans le milieu de production des protéases alcalines pour être purifiées. Ce critère de sélection est un test semi-qualitatif qui correspond à la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie. Le diamètre d'halo est proportionnel à la quantité d'enzymes libérées par la bactérie. Les rapports des diamètres du halo par rapport aux diamètres des colonies permettent un

classement préliminaire des souches isolées. L'étalement sur GNL a permis de sélectionner les bactéries productrices des protéases. Le repiquage de ces souches sur GNFP montre que certaines souches peuvent dégrader les plumes et croître sur ce milieu après incubation à différentes températures pendant 24, 48 et 72 h.

2.3.3. Purification et conservation des souches

Les colonies sélectionnées sont purifiées par stries sur milieu GNL et GNFP. Les isolats purs, codés, sont ensemencés sur le même milieu LB coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés pendant 24 h puis conservés à +4 °C. Les souches les plus actives sont aussi conservées à long terme dans des cryo-tubes contenant le glycérol à 20% puis conservées à -80 °C.

2.3.4. Identification phénotypique de la souche sélectionnée

L'identification de la souche a été accomplie par des études morphologiques et physiologiques basées sur des observations microscopiques et des tests biochimiques [159-161].

2.3.4.1. Etude morphologique et observation microscopique

2.3.4.1.1. Examen à l'état frais

L'observation microscopique à l'état frais d'une goutte de culture permet de déterminer la morphologie et la mobilité de la bactérie. Le montage se fait à l'aide d'une pipette Pasteur ou l'anse nichrome sur une lame propre, une goutte de prélèvement, de culture en milieu liquide ou d'une suspension réalisée dans de l'eau distillée à partir des colonies ayant poussées sur un milieu solide. Ensuite la préparation est recouverte d'une lamelle. L'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique (G X 100). Cet examen met en évidence la présence des bactéries, la forme, le mode de groupement et la mobilité.

2.3.4.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste DANOIS HANS CHRISTIAN GRAM qui a mis au point le protocole en 1884. Elle permet la mise en évidence des propriétés de la paroi bactérienne afin de les utiliser pour la distinction et la classification. Ceci permet de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu, tant sur le type que sur la

forme [162, 163].

Le test est réalisé par étalement sur une lame en verre propre d'une suspension bactérienne qui est séchée et fixée par une flamme. La lame est recouverte pendant une minute du réactif N°1 (2% cristal violet, 20% alcool éthylique et 0,8% oxalate d'ammonium) puis lavée doucement à l'eau. La lame est ensuite recouverte par du réactif N°2 (1,3% iode, 2% iodure de potassium et 10% polyvinyl pyrrolidone) pendant une minute et de même lavée doucement à l'eau. On ajoute par la suite du réactif N°3 (50% alcool absolue et 50% acétone) pour la décoloration. On recouvre enfin la lame par le réactif N°4 (0,25% safranine et 10% alcool) pendant une minute et on réalise un lavage doux avant séchage, puis on observe au microscope optique (Objectif G X100 à l'huile d'immersion).

La présence des spores peut être mise directement en évidence par examen microscopique d'un frottis coloré par la méthode de Gram. Elles se présentent sous forme de particules endocellulaires sphériques ou ovales non colorées et réfringentes. Dans des cas douteux, une coloration spécifique par le vert de malachite peut être réalisée.

2.3.4.2. Études physiologiques

Cette étude repose sur les tests de différenciation : catalase, oxydase, indole, mannitol-mobilité et le type respiratoire.

Les tests de différenciation sont faits selon les protocoles standards couramment employés en microbiologie (Annexe 1).

2.3.4.3. Études biochimiques

L'identification de la souche est complétée par des tests biochimiques moyennant des approches de la taxonomie classique : Galerie API. Il s'agit de la galerie biochimique miniaturisée comportant des capsules en nombre variable.

Suite aux résultats des tests de l'identification phénotypiques des souches qui a permis son rattachement au genre *Bacillus*, nous avons choisi la galerie adéquate à savoir la galerie API CH50 (API CH50 EHB-E₁ Medium). Cette galerie permet d'étudier le métabolisme de 49 substrats de carbohydrates et leurs dérivés par bactéries. Le microorganisme à tester est mis en suspension dans le milieu puis inoculé dans chaque micro-tube de galerie. Pendant l'incubation, le

catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur du pH. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique de la souche et servant à son identification à l'aide d'un référentiel. La lecture s'effectue après incubation à la température adéquate pendant 20 h puis 48 h. Les profils biochimiques ou numériques sont interprétés à l'aide de tableaux, de catalogues analytiques ou logiciels.

2.3.4.4. Identification génotypique par la technique ARN 16S

La plupart des techniques d'identification génotypique sont décrites dans le livre de « Molecular Cloning » [159]. L'étude moléculaire a été achevée suite à l'amplification par PCR du gène d'ARNr 16S en utilisant l'ADNg de la souche sélectionnée et des amorces nucléotidiques ; Oligo D-73 et Oligo R-74 dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène, respectivement de 8 à 27 et de 1541 à 1525 de l'opéron d'ARNr chez *E. coli* (Annexe 2). Les fragments PCR de tailles attendues sont purifiés puis clonés et leurs séquences nucléotidiques sont déterminées (tableau 2.2).

2.3.5. Cinétique de croissance

Les pré-cultures des isolats sont effectuées sur milieu LB dans des Erlenmeyers de 500 ml avec un volume utile de 50 ml. L'incubation se fait pendant 18 h aux températures correspondantes et sous une agitation de 250 rpm.

Les cultures de ces isolats sont réalisées sur le milieu précité, inoculés par 1 ml de la pré-culture à 3 unités DO_{600} . L'incubation se fait pendant 72 h à la température adéquate et sous agitation de 250 rpm. Des prélèvements réguliers de 2 ml sont effectués.

Les activités protéolytiques et la croissance bactérienne (DO_{600}) sont évaluées en fonction du temps afin de déterminer le temps de la production maximale de protéase.

2.3.6. Dosage de l'activité enzymatique

Il existe plusieurs techniques permettant d'analyser la réaction d'hydrolyse d'un substrat protéique par les protéases :

2.3.6.1. L'activité protéolytique (caséinolytique)

La plus connue est l'hydrolyse enzymatique de la caséine permettant la

libération d'acides aminés aromatiques détectés sous UV à 280 nm. L'activité est évaluée comme étant la quantité d'équivalent Tyrosine libérée par unité de temps. L'activité protéolytique a été mesurée dans le surnageant de la culture obtenue après centrifugation pendant 15 minutes à 5000 rpm, en déterminant la concentration des peptides solubles dans l'acide trichloro-acétique (TCA) à la concentration finale de 6,6%. L'activité protéolytique est estimée selon la méthode de Zarái Jaouadi *et al.* [164].

2.3.6.2. Méthode de Kembhavi

Elle est évaluée selon le protocole suivant [165]:

- ✓ Mélanger 0,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM CaCl₂ avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- ✓ Incuber, la réaction enzymatique, à une température appropriée pendant 15 min ;
- ✓ Arrêter la réaction par addition de 0,5 ml de TCA à 20% (p/v) (le TCA précipite la caséine non hydrolysée) ;
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 15 min ;
- ✓ Centrifuger le milieu réactionnel à 15000 rpm pendant 15 min ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 280 nm (correspond au maximum d'absorbance des Aa).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (Annexe 3), de 0 à 100 µg/ml, de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions à partir de laquelle nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une DO_{280 nm} de 0,0055. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité protéolytique (U/ml)} = \frac{DO * D * d}{t * 0.0055} \quad 2.1$$

Avec

DO: densité optique ;

D: correspond à la dilution de l'enzyme ;

d: la dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel;

t : temps de la réaction en minute.

2.3.6.3. Méthode de Lorwy-Folin

L'activité protéolytique est mesurée dans le surnageant, en déterminant la concentration des peptides solubles dans le TCA à la concentration finale de 6,6% [166]. L'activité protéolytique est estimée selon le protocole suivant :

- ✓ Mélanger 2,5 ml d'une solution de caséine (1% p/v) dans un tampon désiré en présence de 2 mM CaCl₂ avec 0,5 ml de la solution enzymatique préalablement diluée.
- ✓ Incuber à une température appropriée pendant 20 min.
- ✓ Arrêter la réaction par addition de 2,5 ml de solution TCA (0,11 M TCA + 0,22 M acétate de sodium + 0,33 M acide acétique).
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Centrifuger le milieu réactionnel à 10000 × g pendant 15 min.
- ✓ 0,5 ml d'une solution claire (après filtration du surnageant sur papier Whatman no. 3).
- ✓ Ajouter 2,5 ml d'une solution 0,5 M Na₂CO₃.
- ✓ Ajouter 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (50%).
- ✓ Incuber à température ambiante pendant 30 min.
- ✓ Mesurer l'absorbance à 660 nm (correspond au maximum d'absorbance du réactif de folin).

Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans ces conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage de 0 à 100 µg/ml de tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous avons déduit que 1 µg/ml de tyrosine correspond à une DO_{660 nm} de 0,0075. L'activité protéasique (U/ml) est déduite à partir de l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité (U/ml)} = \frac{DO * V_{ET} * d}{t * V_E * 0.0075} \quad 2.2$$

Avec :

V_{ET} : Correspond au volume total de l'enzyme.

V_E : Correspond au volume réactionnel de l'enzyme.

d : dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;

t : temps de la réaction en minutes.

2.3.6.4. Dosage de l'activité kératinolytique sur protéine modifiée

L'activité kératinolytique a été mesurée dans le surnageant de culture obtenue après centrifugation de 20 min à 10000 rpm en utilisant la kératine-azure comme substrat.

L'activité kératinolytique est estimée selon le protocole de Jaouadi *et al.* [110] qui consiste à :

- ✓ Mélanger 1ml du surnageant, 1 ml du tampon KCl-NaOH (100 mM) additionné de 5 Mm $CaCl_2$ à pH 12.5 et 10 mg de kératine-azure finement découpée en raison de 10 g/l ;
- ✓ Incuber 20 min à 85°C sous une agitation de 250 rpm ;
- ✓ Arrêter la réaction par un bain de glace pendant 5 min ;
- ✓ Centrifuger le milieu réactionnel à 10000 rpm pendant 20 min ;
- ✓ Mesurer l'absorbance à 440 nm.

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

2.3.6.5. Dosage de l'activité protéasique sur peptide synthétique

L'activité protéolytique sur peptide synthétique (ex : *N*-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-*p*-nitroanilide ou AAPF) 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) [167].

L'activité protéolytique est estimée 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 de distinction molaire de $10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 410 nm.

- ✓ Mélanger 600 µl d'une solution de AAPF (2 mM) dans un tampon Glycine-NAOH 100 mM à pH 10 contenant 2 mM Ca²⁺ avec 600 µl de la solution enzymatique préalablement diluée ;
- ✓ Incuber 10 min à 50 °C ;
- ✓ Arrêter la réaction par addition de 600 µl 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.

2.3.6.6. Dosage de groupes sulfhydryle (SH-libre)

La libération des groupes sulfhydryle (SH-libre) dans le milieu de culture de la souche DZ100 sur divers substrats kératinolytiques (plumes et cheveux) a été estimée par un dosage spectrophotométrique à 412 nm en utilisant le 5,5'-dithio-bis (acide 2-nitro) (réactif DTNB Ellman) selon la méthode de Ellman [168].

2.3.7. Technique d'extraction et de manipulation de l'ADN

2.3.7.1. Extraction de l'ADN chromosomique à partir de la souche sélectionnée (DZ100)

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant une nuit dans 500 ml de milieu approprié. Après cette incubation de 24 h, nous centrifugeons dans un tube NALGENE pendant 10 min à 8000 × g. Le culot cellulaire est lavé avec 10 ml de tampon I. Les cellules sont alors lysées dans 20 ml de tampon I contenant 5 mg/ml de lysozyme et sont incubées une heure à 37 °C. La solution est alors centrifugée une autre fois à 8000 × g pendant 15 min à 4 °C et le culot cellulaire est resuspendu dans 30 ml de tampon II. On ajoute au surnageant 30 ml de phénol/chloroforme (v/v) et après centrifugation pendant 20 min à 8000 × g on ajoute 2,5 V d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2.

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

2.3.7.2. Préparation de l'ADN plasmidique par la méthode de lyse alcaline

Cette méthode est dite modifiée de la lyse alcaline de Sambrook *et al.* [159]. L'ADN chromosomique s'hydrolyse plus facilement en milieu alcalin que l'ADN plasmidique (super-enroulé). Après neutralisation par l'acétate de potassium, la masse d'ADN chromosomique se renature et s'agrège avec la précipitation des complexes protéines-SDS et des ARN de hautes masses moléculaires. Tandis que l'ADN plasmidique reste dans la fraction soluble.

Nous avons choisi cette méthode pour la préparation et la purification d'ADNp qui nous permet d'obtenir un ADN de meilleure qualité et en plus grande quantité, utilisé par exemple pour le séquençage ou pour un clonage.

Un clone isolé sur boîte est mis en culture pendant une nuit dans 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique choisi, le plus souvent 100 µg/ml d'ampicilline (dans le cas des vecteurs pCR-Blunt et pCR 2.1, nous avons utilisé 50 µg/ml de kanamycine). Après 24 h, nous centrifugeons dans un tube Eppendorf 1,5 ml de culture à 12000 × g pendant 15 min. Les cellules sont resuspendues dans 100 µl de solution I, puis bien homogénéisées. Les cellules sont alors lysées pendant 15 min avec 200 µl d'une solution de NaOH 0,2 N contenant 1% SDS (p/v) (Solution II). On ajoute immédiatement 150 µl d'acétate de potassium 3 M et d'acide

acétique glacial 2 M à pH 4,8 (Solution III) et les cellules sont incubées 10 min dans un bain de glace. Le mélange est alors centrifugé à 12000 × g pendant 10 min à 4 °C et on ajoute au surnageant obtenu 0,6 volume d'isopropanol. Le précipité se forme au bout de 10 min à température ambiante. Après une centrifugation à 12000 × g pendant 10 min, le précipité est resuspendu dans 100 µl TE 1 contenant 10 mg/ml de RNase A et incubé à 37 °C pendant 1 à 2 h.

La protéinase K est alors ajoutée au mélange à une concentration finale de 5 mg/ml et incubée à 50 °C pendant 2 à 3 h. Après une extraction au solvant organique (phénol/chloroforme), la solution est précipitée avec 2 volumes d'éthanol 100% et 10% de NaCl 5 M ou d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et laissée au moins 2 h 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'éthanol 70% et séché à température ambiante pendant environ 15 min. Enfin, le précipité est resuspendu dans 50 µl d'eau MilliQ ou de TE 1x et conservé à -20 °C.

2.3.7.3. Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN selon leurs tailles. L'électrophorèse d'ADN est réalisée sur gels d'agarose à des concentrations variables. Nous avons le plus souvent utilisé des gels à 1% d'agarose. L'agarose est fondu dans un tampon à pH 8,0 [TAE 1 ou TBE 1], auquel on ajoute du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La migration se fait dans un champ électrique à voltage constant. Le BET est un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce quand il est excité par des rayons UV à 254 ou 365 nm. Il permet donc de détecter au moyen d'un transilluminateur la présence d'ADN.

Afin de déterminer la taille de l'ADN, il est nécessaire de faire migrer en même temps que les échantillons un marqueur de taille (exemples : λ HindIII et λ HincII).

2.3.7.4. Quantification de l'ADN

Selon la pureté de l'échantillon, la quantité d'ADN peut être déterminée soit par spectrophotométrie, soit par estimation sur gel d'agarose coloré au BET.

2.3.7.4.1. Méthode spectrophotométrique

La lecture des densités optiques est effectuée à 280 nm et à 260 nm. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/ml d'ADN double brin. La pureté de l'ADN est estimée par le rapport DO_{260}/DO_{280} . Ce rapport doit être compris entre 1.8 et 2.

2.3.7.4.1. Méthode utilisant la fluorescence émise par le BET (méthode empirique)

L'intensité de la fluorescence émise par les molécules de BET intercalées au sein de l'ADN est proportionnelle à la masse totale de ce dernier. Ainsi, la quantité d'ADN présente dans l'échantillon est estimée par comparaison de la fluorescence de l'échantillon et celle d'une gamme de concentration connue après électrophorèse sur gel d'agarose.

2.3.7.5. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

La digestion de l'ADN par une ou plusieurs endonucléases de restriction est menée en microtubes et se fait selon les instructions du fournisseur. Le mélange réactionnel contenant la solution d'ADN, le tampon adéquat et l'enzyme de restriction (généralement à raison de 2 à 5 U/µg d'ADN), est incubé à 30 ou 37 °C selon l'enzyme utilisée. La durée des réactions est variable et dépend par exemple de la quantité et de la qualité de l'ADN à digérer et de la quantité d'endonucléases de restriction en solution. La réaction est arrêtée par traitement thermique puis refroidie dans la glace. Les produits de digestion sont évalués par électrophorèse sur gel d'agarose (0.8 à 1%).

2.3.7.6. Purification de fragments d'ADN par des kits

La purification de fragments d'ADN a été réalisée en utilisant le kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA) ». Ce kit permet la purification de fragment (ou produit) de PCR directement. La solution d'ADN à purifier est donc chargée dans une colonne de silice en présence de grandes quantités de sels. L'ADN est retenu et les contaminants sont élués directement. La colonne est ensuite lavée afin d'éliminer toutes impuretés et l'ADN pur est élué avec une solution de Tris-HCl 10 mM à pH 8,5 ou de l'eau MilliQ. Le volume élué est de 30 à 50 µl.

2.3.7.7. Technique de PCR

La technique d'amplification PCR consiste à effectuer de multiples cycles de répliation in vitro de l'ADN en utilisant comme amorce des oligonucléotides de synthèse s'hybridant avec les séquences complémentaires bordant la séquence à amplifier. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de la matrice, une étape d'hybridation des oligonucléotides à la matrice et une étape de polymérisation. Nous avons adopté les conditions ci-dessous :

Tampon d'ADN polymérase Taq ou Pfu	5 µl
$MgCl_2$ (25 Mm)	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Amorces directe (10 pmol)	5 µl
Amorce reverse (10 pmol)	5 µl
ADN (~300 ng)	1 µl
ADN polymérase Taq ou Pfu (2 U)	1 µl
DMSO 50% (facultatif)	5 µl
H_2O (ultrapure) q.s.p	50 µl

Dans nos conditions, une étape de dénaturation de la matrice pendant 5 min à 94 °C est suivie de 30 cycles de polymérisation dont chacun comprend :

- Une étape de dénaturation de la matrice (30 secondes à 94 °C) ;
- Une étape d'hybridation des nucléotides amorcés à la matrice (45 s à la température d'hybridation convenable comprise entre 45 et 65 °C) ;
- Une étape de polymérisation par une ADN polymérase (1 minute à 72 °C) ;
- Une étape de polymérisation supplémentaire de 10 min à 72 °C est généralement réalisée afin que la *Taq* polymérase puisse additionner un dATP à l'extrémité 3' du fragment amplifié ce qui permet le clonage dans des vecteurs adéquats (pCR 2.1 et pGEM-T Easy).

Lorsque l'amplification est réalisée par la *Pfu* polymérase, incapable d'ajouter des dATP à l'extrémité 3', cette étape supplémentaire est réalisée après purification de l'ADN moyennant la *Taq* polymérase en présence de dATP.

2.3.7.8. Séquençage d'ADN

Pour déterminer les séquences d'ADN, nous avons utilisé le séquenceur automatique « Automated 3100 Genetic Analyser » (Applied Biosystems) du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS, Tunisie). Ces séquences ont été faites dans des plaques PCR de 96 puits en utilisant le kit de séquençage (« BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit »). Le volume de réaction est de 10 µl contenant : 2 µl de produit PCR ; 1,5 µl de tampon (ABI 5×) ; 1µl d'un mélange d'enzyme/dNTP/ddNTP marqués (Rrmix 2,5×) ; 0,25 µl de différentes amorces à (200 ng/µl = 30 µM) et on complète avec de l'eau ultra pure à 10 µl. Le programme de la réaction comporte 35 cycles : 30 s de dénaturation à 94 °C, 60 s d'hybridation à 55 °C et 150 s d'élongation à 72 °C. Les produits de séquences sont alors purifiés en utilisant le kit « Montage SEQ 96 cleanup » de millipore. Cette étape de purification permet d'avoir des réactions de séquence de bonne qualité.

Les résultats de la séquence du gène de l'ADN ribosomal 16S ont été importés dans BioEdit v5.0.9 et la séquence complète ou partielle du fragment a été reconstituée. Une recherche sur BLAST (blastn, non redondant) [169-171] avec la séquence complète, par l'intermédiaire de GenBank [172-174], a permis d'identifier la souche étudiée en comparant avec les souches les plus proches.

2.3.7.9. Clonage

Le clonage se déroule en deux étapes. La première étape est la ligation entre le gène d'intérêt et un vecteur digérés auparavant qui aboutit à la formation d'une molécule recombinée et la deuxième est la propagation, la multiplication de cette molécule à travers la transformation d'un hôte, le plus souvent *E. coli*.

2.3.7.9.1. Ligation

Les plasmides sont digérés avec l'endonucléase de restriction de choix pour libérer le fragment d'ADN à cloner, qui sera purifié après électrophorèse en réalisant l'extraction de la bande d'intérêt du gel d'agarose. Afin de réaliser la réaction de ligation, les concentrations du fragment d'ADN et du vecteur sont déterminées le plus souvent par estimation sur gel après migration. Nous utilisons alors un rapport molaire de 5:1 entre l'insert et le plasmide linéarisé. La ligation a lieu, à température variable selon la ligase utilisée, pendant une nuit dans un

tampon de ligature livré par le fournisseur avec 1 U d'ADN ligase du phage T4. Cette dernière permet la formation d'une liaison covalente entre une extrémité 3' hydroxylée et une extrémité 5' phosphate de deux molécules d'ADN.

2.3.7.9.2. Transformation de *Escherichia coli*

Nous avons utilisé la technique de transformation au chlorure de calcium (CaCl_2). Pour ce faire, une colonie isolée de la souche de *E. coli* désirée est inoculée dans 3 ml de milieu LB et incubée durant une nuit à 37 °C. Le lendemain, 99 ml de milieu LB sont inoculés avec 1 ml de ce pré-inoculum et incubés environ 3 h à 37 °C sous une agitation de 250 rpm jusqu'à atteindre une absorbance comprise entre 0,4 et 0,6. Les cellules en plein phase exponentielle sont alors centrifugées à 5000 rpm durant 5 min à 4 °C et resuspendues dans 10 ml d'une solution tampon CaCl_2 -MOPS-glucose stérile et préalablement refroidie. Toutes les étapes suivantes se déroulent dans un bain de glace. Après 30 min d'incubation dans la glace, les cellules sont centrifugées dans les mêmes conditions que précédemment et le culot résultant est repris dans 2 ml de la même solution tampon. Les cellules sont alors prêtes à être transformées. Pour cela, 200 μl de cellules sont utilisées pour une réaction de transformation. L'ADN est ajouté aux cellules dans un microtube et le tout est incubé 1 h dans un bain de glace. Un choc thermique est alors réalisé à 42 °C durant 2 min et on ajoute immédiatement 1 ml du milieu LB. Les cellules sont alors incubées une heure à 37 °C pour l'expression du phénotype puis étalées sur milieu sélectif pour la sélection des transformants. L'efficacité de la transformation est généralement de 10^6 à 10^7 transformants par μg d'ADN pour un ADNp et de 10^4 à 10^5 pour une ligation.

2.3.8. Technique de purification des protéases

La biomasse issue de la culture (500 ml) de 36 h de la souche DZ100 est éliminée par centrifugation à 9000 \times g pendant 30 min et à 4 °C. Le surnageant récupéré, contenant l'enzyme est clarifié par filtration à travers une membrane de 0,45 μm et gardé en vue de la purification selon les étapes suivantes.

2.3.8.1. Traitement thermique

Le surnageant obtenu subit un traitement thermique à 80 °C pendant 30 min, puis centrifugés pendant 30 min à 14000 \times g. Cette opération a pour but de

précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique. Chaque surnageant récupéré contient l'activité protéolytique.

2.3.8.2. Précipitation par le 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 l'extrait brut a été réalisée de la manière suivante : On ajoute au surnageant contenant l'activité protéolytique, 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 (13000 x g pendant 30 min), le surnageant recueilli est additionné de sulfate d'ammonium solide jusqu'à 70% de saturation (136 g/l). Après 2 h d'agitation, on centrifuge (13000 x g pendant 30 min), le culot est repris immédiatement dans 15 ml du tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contenant 10 mM NaCl et 0,005% Triton X-100 (**tampon B**) puis on centrifuge à 13000 x g pendant 30 min. Le surnageant obtenu est dialysé à + 4 °C contre le tampon B pendant une nuit.

2.3.8.3. Chromatographie d'exclusion diffusion sur Shodex-HPLC

La chromatographie d'exclusion est appelée aussi chromatographie par perméation de gel ou filtration sur gel. Elle permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières au niveau du volume mort (appelé V_0). Les petites et les moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

Nous avons utilisé une colonne (« Shodex (Shodex Protein WK 802-5 column)», Showa Denko K.K., Tokyo, Japon, ayant un diamètre de 7.8 mm et une longueur de 300 mm, 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® for Windows Basic Edition V3.05.

L'échantillon est préparé dans le plus petit volume manipulable possible. Nous avons choisi d'utiliser une boucle d'injection de 500 µl dans laquelle nous injectons 100 µl puis 500 µl en diluant si besoin pour ne pas dépasser 10 mg de protéine par injection. Le contenu de cette boucle est alors injecté sur la colonne et séparé avec un débit de 0,8 ml/min. La colonne utilisée a été calibrée en utilisant un kit standard renfermant des protéines de masses connues et distribuées commercialement par Bio-Rad, France, sous forme de poudre. 1 mg de poudre de kit est ainsi dissout dans 1 ml de tampon A contenant 5 mM $CaCl_2$ et 25 mM NaCl à pH 7,5 (**tampon C**) utilisé pour purifier notre protéine d'intérêt, et centrifugé (10000 rpm, 30 min) pour éliminer tous les agrégats qui pourraient altérer la colonne.

2.3.8.4. Chromatographie échangeuse de cations sur Mono S - Sepharose

C'est une méthode de séparation des protéines en fonction de leurs propriétés ioniques. Dans notre travail on a utilisé une colonne de Mono S - Sepharose (Pharmacia) ayant : un diamètre de 2,6 cm et une longueur de 50 cm, il s'agit d'une échangeuse de cations qui est capable de fixer des molécules chargées positivement, permettant de séparer des molécules chargées négativement qui vont passer à travers la colonne sans être retenues. Les molécules restées accrochées sur le gel ont été éluées par une solution de chlorure de sodium.

Le surnageant récupéré après l'étape de gel de filtration est alors déposé sur une colonne de Mono S - Sepharose, préalablement équilibrée avec le tampon C. L'éluion des protéines, avec le même tampon contenant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500 mM, se fait à un débit de 35 ml/h et est suivie par la lecture de la DO à 280 nm et le test d'activité protéasique.

2.3.9. Méthodes analytiques

2.3.9.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford [175]. Nous avons utilisé le kit (« Bio-Rad Protein Assay ») Bio-Rad, France, en mélangeant à chaque fois 200 µl de colorant, le bleu de Coomassie G250, à 800 µl d'une solution diluée de la protéine. La densité optique est mesurée à 595 nm contre un blanc qui ne contient pas d'extrait enzymatique. Afin d'obtenir des résultats fiables, la densité optique des échantillons étudiés doit être comprise entre 0,2 et 0,7. Cette méthode nécessite aussi une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'Albumine Sérum Bovine (BSA) comme protéine standard, ce qui nous permet d'estimer la quantité de protéine en µg/ml (Annexe 4).

2.3.9.2. Séparation des protéines sur gel d'acrylamide

La pureté de l'enzyme est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10%. Cette analyse des préparations enzymatiques par électrophorèse dans des conditions dénaturantes est réalisée selon la technique de Laemmli [176].

2.3.9.3. Coloration au bleu de Coomassie

Cette méthode colore les protéines de façon à peu près indépendante de la séquence. Après migration électrophorétique, le gel est plongé dans une solution de coloration (1 g de bleu de Coomassie R-250 (BioRad) dans 50 ml d'acide acétique, 250 ml d'éthanol et H₂O q.s.p. 500 ml), le gel est ensuite transféré dans une solution de décoloration (acide acétique 100 ml ; éthanol 350 ml et H₂O q.s.p. 1 litre). Le gel est stocké dans de l'eau avec 20% d'éthanol, ce qui achève la décoloration et évite la contamination microbienne, puis séché ou photographié (scanné).

2.3.9.4. Détermination de l'activité protéasique sur zymogramme

Après migration sur gel de polyacrylamide, incorporant un substrat de protéase (kératine azure), dans des conditions dénaturantes. Le gel lavé dans l'eau distillée pendant 1 h en présence de 2,5% Triton X-100 afin de remplacer le SDS puis incubé pendant 3 h à 40 °C en présence du tampon A. Une zone claire est visualisée, sur le gel traité, après fixation pendant 1 h du TCA 20% (p/v),

coloration au bleu de Comassie G-250 et décoloration par l'eau distillée/méthanol/acide acétique.

2.3.9.5. Détermination des acides aminés des extrémités N-terminales par la méthode automatisée d'Edman

Les séquences N-terminales des différentes protéines purifiées native (SAPDZ) et recombinante (rSAPDZ) ont été déterminées par la méthode automatisée d'Edman sur microséquenceur de protéines [177, 178]. Elle comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion (Annexe 5). Pour la comparaison, les séquences des acides aminés ont été obtenues par l'utilisation de la base de données du programme BLASTP (NCBI, NIH, USA).

2.3.9.6. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique et de caractériser leur structure chimique, en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z et les comptent.

La spectrométrie de masse permet non seulement de déterminer la masse des produits étudiés, en mélange ou purifiés, mais également de contrôler les modifications post-traductionnelles des molécules et de donner leur élément de structure extrêmement sensible. Dans le cas particulier des peptides, cette méthodologie permet dans certaines conditions d'obtenir des éléments de la séquence en acides aminés.

Il existe deux méthodologies complémentaires en spectrométrie de masse pour l'étude des molécules biologiques: l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) couplée à un analyseur de masse de type temps de vol (TOF), très efficace pour l'étude directe d'un mélange de produits (Annexe 6), et l'ionisation par électrobulisaison (ESI) couplée à des analyseurs de masse de type quadripolaire et temps de vol (Qq-TOF). Cette technique permet l'interfaçage entre la séparation chromatographique en phase liquide et le spectromètre de

masse. La faible taille des protéines considérées dans cette étude nous permet de fournir nos échantillons sous 2 formes :

1. en solution, ce qui permet de mesurer la masse totale de nos protéines ;
2. sur gel d'acrylamide, après migration, ce qui permet de fournir une protéine pure avec moins de molécules parasitant le signal de spectrométrie (Tris notamment). Cette forme nécessite une digestion préalable à la trypsine, permettant de traiter des fragments de plus petite taille.

Cette technique nécessite d'avoir un tampon pauvre en ion Cl et des concentrations de l'ordre de 5 pmol/ μ l. En solution ou emprisonnée dans un gel d'électrophorèse, la protéine sera diluée dans un tampon acétate d'ammonium et clivée enzymatiquement (par la trypsine) puis l'hydrolysate final est déposé sur la plaque du MALDI-TOF et mélangé à une solution d'acide alpha cyano-4-hydroxycinnamique. Les différentes étapes peuvent être énumérées comme suit :

1. Après coloration au bleu de comassie G-250, les bandes protéiques d'intérêt sont découpées du gel ;
2. Laver les bandes avec un mélange d'acétonitrile/hydrogencarbonate d'ammonium (50 mM) (v/v) ;
3. Digérer avec la trypsine pendant 16 h à 37 °C ;
4. Arrêter la digestion par addition de 2 μ L d'acide trifluoro-acétique (TFA) ;
5. Le produit de la digestion est par la suite analysé grâce à une matrice d'acide cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg/mL) préparée dans 50% acétonitrile contenant 0,1% TFA.

La taille des fragments protéiques sera ainsi déterminée par rapport à un étalon interne en utilisant le spectromètre de masse (Voyager DE STR MALDI-TOF/Mass spectrometer, Applied Biosystems). Les valeurs expérimentales seront par la suite comparées avec celles contenues dans les banques de données pour identifier la protéine.

2.3.10. Expression et purification des protéases SAPDZ recombinantes

Les vecteurs recombinants construits par la SAPDZ sont doublement digérés par les enzymes de restriction *EcoRI*, *HindIII*. Les fragments (*EcoRI/HindIII*) ainsi libérés sont alors clonés dans le vecteur pTrc99A (souche

DH5 α) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction puis déphosphorylé

Pour la purification, les cellules *E. coli* DH5 α /SAPDZ transformées par le plasmide recombinant pTrc99A sont cultivées pendant une nuit à 37 °C et à 250 rpm dans le milieu LB (2 litres) contenant 100 μ g/ml d'ampicilline. A une absorbance de 0,6-0,8 à 600 nm, la production de la protéase (recombinante) est induite par ajout, d'IPTG à une concentration de 0,4 mM pendant 8 h. La fraction périplasmique, contenant l'activité protéolytique, est obtenue par choc osmotique selon un protocole modifié [179]. Après centrifugation 15000 rpm pendant 20 min et à 4 °C, le surnageant retenu constitue la fraction extracellulaire. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec l'eau froide puis resuspendu dans 10 ml de tampon de lyse (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 20% saccharose) suivie d'une lyse dans la glace pendant 1 h par ajout de lysozyme à 200 μ g/ml. Après une seconde centrifugation (15000 rpm pendant 20 min), le surnageant ainsi obtenu représente la fraction périplasmique. Pour récupérer la fraction intracellulaire, le culot cellulaire résultant, est resuspendu dans 5 ml de tampon acétate de sodium 50 mM (pH 4,5) contenant 2 mM CaCl₂ et 5 mM dithiothreitol (DTT), puis soumis à une sonication par (« Vibra-Cell™ 72405 Sonicator ») pendant 6 \times 10 s d'amplitude pour briser la membrane bactérienne puis centrifugé et le surnageant ainsi obtenu constitue la fraction intracellulaire.

2.3.11. Caractérisation physico-chimique des protéases

La caractérisation des protéases est réalisée en utilisant la kératine azure comme substrat.

2.3.11.1. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la SAPDZ

Pour étudier l'effet du pH sur l'activité de SAPDZ et déterminer le pH optimal, des réactions d'hydrolyse de la kératine azure sont réalisées à différents pH allant de 2 à 13 à 80°C. L'enzyme pure est pré-incubée pendant 120 h à 70 °C à des pH variant de 2 à 13. Tous les tampons sont utilisés à des concentrations de 100 mM et en présence de 5 mM CaCl₂. Tampon glycine-HCl pour les pH 2 à 5 ; acide 4-(2-hydroxy éthyl)-1-piperazine éthane sulfonique (HEPES) 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 11 ; bicarbonate-NaOH pour les pH 11 à 11,5 ;

Na₂HPO₄-NaOH pour les pH 11,5 à 12 et KCl-NaOH pour les pH 12 à 13.

Les activités résiduelles sont mesurées aux optima de pH (12,5) et de température (85 °C) de l'enzyme et l'enzyme non incubée est considérée comme témoin.

2.3.11.2. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la SAPDZ

Les réactions d'hydrolyse sont réalisées en maintenant le pH à 12.5 (pH optimal) pendant 20 min et en faisant varier la température de 40 à 100 °C en présence ou en absence du calcium (5 mM). Ceci permet la détermination de la température optimale de l'enzyme.

La thermostabilité de la SAPDZ purifiée est examinée en incubant l'enzyme pendant 120 h à des températures variant de 70 à 100 °C. Des aliquotes sont prélevées à des intervalles de temps réguliers pour évaluer l'activité restante dans les conditions standards. Les enzymes non chauffées sont considérées comme témoin (100%).

2.3.11.3. Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique de la SAPDZ

L'activité protéolytique est testée à pH 12,5 et à 85 °C pendant 1 h, en absence ou en présence de 5 mM de sels de métaux bivalents: Ca²⁺ (CaCl₂) ; Mn²⁺ (MnCl₂) ; Mg²⁺ (MgCl₂) ; Zn²⁺ (ZnCl₂) ; Co²⁺ (CoCl₂) ; Cu²⁺ (CuCl₂) ; Ba²⁺ (BaCl₂) ; Fe²⁺ (FeCl₂) ; Ni²⁺ (NiCl₂) ; Cd²⁺ (CdCl₂) et Hg²⁺ (HgCl₂) et monovalents : Li⁺ (LiSO₄) ; K⁺ (KCl) et Na⁺ (NaCl).

L'activité est exprimée comme étant le pourcentage du niveau d'activité en absence d'ions métalliques. Les activités protéolytiques mesurées en absence des ions métalliques (en présence de 5 mM d'EGTA, agent chélateur) sont prises comme témoin (100%).

2.3.11.4. Effet des inhibiteurs sur l'activité enzymatique de la SAPDZ

La protéase SAPDZ est incubée en présence de différents inhibiteurs spécifiques pendant 1 h à la température ambiante avec un rapport ratio inhibiteur/enzyme égale à 100. Les activités résiduelles sont mesurées aux conditions optimales de l'enzyme. Les inhibiteurs de protéases utilisés sont:

- Inhibiteurs de protéases à sérine : PMSF, DFP ;
- Inhibiteurs de la chymotrypsine : TPCK, TLCK

- Inhibiteur de la trypsine : SBTI ;
- Inhibiteurs compétitive de la trypsine : Benzamidine ;
- Inhibiteurs de protéases à thiol : *LD-DTT* ; 2-ME ; DTNB; EPNP ; NEM ; Iodoacétamide; Leupeptine ;
- Inhibiteur des protéases acides : Pepstatine A ;
- Inhibiteurs de métallo-protéases : EDTA; EGTA ;
- Inhibiteur des protéases à cystéine : MIA.

2.3.11.5. Effet de la nature du substrat sur l'activité enzymatique de la SAPDZ

Deux natures différentes de substrats protéiques sont utilisées. Des substrats naturels: kératine, caséine, gélatine, albumine et l'hémoglobine. Et des substrats modifiés : kératine azure, azo-caséine et collagène de type I et II.

En plus, d'autres substrats protéiques sont utilisés tels que : les esters (BTEE ; ATEE ; BCEE et BAEE) et les peptides synthétiques : s(Met Suc- (Ala)₂ – Pro – Val – pNa ; Suc- (Ala)₂ – Pro – Phe – pNa ; Suc- (Ala)₂ – Pro – Met – pNa ; Suc- (Ala)₂ – Pro – Leu – pNa ; Glu- (Ala)₂ – Pro – Leu – pNa ; Suc- (Ala)₂ – Val – Ala – pNa ; Suc- (Ala)₂ – Phe – pNa ; Suc- Ala – Pro – Ala – pNa ; Suc- Tyr – Leu – Val – pNa ; Suc- (Ala)₃ – pNa et BAPNA.

L'activité enzymatique est déterminée pour chaque substrat selon les conditions optimales.

2.3.11.6. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de la protéase purifiée de SAPDZ ont été déterminés en utilisant différentes concentrations de caséine (0 à 20 mg/ml) à 85°C et pH 12,5 en comparaison avec d'autres protéases. Les valeurs de K_m et K_{cat} sont déterminées selon la méthode décrite par Lineweaver et Burk (1934) en utilisant le programme Enzyme Kinetics Module 1.3 Sigmaplot version10.0.

2.3.12. Applications biotechnologiques de la protéase SAPDZ de la souche DZ100

2.3.12.1. Méthode de séchage par lyophilisation

La lyophilisation est réalisée moyennant un lyophilisateur de Laboratoire de type Bioblock Scientific Christ ALPHA 1-2 et ceci après congélation de la SAPDZ. Les paramètres de lyophilisation sont : température - 40 °C et pression 0,31 mbar.

2.3.12.2. Mise en évidence de la dégradation des substrats kératinolytiques par l'enzyme semi-purifiée

Dans le but de mettre en évidence l'activité kératinolytique de l'enzyme SAPDZ sur différents substrats kératinolytiques (farine de plume, plumes entières, poils de vache et de chèvre, laine de mouton et de lapin et cheveu humain), cette dernière est incubée dans des Erlenmeyers contenant 100 ml de tampon. Les différents substrats récupérés d'un abattoir ont été bien rincés et incubés pendant 48 h à 37°C.

L'activité de l'enzyme est repérée par observation directe de la dégradation des substrats pour donner un liquide homogène.

2.3.12.3. Test de l'activité de l'épilage/pelange de l'enzyme SAPDZ

Le test de l'activité de l'épilage a été effectué par l'ajout de 100 ml d'une solution du tampon HEPES (100 mM, 5 mM CaCl₂ à pH 10) qui contient à 2000 U de l'enzyme sur des petits morceaux des peaux brutes de lapin, de chèvre, de vache et de mouton. Après incubation à 37°C pendant 36 h, les poils sont éliminés à la main afin de déterminer le pouvoir d'élimination manuelle.

Ce test n'est pas un test quantitatif mais il nous donne des informations sur la qualité de l'épilage.

2.3.12.4. Détermination du degré d'hydrolyse

L'hydrolyse des protéines, contenues dans la farine de plumes de poulet, est réalisée à 80°C et pH 12,5 (pour la SAPDZ); 60°C et pH 10 (pour la BPN'); 70°C et pH 12 (pour la SAPB-L31I/T33S/N99Y) ; et 75°C et pH 11,5 (pour la KERAB) et 65°C et pH 10 (pour la KerA). Le pH est maintenu constant pendant l'hydrolyse par ajout de NaOH 4 N. Une masse de 4 g de farine de plumes est dissoute dans 100 ml du tampon approprié puis traités par 2000 U de chaque enzyme purifiée. La quantité de soude nécessaire pour maintenir le pH constant est proportionnelle au degré d'hydrolyse (DH). La digestion enzymatique est arrêtée quand le DH devient constant.

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques coupées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques [180].

$$DH = \frac{\text{Nombre de liaisons peptidiques coupées}}{\text{Nombre total de liaisons peptidiques}} \times 100 \quad \text{Ou} \quad DH = \frac{h}{htot} \quad 2.3$$

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

$$DH = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{htot} \times 100\% \quad 2.4$$

Avec

B : consommation de la base, en litres ;

Nb : Normalité de la base ;

MP : Masse de protéines ($N \times$ 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 [164].

La valeur de α est donnée par les fiches techniques des enzymes "Novo".

2.3.12.5. Effet des détergents solides et liquides sur l'activité enzymatique de la SAPDZ

La SAPDZ a été pré-incubée à 40 °C pendant 120 h en absence ou en présence des détergents solides [iSiS, Dixan (Henkel, Algerie), OMO (Unilever, France), Ariel (Procter & Gamble, Suisse) et Shems (SARL, Blida, Algerie)] et liquides [Tied, Daz, Nadhif, Persil et le Chat] à une concentration de 7 mg/ml [181].

Une inactivation des enzymes contenues dans les détergents industriels est réalisée par un traitement thermique pendant 1 h à 65 °C avant l'introduction de la SAPDZ. L'enzyme purifiée est incubée avec le détergent pendant 120 h à 40 °C. Les activités résiduelles sont ensuite mesurées à pH 10 et à 60 °C (l'enzyme non incubée en absence de détergent est considérée comme témoin).

2.3.12.6. Détermination des propriétés détergentes de la SAPDZ et BPN'

Des pièces de tissu en coton (8 × 8 cm) portant des taches sèches à base de protéines (sang et chocolat), ont été traitées, par la protéase SAPDZ et l'enzyme commerciale (BPN'), durant 1 h à 40 °C dans un Erlenmeyer sous agitation (250 rpm) et sous différentes conditions :

1. 100 ml d'eau distillée,
2. 100 ml d'eau distillée + solution de détergent commercial (iSiS) à 7 mg/ml,
3. 100 ml d'eau distillée + solution de BPN' (500 U/ml),
5. 100 ml d'eau distillée + solution de détergent commercial (iSiS) à 7 mg/ml additionnées de solution de SAPDZ (500 U/ml).

Les pièces de tissus sont par la suite rincées à l'eau distillée, séchées puis contrôlées à l'œil nu.

2.3.13. Méthodes bioinformatique

2.3.13.1. Alignement des séquences nucléotidiques avec les banques de données

L'analyse phylogénétique a été réalisée par comparaison des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S des bactéries phylogénétiquement proches dont la séquence est déposée dans les banques de données : GenBank (USA), EMBL (Europe) et DDBJ (Japon) utilisant les programmes Blast disponibles sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et RDP II (« Ribosomal Databank Project ») (<http://rdp.cme.msu.edu/html>). Par la suite, ces séquences ont été analysées par le programme ARB (<http://www.arb-home.de>) pour visualiser l'arbre phylogénétique et déterminer l'apparenté de la souche de *Bacillus circulans* DZ100 étudiée.

Les séquences brutes obtenues ont été nettoyées par élimination des bases appartenant au vecteur de clonage. Enfin une vérification de la concordance entre l'électrophorégramme et la séquence de bases a été réalisée en utilisant le programme BioEdit version 7.0.2. Le logiciel DNAMAN est utilisé pour la construction des cartes de restrictions. Les programmes BLAST, effectuent une recherche rapide dans les banques de séquences nucléiques et protéiques combinées avec une estimation rigoureuse des statistiques pour apprécier la signification des similitudes par alignement local.

2.3.13.2. Modélisation moléculaire des protéines et analyse de structures

La modélisation moléculaire a été réalisée avec le serveur Expasy (<http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>), swiss-model Workspace [182] ou Geno3D (<http://geno3d-pbli.ibcp.fr>, serveur de modélisation automatique des protéines à l'Institut de Biologie et Chimie des Protéines à Lyon (IBCP). Le serveur swiss-model utilise le programme ProMod [183, 184] pour effectuer la modélisation et affine les modèles par minimisation d'énergie en utilisant le programme GROMOS96 [185]. La minimisation est arrêtée lorsqu'il obtient une valeur d'énergie constante.

Cependant dans le cas du serveur Geno3D, en partant de la séquence de protéine donnée, ce serveur construit un modèle homologue en six étapes successives :

1) Il identifie les protéines homologues avec une structure 3D connue en utilisant le logiciel d'alignement Psi-Blast.

2) Il propose à l'utilisateur tous les modèles possibles à travers une interface qui classe les structures trouvées par degré d'homologie décroissant en donnant les scores pour le choix de la meilleure cible.

3) Il réalise l'alignement entre la séquence proposée et celle de la structure 3D choisie.

4) Il extrait les contraintes géométriques (angles diédraux et distances) pour les atomes correspondants entre la séquence modèle et la séquence cible.

5) Il construit un modèle 3D de la protéine en utilisant une approche géométrique.

6) Finalement il envoie les résultats à l'utilisateur. On peut obtenir plusieurs modèles avec une échelle de contraintes.

Générer plusieurs structures permet d'avoir une estimation de la précision des modèles obtenus, et ceci en particulier au niveau des boucles et des insertions-délétions. Les modèles obtenus sont par conséquent visualisés et étudiés en utilisant les programmes suivants : DeepView, Swiss-PdbViewer, ViewerliteTM 5.0 et PyMol.

Chapitre 3-1

ISOLEMENT, CRIBLAGE ET IDENTIFICATION DE NOUVELLES SOUCHES PRODUCTRICES DE PROTÉASES ALCALINES

3.1.1. Introduction

Au cours d'un criblage de nouvelles souches productrices de protéases alcalines agissant dans des conditions extrêmes, une souche bactérienne a été isolée à partir des effluents de l'abattoir municipal de la wilaya de Blida. La souche a été identifiée comme étant *Bacillus.circulans* nommée DZ 100 et a fait l'objet de notre étude.

Il est souvent reconnu que la production des protéases extracellulaires chez les microorganismes est largement influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH, l'aération et le temps d'incubation et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture, essentiellement la source de carbone, la source d'azote et les ions métalliques [186]. En fait, un milieu de culture doit contenir quantitativement et qualitativement les matières premières exigées pour la croissance et pour la production d'enzyme.

A l'échelle industrielle, les enzymes extracellulaires du genre *Bacillus* telles que les protéases alcalines, sont produites sur milieux contenant de fortes concentrations en sources complexes de carbone et d'azote. En effet, ces substrats complexes sont lentement hydrolysés, évitant ainsi la répression catabolique et permettent d'atteindre des concentrations intéressantes d'enzymes. Cependant, l'utilisation de milieux synthétiques avec de fortes concentrations de sources de carbone ou d'azote facilement assimilables comme le glucose et le sulfate d'ammonium, respectivement, est à l'origine de la répression catabolique des enzymes extracellulaires [1, 3].

Au cours de ce travail, nous avons poursuivi le programme d'isolement et de criblage de nouvelles souches bactériennes productrices de protéases alcalines d'intérêt biotechnologique et par la suite l'identification de la bactérie la plus active.

3.1.2. Isolement et criblage de souches bactériennes sécrétrices de protéases

Divers échantillons provenant de l'abattoir de la wilaya de Blida ont été soumis à un traitement thermique pendant 30 min à 80 °C afin d'éliminer tous type de cellules végétatives. En plus, nous avons criblé par rapport à une souche préexistante de *Streptomyces* sp. AB1 isolée à partir d'un sol de surface de la plaine de la Mitidja [153]. Par la suite, les échantillons ont été étalés sur milieu GNL (milieu utilisé pour déceler les activités protéolytiques extracellulaires) et incubés pendant 24 à 76 h à différentes températures (30, 37 et 45 °C). Ce test semi-qualitatif est visualisé par la diffusion des protéases secrétées dans la gélose environnante tout en hydrolysant les protéines du lait (notamment les caséines) ce qui se traduit par l'apparition d'un halo transparent autour de la colonie (figure 3.1).

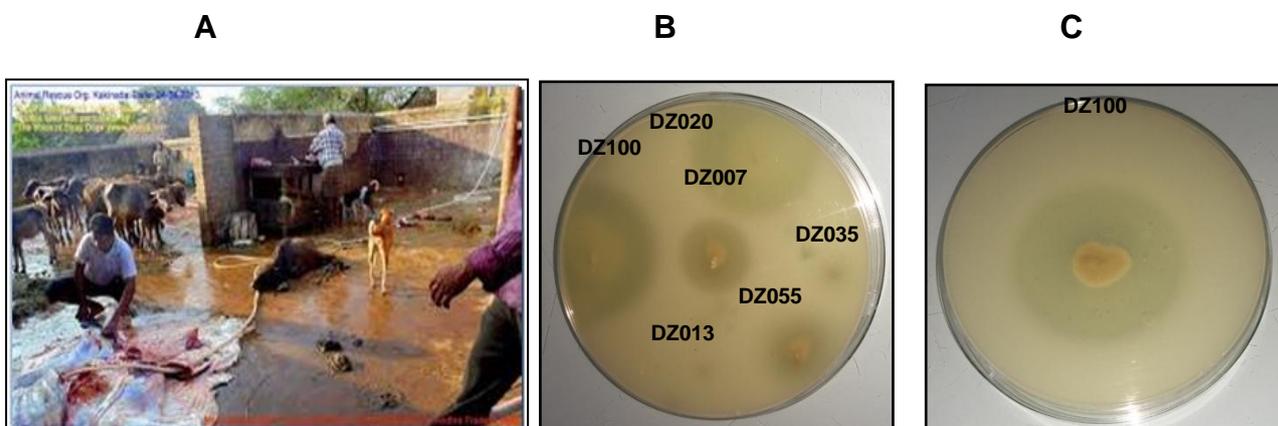


Figure 3.1 : (A) Site d'échantillonnage. (B) Mise en évidence d'activité protéolytique produite par les souches bactériennes sur gélose nutritive au lait (test-semi qualitatif). (C) Mise en évidence d'activité protéolytique produite par la souche bactérienne DZ100 sur gélose nutritive au lait.

L'isolement a abouti à la sélection de 135 nouvelles souches. Les souches nommées DZ001 jusqu'à DZ136. En se basant sur le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm), nous avons montré que parmi les 136 souches testées:

- 44 souches ne présentent pas d'activité protéasique ou elles possèdent une activité très faibles ;
- 80 souches présentent des rapports inférieur à 1.4 ;

- 12 souches montrent des rapports supérieurs à 1.4 (tableau 3.1). Ces souches ont été retenues pour notre étude. Leur activité a été quantifiée après culture sur milieu liquide à base de caséine.

Tableau 3.1 : Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu solide GNL (test semi-qualitatif) des 12 souches bactériennes nouvellement isolées.

Souche	24 h	48 h	72 h	Température d'incubation (°C)	Souche	24 h	48 h	72 h	Température d'incubation (°C)
	dh/dc	dh/dc	dh/dc			dh/dc	dh/dc	dh/dc	
DZ007	1,37	1,44	1,47	37	DZ020	1,21	1,31	1,36	37
DZ035	1,47	1,56	1,96	37	DZ055	1,25	1,42	1,68	30
DZ075	1,41	1,59	1,88	37	DZ082	1,30	1,66	1,57	30
DZ088	1,36	1,55	1,79	30	DZ091	1,27	1,33	1,35	30
DZ096	1,54	1,52	1,43	30	DZ100	1,02	1,25	1,51	37
DZ115	1,51	1,48	1,5	37	DZ121	1,51	1,89	1,47	30

3.1.3. Cinétique de croissance et de production des protéases sur milieu liquide

D'une manière générale, le niveau de production des protéases par les souches protéolytiques peut être modulé par la composition chimique des milieux de culture. Ainsi, cette production est fortement influencée par la nature et la concentration des constituants du milieu. Plusieurs autres facteurs physiques tels que l'aération, la densité de l'inoculum, le pH, la température et le temps d'incubation affectent d'une manière considérable la production des protéases. En vue d'évaluer les niveaux de production de protéases par les 12 souches retenues et de vérifier leur capacité d'hydrolyser les protéines en milieu liquide, nous avons réalisé des cultures sur milieu initial à base de caséine (15 g/l) comme substrat carboné et peptone (7 g/l) comme source azotée à pH initial de 10.0. Le choix d'un tel pH découle du fait qu'on vise la recherche des souches productrices des protéases alcalines pouvant être éventuellement utilisées en industrie. Les cultures des différentes souches ont été réalisées dans des Erlenmeyers à baffle de 500 ml avec un volume utile de 50 ml. Les dosages d'activité protéolytique sont effectués suivant la méthode de Kembhavi, chaque 24 h d'incubation et aux températures appropriées sous une agitation de 250 rpm.

Nous avons également évalué la cinétique de croissance pour chaque souche par la mesure de l'absorbance à 600 nm. Des prélèvements réguliers ont été effectués et la croissance bactérienne ainsi que l'activité protéolytique ont été déterminées (Figure 3.2). En parallèle, des mesures de pH ont été réalisées

lorsque la culture atteint la production maximale de protéase. Les résultats de ces mesures sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 3.2: Tableau récapitulatif des activités protéolytiques sur milieu liquide initial des 12 souches bactériennes retenues parmi les 136 souches isolées. Les valeurs de la DO et du pH correspondent pour le temps de culture où nous avons observé la meilleure production.

Souches	Production (U/ml)				pH pour l'activité max	DO ₆₀₀ pour l'activité max
	0 h	24 h	48 h	72 h		
DZ007	72,72	120,36	226,54	150,18	08,52	6,00
DZ020	61,45	344,36	196,72	175,63	07,70	7,32
DZ035	137,45	142,9	78,9	48,36	09,09	5,56
DZ055	83,63	240	131,63	98,18	09,23	7,1
DZ075	72,00	173,45	116,36	64,72	09,91	5,67
DZ082	85,81	166,18	208,36	86,54	09,20	5,45
DZ088	47,27	89,09	177,09	69,09	08,34	4,67
DZ091	32,72	80,00	153,81	78,9	08,61	4,70
DZ096	86,90	144,72	177,45	84,00	08,39	4,90
DZ100	299,27	480,00	209,81	124,63	09,39	9,3
DZ115	77,81	113,45	210,9	160,36	09,13	5,67
DZ121	137,45	210,18	142,54	109,81	09,70	5,54

L'ensemble des résultats obtenus montre clairement que les souches sélectionnées se développent très bien dans le milieu de culture utilisé. Toutefois, elles présentent des niveaux de production de protéases variables avec des maximums d'activités atteignant après 24 h pour les souches DZ020, DZ035, DZ055, DZ075, DZ100 et DZ121 et 48 h pour les souches restantes. La différence des niveaux de production de protéases sur milieu liquide dépendrait de plusieurs paramètres tel que : les exigences des souches, la composition du milieu, les concentrations des constituants et les conditions de production (vitesse d'agitation, température, aération, temps d'incubation) [26]. En plus, nous remarquons que les valeurs du pH ont légèrement variés et qu'aucune souche ne présente un pH plus alcalin que celui de départ (pH 10,0).

On note que la production d'enzymes évolue avec la croissance, les protéases sont excrétée dès le début de la croissance du microorganisme. La production continue jusqu'à la fin de la phase exponentielle et même pendant la phase stationnaire. Des résultats similaires ont été obtenus pour *B. cereus* MCM B-326 [187] et *B. cereus* BG1 [39].

Parmi les souches testées, 4 souches présentant un niveau de production important ont été retenues pour des études plus détaillées. Il s'agit des souches DZ007, DZ055, DZ020 et DZ100 qui produisent respectivement 226.54, 240.00, 344.36 et 480.0 U/ml.

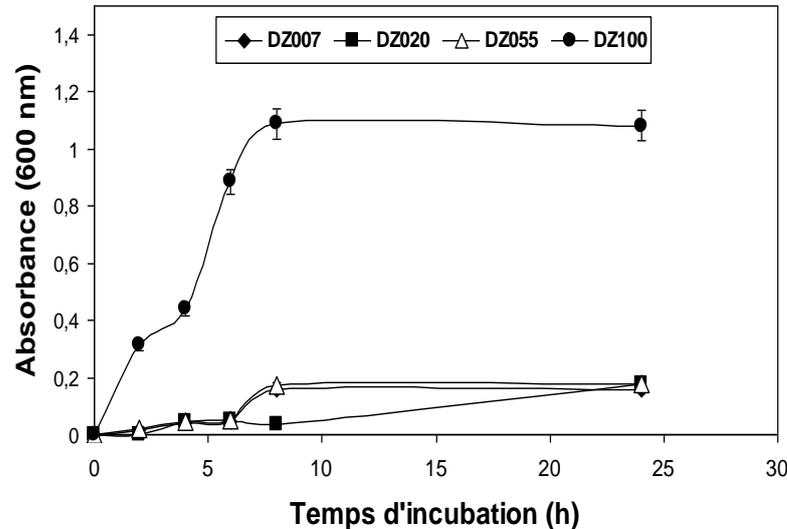


Figure 3.2 : Cinétique de croissance.

Le suivi des sécrétions protéolytique et la croissance bactérienne en fonction du temps montrent clairement que les 4 souches sélectionnées poussent bien sur le milieu de culture utilisé (bouillon a pH=10) et atteint la valeur maximale en terme de vitesse de croissance au bout de 8h pour toutes les souches.

En plus, on remarque que la souche DZ100 est la seule qui s'adapte rapidement au milieu dont une phase de latence très courte et une très grande accélération pour atteindre la vitesse maximale. Par contre les souches DZ007, DZ020 et DZ050 ont une très lente croissance qui se traduit par une longue phase de latence et une faible accélération pour atteindre leurs vitesses maximales qui est très faibles par rapport à celle de DZ100 et dont la biomasse est pratiquement la même pour les trois souches. Au-delà de la période de croissance, la production commence à diminuer légèrement. Cette diminution est probablement due à plusieurs phénomènes :

- Epuisement des éléments nutritifs dans le milieu de culture ;
- Une dégradation par les enzymes endogènes libérés suite à la lyse cellulaire;
- Inhibition par excès de surproduction d'enzymes.
- Instabilité de l'enzyme.

On remarque aussi que le pH est variable et que rare les souches qui présentent un pH plus alcalin que celui du départ (pH=10).

3.1.4. Propriétés physico-chimiques des préparations enzymatiques retenues

Après la sélection des souches protéolytiques les plus actives, une série d'expériences étaient réalisées afin de déterminer la température optimale d'action et le pH optimum de fonctionnement ainsi que la stabilité des préparations protéolytiques. En fait, ces deux facteurs abiotiques influencent sensiblement la croissance bactérienne. Plusieurs travaux réalisés ont démontré que ces deux paramètres affectent fortement la production des protéases [4, 155].

3.1.4.1. Étude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité des préparations protéolytiques

Le pH est un paramètre essentiel pour la sélection d'une protéase dans le domaine industriel. En détergence par exemple, ce paramètre doit présenter un optimum généralement compris entre 7 et 12 [4, 116, 117]. L'activité des différents extraits enzymatiques a été déterminée à des pH variant entre 7 et 12 et aux températures adéquates d'incubation. Pour toutes les réactions, nous avons ajouté du CaCl₂, puisque le Ca²⁺ joue un rôle important dans le maintien de l'activité protéolytique des protéases à sérine par stabilisation de la conformation active de l'enzyme, sans être impliqué dans la réaction catalytique [188].

Tableau 3.3 : Tableau récapitulatif des activités relatives des extraits enzymatiques des 4 souches bactériennes retenues en fonction du pH.

Souche	Activité relative (%) en fonction du pH					
	7	8	9	10	11	12
DZ007	35	80	94	100	64	20
DZ020	95	100	80	56	15	5
DZ055	85	97	100	85	20	12
DZ100	35	80	94	100	64	47

L'évolution de l'activité protéolytique en fonction du pH des 4 différentes souches retenues représentée dans le tableau III.3 montre que toutes les souches produisent une ou plusieurs protéases actives dans une large gamme de pH allant de 7.0 à 12.0. Toutes ces préparations enzymatiques sont quasiment stables et

montrent des activités relatives de l'ordre de 100% à pH 10 pour la souche DZ007 et DZ100 contre 56 et 85% pour les souches DZ020 et DZ055.

L'activité de la souche DZ100 est optimale à 10 et garde le maximum de son activité dans un intervalle de pH (8 à 11). Par contre, les souches DZ020 et 055 secrètent des enzymes possédant un pH optimum de fonctionnement basique (8 et 9) et ne conservent que la moitié de leur activité dans un domaine de pH plus étroit (7 à 10). Ces résultats coïncident avec les travaux de Bouacem *et al.* [181, 189]. Ils ont montré que l'extrait enzymatique de *Caldicoprobacter guelmensis* sp. nov. D2C22^T n'est pas aussi active que celles obtenues par nos souches surtout dans la zone de pH de 7 à 9. A pH 7, l'activité protéolytique n'est que de 20% pour sp. nov. D2C22^T. Par contre l'activité de l'extrait enzymatique de *Bacillus pumilus* CBS [112, 190] à la même valeur de pH est de 71%. Par ailleurs, les protéases produites par *Bacillus alcalophilus*, qui sont des protéases à sérine, sont stables et actives dans une gamme de pH variant de 6 et 12 [191-193].

La stabilité des extraits protéolytiques des 4 différentes souches retenues vis-à-vis du pH a été déterminée par pré-incubation des extraits enzymatiques dans des tampons à différents pH allant de 7 à 12 pendant 1h et à 40°C (pratiquement toutes les préparations sont stables à cette température). Les activités résiduelles ont été mesurées dans les conditions optimales de température et de pH de chaque préparation.

L'analyse des résultats représentés sur la figure 3.3, montre que toutes les extraits enzymatiques sont stables et présentent des activités résiduelles de l'ordre de 100% à pH 7. Puis la stabilité diminue considérablement pour le pH 11 avec des activités résiduelles, nulles pour la souche DZ020 et variables pour de 12, 33 et 45% respectivement pour les souches DZ007, DZ055 et DZ100. On constate que la souche DZ100 s'avère la plus stable sur cette large gamme de pH.

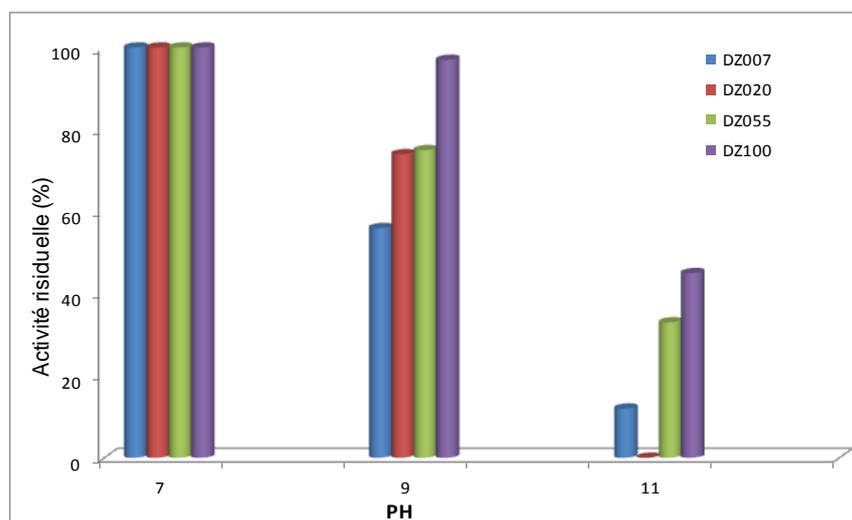


Figure 3.3 : Effet du pH sur la stabilité des extraits enzymatiques des 4 souches retenues (DZ007, DZ020, DZ055 et DZ100).

Ceci nous permet de dire que les extraits enzymatiques issues des 4 souches Z007, DZ020, DZ055 et DZ100 présentent l'avantage de pouvoir être utilisées dans une large gamme de pH et pour de nombreuses applications industrielles.

3.1.4.2. Étude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité des préparations protéolytiques

L'effet de la température sur l'activité protéolytique des différents extraits enzymatiques a été également étudié à des températures de 40, 50, 60, 70 et 80 °C et au pH optimum pour chaque préparation. Les résultats de cette étude sont regroupés dans le tableau 3.4

Tableau 3.4 : Tableau récapitulatif des activités relatives des extraits enzymatiques des 4 souches bactériennes retenues en fonction de la température.

Souche	Activité relative (%) en fonction de la température				
	40	50	60	70	80
DZ007	40	80	100	35	10
DZ020	50	100	96	5	0
DZ055	90	100	70	25	5
DZ100	78	100	80	10	0

L'analyse des résultats mentionnés dans le tableau III.4 montre que la plus part des extraits enzymatiques étudiées ont une température optimale d'action de 50 °C, excepté celle issu de la souche DZ007 possédant un optimum de

température de 60 °C. En effet, les souches DZ055 et DZ100 produisent une enzyme qui semble être la plus intéressante puisqu'elle est active dans une large gamme de température allant de 40 à 70 °C. Ainsi, l'extrait enzymatique issue de la souche DZ055 garde 90 et 70% de son activité à 40 et 60 °C respectivement ; alors que celle de la souche DZ100 garde uniquement 78 et 80% dans les mêmes conditions.

Les protéases sécrétées par les souches bactériennes nouvellement isolées présentent un optimum d'activité dans un intervalle de températures située entre 40 et 60 °C. Cela nous permet de les classer parmi les enzymes modérément thermostables. Ces résultats se rapprochent à ceux trouvés par Gupta et al (2002 b) [4]. Ils ont montré que les températures optimales de production des protéases alcalines varient de 35 à 60 °C. Par ailleurs, les travaux effectués par Johnevesly et Naik (2001) ont montré que la température optimale de la protéase produite par la souche *Bacillus* sp. JB-99 est de 70 °C [194].

En plus, la stabilité thermique a été étudiée suite à une pré-incubation des extraits enzymatiques pendant 1 h à 30, 40, 50 et 60 °C en présence et en absence du calcium à une concentration de 5 mM. Les résultats de cette étude sont représentés sur la figure 3.4.

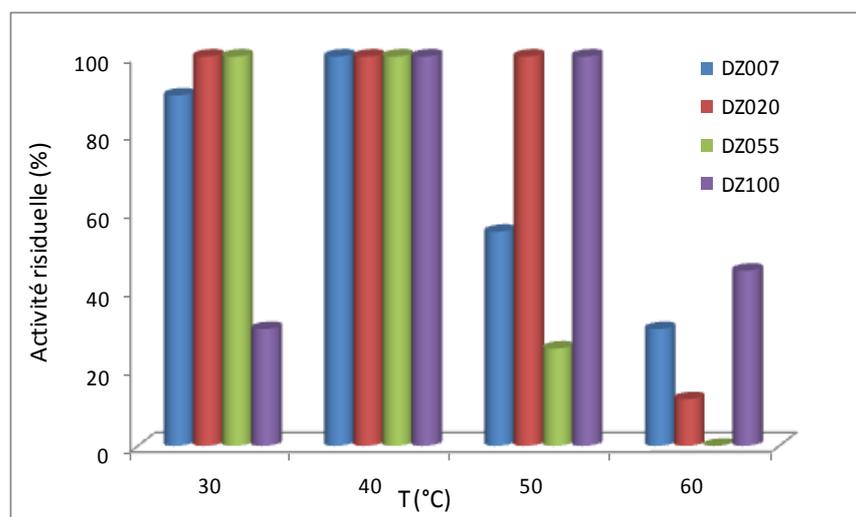


Figure 3.4 : Effet de la température sur la stabilité des extraits enzymatiques des 4 souches retenues.

On constate que tous les extraits enzymatiques demeurent, pratiquement, stables pendant 1 h à 40 °C avec 100% d'activité résiduelle. A 50 °C, les

préparations issues des DZ020 et DZ100 gardent 100% de leur activité alors que la souche DZ007 conserve 55% de son activité, respectivement. Dans les mêmes conditions, l'extrait protéolytique de la souche DZ055 montre une chute de l'activité résiduelle de l'ordre de 25%. La préparation de la souche DZ055 est instable et son activité s'annule après 1 h de pré-incubation à 60 °C. Par contre, les souches DZ007 et 100 gardent 30 et 45% de leur activité.

De nombreuses études ont démontré la tolérance des protéases alcalines vis-à-vis des hautes températures notamment celles produites par le genre *Bacillus* [4]. En effet, la protéase de *Bacillus alcalophilus* est stable pour des hautes températures jusqu'à 70°C et perd 50% de son activité lorsqu'elle est chauffée à 84 °C pendant 15 minutes [193].

Le phénomène de la thermostabilité dépend de plusieurs paramètres tels que la structure conformationnelle de l'enzyme et du microenvironnement où elle se trouve. Donc le mécanisme d'inactivation des protéases produites par DZ020 et DZ055 peut être expliqué par la destruction des liaisons non covalentes responsables du maintien de la conformation active à leur température optimale. Cette modification est souvent irréversible, se manifeste par une agrégation suivie d'une précipitation de l'enzyme lorsqu'elle est soumise à des températures élevées [181, 189].

A la lumière des études préliminaires du pH et de température, nous avons constaté que les préparations protéolytiques issues des deux souches DZ007 et DZ100 semblent être les plus intéressantes pour une éventuelle application en détergence par exemple, puisqu'elles présentent des optima d'activité au voisinage de pH 8 à 10 et stables à la variation de la température.

3.1.4.3. Étude de l'effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité des préparations protéolytiques

Plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases microbiennes exige la présence d'ions, tels que le calcium ou le fer [181, 189, 195]. Ceci nous a permis d'étudier l'effet de quelques ions métalliques tels que : $CuSO_4^{2-}$, $MgSO_4^{2-}$, $ZnSO_4^{2-}$, $CaCl_2^-$ et KCl^- sur l'activité catalytique à une concentration de 2 Mm aux conditions optimales (pH et température) de chaque souche.

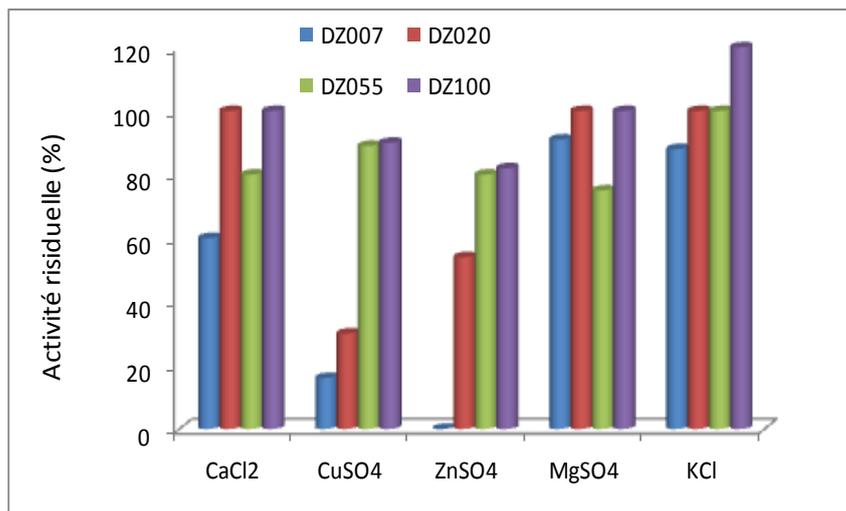


Figure 3.5 : Effet des ions métallique sur l'activité des souches retenues.

De l'analyse de la figure 3.5, il ressort que l'effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique est variable selon les souches. En effet, le cuivre et le zinc inhibent partiellement l'activité enzymatique de la souche DZ007 et DZ020. Par contre, la présence du calcium, magnésium et potassium stimule l'activité enzymatique de l'ensemble des souches retenues pour l'étude. Des résultats comparables ont été observés avec la protéase alcaline à sérine de la souche *Bacillus* sp. KSM-K16 où l'activité protéolytique est améliorée par les ions Ca^{2+} , Zn^{2+} et Cu^{2+} [196], les mêmes ions stimulent aussi l'activité des protéases produites par *B. amyloliquefaciens* [196, 197]. Cependant, l'extrait protéolytique de la souche *B. cereus* BG1 est considérablement activée par les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} et inhibée par les ions Zn^{2+} et Cu^{2+} [36].

Les peptidases à métal font partie des hydrolases pour lesquelles l'attaque nucléophile d'une liaison peptidique est réalisée par hydrolyse. C'est un cation métallique bivalent, le plus souvent le zinc mais aussi parfois le cobalt ou le manganèse, qui active la molécule d'eau. L'ion métallique se maintient en place à l'aide de ligands qui sont des acides aminés des chaînes latérales, normalement au nombre de trois [198-200].

Les métalloprotéases les plus étudiées sont actives dans des conditions de pH légèrement alcalins (7,0 à 9,0) [201-203], elles sont actives sur une large gamme de pH de 5 à 10. La stabilité augmente considérablement si du Ca^{2+} est ajoutée au milieu de culture [36].

En plus, Le Ca^{2+} joue un rôle important dans le maintien de l'activité protéolytique des protéases alcalines à serines par stabilisation de la conformation active de l'enzyme, sans être impliqué dans la réaction catalytique [204-206]. Cependant, la classification de cette préparation enzymatique nécessite des études plus poussées tel que la purification de la protéase, sa caractérisation biochimique et son identification moléculaire.

A la lumière des études préliminaires de la stabilité notamment vis-à-vis du pH et de la température, nous avons constaté que l'extrait protéolytique issue de la souche DZ100 semble être la plus intéressante pour une éventuelle application en détergence, en tannerie ou en dépollution, puisqu'elle présente des optima d'activité au voisinage de pH 9 à 11 et plus au moins stable à la variation de la température avec un optimum se situant entre 30 et 60 °C.

3.1.5. Identification de la souche DZ100

Afin d'identifier la souche DZ100, nous avons eu recours à des approches morphologiques, physiologiques et moléculaires.

3.1.5.1. Caractérisation morphologiques et physiologiques

L'observation microscopique, à l'état frais, a montré que la souche DZ100 est une bactérie en forme de bacille (figure 3.6).

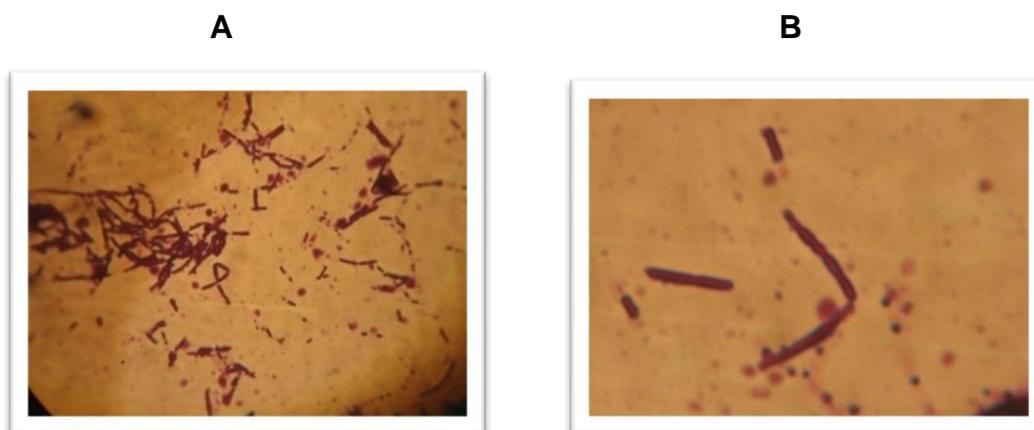


Figure 3.6 : **(A)** Aspect des cellules bactériennes de la souche DZ100 sous microscope optique $G \times 100$ (Photos originales). **(B)** zoom de la photo.

Par la suite, nous avons effectué des tests bactériologiques préliminaires d'orientation afin de choisir la galerie API adéquate. Cette analyse a révélé qu'il s'agit d'une souche aérobie, mobile, Gram positive et sporulante (tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Résultats préliminaires des tests d'identification.

Test	Résultat
Observation à l'état frais	Forme de bacille de petite taille
Coloration de Gram	+
Spore	+
Catalase	+
Oxydase	+
Mannitol	+
Mobilité	Immobile

Ainsi, en se référant aux résultats décrits dans le manuel de Bergey's de la Bactériologie Systématique [160, 207] il a été suggéré que la souche DZ100 est une bactérie appartenant au groupe *Bacillus*. A la lumière de ces résultats, nous avons choisi la galerie adéquate en l'occurrence la galerie API 50 CH (tableau III.6).

Tableau 3.6 : Résultats de la galerie API 50 CH (fermentation de 49 carbohydrates) de la souche DZ100.

Carbohydate	Résultats du test	Carbohydate	Résultats du test
Aesculine	+	Glycérol	-
Salicine	+	Erythritol	-
Cellobiose	+	D-Arabinose	+
Maltose	+	L-Arabinose	-
Lactose	-	Ribose	+
Saccharose	+	D-Xylose	+
Trehalose	+	L-Xylose	+
Gentibiose	+	Adonitol	-
Melibiose	-	Béta-Méthyl xyloside	-
Raffinose	-	Galactose	-
Melezitose	-	Glucose	+
Amidon	+	Fructose	+
Glycogène	+	Mannose	+
Inuline	-	L-Sorbose	-
D-Turanose	+	Rhamnose	+
D-Tagatose	+	Dulcitol	-
D-Fucose	-	Inositol	-
L-Fucose	+	Sorbitol	+
D-Lyxose	-	Mannitol	+
D-Arabitol	+	L-Méthyl-D-mannoside	+
L-Arabitol	-	D-Méthyl-D-glucoside	-
Xylitol	-	N-Acétyl glucosamine	+
Gluconate	+	Amygdaline	+
2-Céto gluconate	-	Arbutine	+
5-Céto gluconate	-		

3.1.5.2. Identification moléculaire par la technique de l'ARNr 16S

Dans le but d'identifier de manière plus précise l'espèce de la souche DZ100, nous avons utilisé la méthode d'identification moléculaire (l'ARN ribosomique : ARNr). Cette méthode est considérée actuellement comme méthode rapide et plus fiable pour la détermination de l'espèce. En plus, elle permet la réalisation des études phylogénétiques comparées aux techniques classiques de la taxonomie [208, 209]. De ce fait, pour amplifier tout le gène de l'ARNr 16S par PCR, nous avons choisi un couple d'amorces (Directe, Oligo F-S73 et Reverse, Oligo R-S74) dont les séquences appartiennent aux régions conservées flanquant ce gène. Ainsi, nous avons amplifié un fragment d'ADN de taille attendue estimée à ~1,5 kb (figure 3.7).

Oligo F-S73 : 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG^{3'} (Position 8 à 27 chez *E. coli*).

Oligo R-S74 : 5'AAGGAGGTGATCCAAGCC^{3'} (Position de 1541 à 1525 chez *E. coli*).

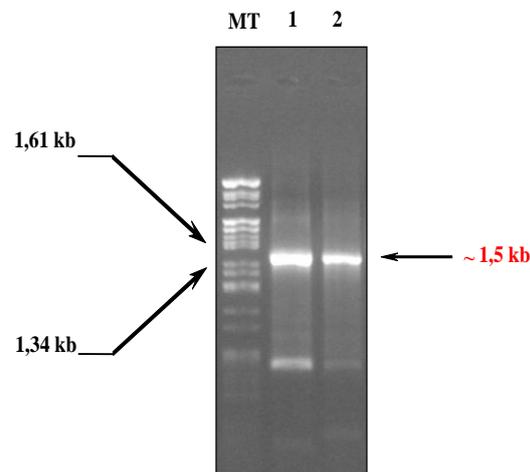


Figure 3.7 : Analyse du produit PCR de l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche DZ100. Piste 1:Produit PCR avec *Taq* polymérase ; Piste 2: Produit PCR avec *pfu* polymérase ; Piste MT: Marqueur de taille λ -*HindII* (4,58 ; 3,51 ; 3,27 ; 2,84 ; 2,19 ; 1,96 ; 1,79 ; 1,67 ; 1,61 ; 1,34 ; 1,26 ; 1,1 ; 0,86 ; 0,73 ; 0,56 kb).

Ce fragment PCR a été purifié puis cloné dans un vecteur approprié, en l'occurrence le pGEM-T, pour générer le plasmide pDZ-16S de taille 4535 pb (Figure 3.8).

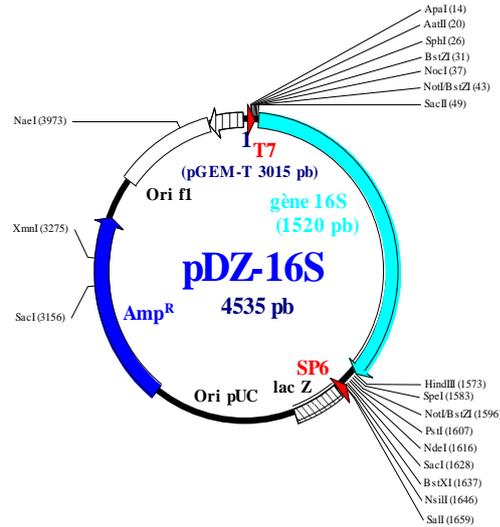


Figure 3.8 : Cadre de restriction du plasmide pDZ-16S (4535 pb).

Par la suite, la séquence nucléotidique totale de ce fragment a été déterminée moyennant les techniques de séquençage automatique (figure 3.9). La séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche DZ100 a été déposée dans la banque de données « GenBank BLAST » sous le numéro d'accèsion **KC621293**.

```
GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTGATACATGCAAGTCGAGCGGACTTTAAA
AGCTTGCTGTTCAAGTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TTCGGGAAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGACGGTTTACGC
TGTCACCTACAGATGGGCCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACAGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTCCGGATCG
CAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACCTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAA
GCCACGACTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCG
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTCCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAA
ACTGGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGAAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAG
TGCTGCAGCAAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAGTTGAC
GGGGCCCCGCACAAGCGGTGGGGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
ATCCTCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG
CCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCGGATCTTAGTTGGCAGCATT
CAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAAGGGCAGCAAACCGCGAGGTCGAGCA
AATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCCGGTTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGTCCACACCGCCCGTACACCACGAGAGT
TTGTGACACCCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACGATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG
CCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACGC
```

Figure 3.9 : Séquence nucléotidique du gène d'ARNr 16S (1520 pb) de la souche DZ100.

L'alignement de cette séquence est réalisé avec la banque de données GenBank BLAST. Cette dernière est considérée plus sûre étant donné qu'elle englobe les séquences des bactéries de référence qui sont bien expertisées et revérifiées par des spécialistes. L'analyse des résultats obtenus montre que la souche DZ100 présente une identité très importante (99%) avec les gènes d'ARNr 16S des souches de *Bacillus* notamment celles de l'espèce *circulans* à savoir : *Bacillus circulans* NBY8 (numéro d'accèsion : HQ851051), *Bacillus circulans* IAMI12462^T (numéro d'accèsion : D78312), *Bacillus circulans* N3 (numéro d'accèsion : AB215100), *Bacillus circulans* BP9_5B (numéro d'accèsion : JN644554) et *Bacillus circulans* Jz12 (JF833093).

Ces séquences ont été importées et alignées dans une version du logiciel MEGA 4.1. L'arbre phylogénétique a été ensuite construit (figure 3.10) et les résultats en outre ont confirmé que la souche DZ100 (numéro d'accèsion : KC621293) est étroitement liée aux autres souches de *Bacillus circulans*.

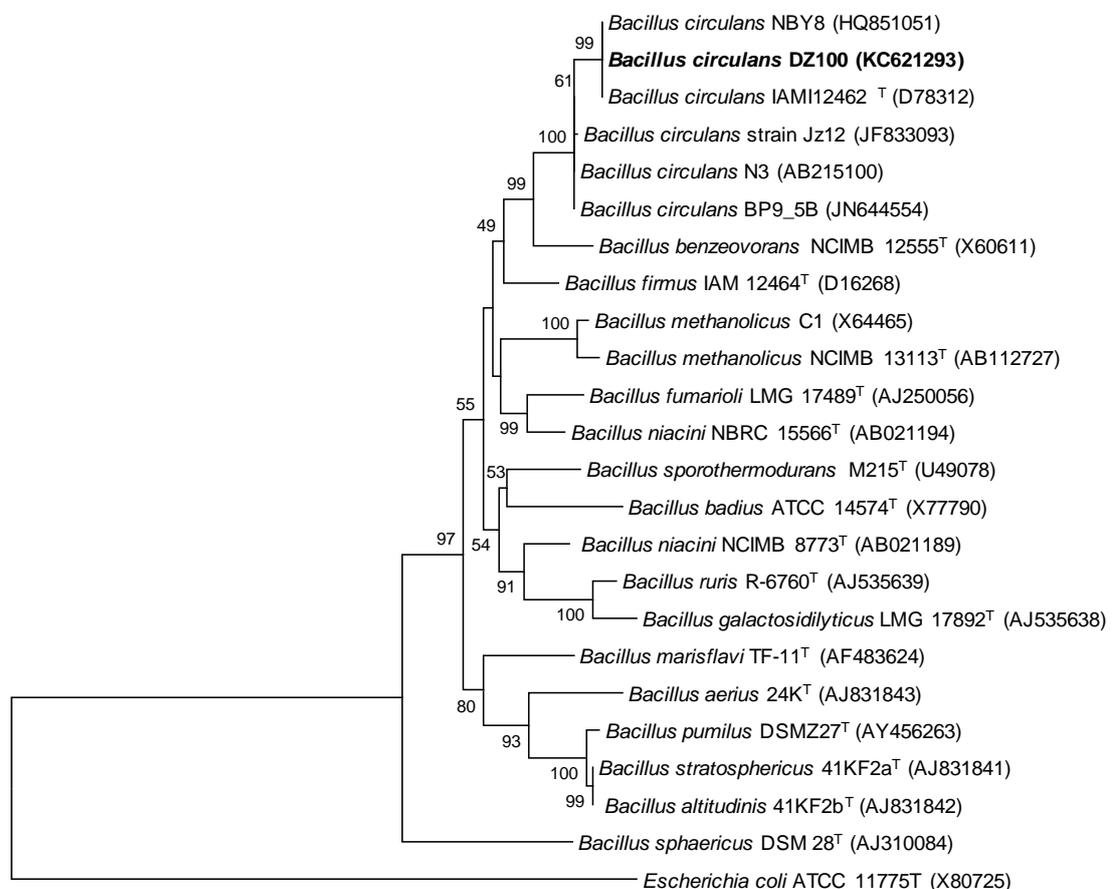


Figure 3.10 : Arbre phylogénétique obtenu après alignement du gène de l'ARNr 16S de la souche DZ100.

3.1.6. Optimisation de la production de protéases de la souche *Bacillus circulans* DZ100

La production des protéases par les souches protéolytiques est influencée d'une part, par les conditions physiques à savoir la température, le pH et l'aération et d'autre part, par la composition chimique des milieux de culture [162, 210]. En fait, un milieu de culture doit contenir une source de carbone, une source d'azote et des sels minéraux exigés pour la croissance et pour l'induction de l'enzyme [211]. Il doit également contenir des substances inductrices de la production d'enzymes et des facteurs de croissance, susceptibles d'intervenir dans le métabolisme des substrats utilisés [212, 213].

Au cours de cette partie, nous nous sommes proposé d'évaluer la production de protéases par la souche de *Bacillus circulans* DZ100. Au fait nous avons commencé par un milieu initial (non optimisé) composé de : 5 g/l source de carbone ; 2 g/l source d'azote ; 2 g/l sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$; 2 g/l CaCl_2 ; 0,5 g/l K_2HPO_4 et 0,5 g/l KH_2PO_4 à pH 10. A partir de ce milieu nous avons alors cherché à optimiser les différents composants.

3.1.6.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production de protéases

La production de protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été testée sur le milieu de base en variant les sources de carbone : caséine, gélatine, glucose, galactose, fructose et lactose à raison de 5 g/l. Le niveau de production de protéases, de la croissance de la souche DZ100 ainsi que le pH final de la culture ont été déterminés et l'ensemble des résultats sont consignés dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7: Effet de différentes sources de carbone sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases.

Source de carbone (5 g/l)	Témoin sans addition	Caséine	Glucose	Galactose	Gélatine	Fructose	Lactose
Activité protéase (U/ml)	410	4500	250	1500	1200	2200	1730
Absorbance à 600 nm	4,62	7,88	3,15	7,01	6,41	6,78	7,23
pH final	8,45	10,11	8,01	9,22	9,16	9,20	9,11

L'analyse des résultats présentés sur ce tableau met en évidence une bonne croissance de la souche DZ100 sur les différents substrats carbonés testés. En effet, une meilleure production (environ 4500 U/ml) et une croissance significative (absorbance à 600 nm de 7,88) sont observées sur milieu à base de caséine. Par conséquent, la caséine représente la source de carbone la plus adéquate pour la production de protéases et la croissance de DZ100. Cette affinité vis-à-vis de la caséine peut être expliquée par l'existence de substances bioactives (polypeptides et Aa) et catalytique issue de la protéolyse de la caséine qui favorisent la production de protéases par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

3.1.6.2. Effet de la concentration de la caséine sur la production de protéases

Etant donné, que la meilleure production est obtenue sur le milieu initial en présence de caséine, nous étions amenés à chercher la concentration optimale en caséine (de 0 à 30 g/l) pour une production maximale dans le milieu initial (tableau 3.8).

Tableau 3.8_: Optimisation de la concentration de la caséine pour la croissance et la production de protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Concentration de la caséine (g/l)	0	5	10	15	20	25	30
Activité protéase (U/ml)	401	4554	6350	7655	6300	6200	6050
Absorbance à 600 nm	4,81	7,69	7,85	8,14	8,90	8,55	8,05
pH final	8,57	10,05	10,07	10,12	9,59	9,25	9,01
Rendement (10^3 U protéase/g de la caséine ajoutée)	0	910,8	635	510,3	315	248	201,6

Les résultats présentés sur ce tableau montrent que la croissance bactérienne et la production de protéases par la souche de *Bacillus circulans* DZ100 augmentent avec la concentration en caséine jusqu'à 15 g/l. En effet, l'augmentation de la production est significative pour des concentrations supérieures à 5 g/l et atteint un maximum de 7655 U/ml à 15 g/l. Au delà de 15 g/l, on observe une diminution de la production.

A partir des résultats obtenus on constate que la caséine est la source de carbone la plus adéquate à 15 g/l.

3.1.6.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases

L'effet de différentes sources d'azote organique (extrait de bœuf, extrait de levure, peptone de viande et peptone de soja) et inorganique [nitrate de sodium (NaNO_3) et chlorure d'ammonium (NH_4Cl)] sur la croissance et la production de la protéase par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été étudié, à raison de 2 g/l. Les résultats obtenus ont été comparé à une culture témoin (0 g/l de source d'azote (tableau 3.9).

Tableau 3.9 : Effet de différentes sources d'azote sur la production de protéases par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

Source d'azote (2 g/l)	Témoin sans addition	Extrait de bœuf	Extrait de levure	Peptone de soja	Peptone de viande	NH_4Cl	NaNO_3
Activité protéase (U/ml)	810	1635	3500	8350	2500	1085	977
Absorbance à 600 nm	5,11	8,05	8,01	8,22	7,90	6,80	4,20
pH final	8,79	8,45	8,14	10,14	9,92	9,84	8,82

L'analyse des résultats présentés sur ce tableau 3.9 montre que la meilleure production de protéases par la souche *Bacillus circulans* DZ100 (8350 U/ml) est obtenue lorsque la peptone de soja est utilisée comme source d'azote. Ainsi, elle est retenue comme source d'azote dans la suite de ce travail.

3.1.6.4. Effet de la concentration de peptone de soja sur la production de protéases

La concentration de peptone de soja comme source d'azote a été optimisée sur milieu initial à des concentrations allant de 0 à 15 g/l (tableau 3.10).

Tableau 3.10 : Optimisation de la concentration de peptone de soja sur la croissance bactérienne et sur la production de protéases par la souche de *Bacillus circulans* DZ100.

Concentration de peptone de soja (g/l)	0	2	4	5	6	7	8	10	15
Activité protéase (U/ml)	852	8355	9150	10250	11130	12500	10050	9250	9200
Absorbance à 600 nm	5,25	8,16	8,10	8,06	8,44	8,51	8,11	8,06	8,02
pH final	8,49	10,05	10,10	10,11	10,14	10,16	10,08	9,81	9,53
Rendement (10^3 U protéase/g de peptone de soja ajouté)	0	4177,5	2287,5	2050	1855	1785,7	1256,2	925	920

L'analyse des résultats montre qu'il ya une meilleure production de protéases avec la concentration en peptone de soja et atteint 12500 U/ml pour une concentration de 7 g/l. Ces résultats montrent également une augmentation de la biomasse (DO à 600 nm = 8,51) avec la concentration en peptone de soja jusqu'à 7 g/l.

3.1.6.5. Optimisation de la concentration en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 et NaCl sur la production de protéases

Afin de mettre en évidence l'importance du manganèse, calcium, du phosphore, du potassium et du sel nous avons étudié l'effet de concentrations croissantes en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0 à 5 g/l), $CaCl_2$ (0 à 10 g/l), K_2HPO_4 (0 à 5 g/l), KH_2PO_4 (0 à 5 g/l) et du sel (0 à 10 g/l) sur la production et l'activité protéasique. Cette étude a montré, que la production de l'activité protéasique est optimale (15000 U/ml) pour les concentrations de 1 g/l en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g/l en $CaCl_2$; 1 g/l en K_2HPO_4 ; 1 g/l en KH_2PO_4 ; et 3 g/l en NaCl. Au-delà de ces concentrations, le niveau de production et de biomasse diminuent comparativement aux travaux réalisés sur la production de protéases à partir de la souche *Bacillus pumilus* CBS [112, 115].

A la lumière de cette optimisation un nouveau milieu optimisé de composition (en g/l) : 15 caséine ; 7 peptone de soja; 1 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 $CaCl_2$; 1 K_2HPO_4 ; 1 KH_2PO_4 ; et 3 NaCl à pH 10 a été retenu pour la suite du travail puisqu'il permet une meilleure croissance (DO = 9,55) et une production de protéases maximale (**15000 U/ml**).

3.1.7. Cinétique de production de protéase et de croissance bactérienne de la souche de *bacillus circulans* DZ100

La culture de la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été incubée à une température optimisée de 37°C dans des Erlenmeyer de 500 ml avec un volume utile de 50 ml et sous une agitation de 250 rpm. Des dosages d'activité protéolytique et de l'absorbance sont effectués chaque 2 h (figure 3.11).

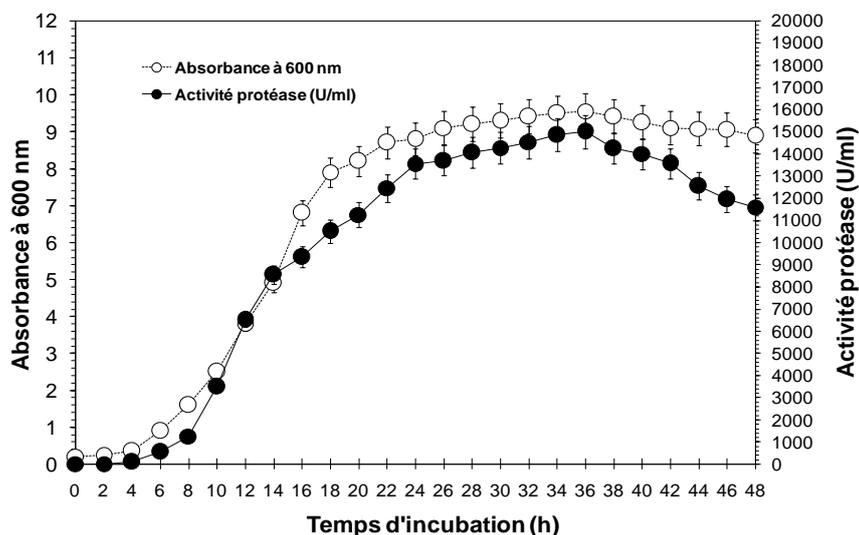


Figure 3.11 : Cinétique de production de protéases et de croissance bactérienne de la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Le suivi de production de protéases et de la croissance bactérienne de la souche *Bacillus circulans* DZ100 en fonction du temps montre que la sécrétion de protéases commence après une phase de latence de 4 h et dès le début de la phase de croissance exponentielle (figure 3.11). Elle évolue par la suite de façon concomitante avec la croissance bactérienne et atteint son maximum d'activité (**15000 U/ml**) après **36 h** de culture avec une DO à 600 nm d'environ **9,55**. Ainsi, le maximum de croissance coïncide avec le maximum d'activité enzymatique.

Au-delà de cette période, la production commence à diminuer légèrement. Cette diminution est probablement due à l'action protéolytique d'autres protéases libérées lors de la lyse cellulaire et/ou la sporulation.

3.1.8. Conclusion

Cette étude a visé l'isolement, le criblage ainsi que l'identification d'une souche bactérienne protéolytique produisant une enzyme active et stable à des pH alcalins. En effet, à partir de 135 souches testées sur gélose nutritif au lait (test semi-qualitatif), 12 souches ont été retenues du fait qu'elles présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier critère de sélection) supérieure à la souche de référence (AB1). Ces 12 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 4 souches intéressantes à savoir : DZ007, DZ020, DZ055 et DZ100 vue qu'elles présentent un niveau de production supérieur à 226.54 U/ml (constitue un deuxième critère de sélection). Ensuite, la

souche DZ100 a été retenue du fait qu'elle produit une protéase active et stable dans une large gamme de pH alcalins (9,0-11,0) et de températures élevées (30-60 °C).

L'identification de cette souche a été basée sur les méthodes cataboliques par galeries API CH50 d'une part, et sur les méthodes de biologie moléculaire par détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S, d'autre part. Les résultats obtenus ont permis d'identifier la souche *Bacillus* DZ100 en tant qu'une sous espèce de *Bacillus circulans*.

Cette souche apte à être active dans des conditions extrêmes de pH et température sera bien étudiée dans les deux parties qui suivent à savoir, la purification et la caractérisation des enzymes protéolytiques et leurs introductions dans des applications industrielles notamment le traitement du cuir et la détergence.

Chapitre 3-2

CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DE LA PROTÉASE SAPDZ PRODUITE PAR LA SOUCHE DE *BACILLUS CIRCULANS* DZ100

3.2.1. Introduction

D'après les résultats obtenus dans la première partie du chapitre III, la souche de *Bacillus circulans* DZ100 s'avère être la plus active. En effet, elle secrète une protéase alcaline thermoactive et thermostable (nommée **SAPDZ** : **Serine Alkaline Protease** de *Bacillus circulans* **DZ100**), intéressante pour l'introduire dans une application industrielle. Cela nous a amené à l'extraire et la purifier afin de mieux approfondir ses caractéristiques. Ainsi, cette partie est réservée à la caractérisation physico-chimique, cinétique et moléculaire de cette nouvelle enzyme, et de son éventuelle utilisation en tant que bio-additif en industrie.

3.2.2. Purification et caractérisation biochimique de protéases de la souche *bacillus circulans* DZ100

3.2.2.1. Rappel

A la lumière des résultats de la caractérisation des différentes préparations enzymatiques des souches isolées, la souche DZ100 identifiée comme étant *Bacillus circulans*, s'avère être la plus intéressante en tant que meilleure candidate pour l'hydrolyse de protéines. Elle secrète une ou plusieurs protéases alcalines actives qui seraient intéressantes sur le plan recherche fondamentale et sur le plan application industrielle. Ceci nous a conduit à sa purification et à sa caractérisation (physico-chimique, cinétique et même moléculaire) et de son éventuelle utilisation dans le domaine industriel.

3.2.2.2. Purification des protéases de *Bacillus circulans* DZ100

Il est à noter que l'extrait brut de protéases (SAPDZ) a servi pour purifier à homogénéité chaque protéase en suivant le protocole de purification qui comporte quatre étapes à savoir, un traitement thermique (30 min à 80°C), une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40% à 70%), une chromatographie sur une

colonne de filtration sur gel (Bio-Sil SEC 125) en utilisant le système HPLC. suivie d'une chromatographie échangeuse de cations (Mono S - Sepharose).

3.2.2.2.1. Traitement thermique

Le surnageant de culture de 500 ml de 36 h faite sur bouillon à pH 10 constitue les extraits bruts enzymatiques. Le surnageant ayant une activité enzymatique spécifique de 1225 U/mg a subi un traitement thermique à 80°C pendant 30 min, puis centrifugé pendant 30 min à 14000 rpm. Le surnageant contenant l'activité est récupéré pour la suite de la purification. Cette opération a pour but de précipiter une part importante de protéines du surnageant par dénaturation thermique, ce qui a permis l'augmentation de l'AS de 1225 U/mg à 6496 U/mg (Tableau 3.11).

3.2.2.2.2. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les protéines contenues dans le surnageant récupéré après traitement thermique sont précipitées avec le sulfate d'ammonium entre 40% et 70%. Les protéines précipitées à 40% ne contiennent pas d'activité protéolytique alors que le culot obtenu à 70%, contient l'activité. Ce dernier, est récupéré dans le minimum du tampon Tris-HCl, additionné avec 5 mM CaCl₂ et 10 mM NaCl à pH 5,5 (**tampon B**) puis dialysé contre le même tampon une nuit à 4°C à fin d'éliminer toute trace de sel. La précipitation fractionnée a permis d'éliminer environ 88% de la quantité initiale des protéines avec un rendement d'activité protéolytique 75%. Le facteur de purification est de l'ordre de 10,98 (AS = 13456 U/mg).

3.2.2.2.3. Chromatographie d'exclusion diffusion sur Bio-Sil SEC - HPLC

La fraction obtenue lors de l'étape précédente a été déposée sur une colonne de filtration sur gel Bio-Sil SEC 125 (7,8 mm x 300 mm) préalablement équilibrée avec le tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) contenant 5 mM CaCl₂ et 25 mM NaCl (**tampon C**) en utilisant le système HPLC.

L'élution des protéines est effectuée avec le même tampon avec un débit de 30 ml/h. Des fractions de 1,8 ml sont collectées et analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm et de l'activité protéolytique sur la kératine azure.

Le profil d'élution (figure 3.12), montrent que l'enzyme est éluée entre 1,8 et 2,1 V_0 . Le rendement en activité protéolytique est de 60% avec un facteur de purification de 55.65 fois. L'activité spécifique de l'enzyme est estimée à 68181 U/mg.

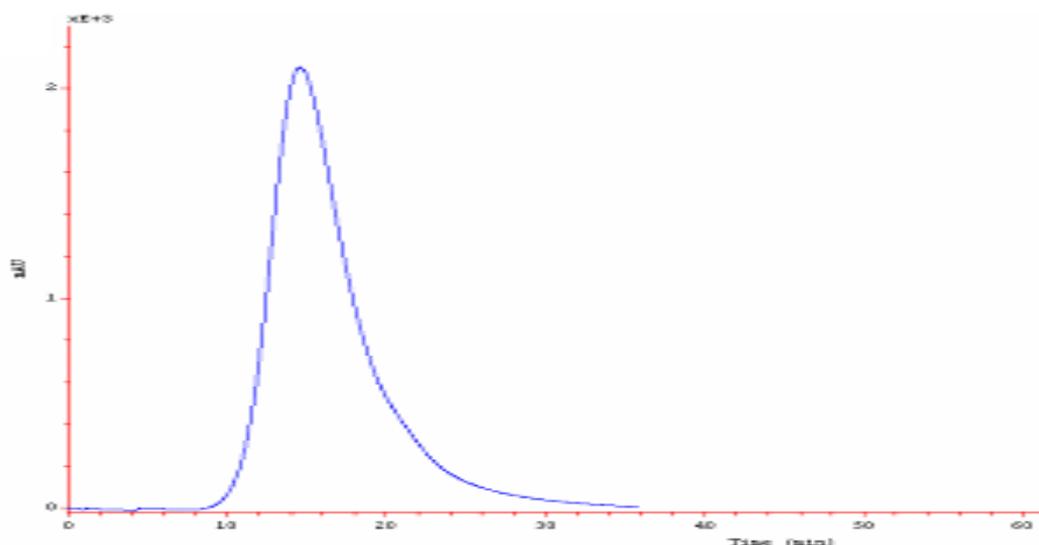


Figure 3.12 : Profil d'élution de la fraction active après sortie d'une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel de l'activité protéase (temps de rétention = 15 min), en utilisant le système HPLC. La colonne Bio-Sil SEC 125 est pré-équilibrée par le tampon B. Le débit d'élution est de 30 ml/h et la détection des protéines se fait à 280 nm.

3.2.2.2.4. Chromatographie échangeuse de cations sur Mono S - Sepharose

Le surnageant récupéré après l'étape de gel de filtration est alors déposé sur une colonne de Mono S – Sepharose (2,6 cm × 50 cm), préalablement équilibrée avec le tampon C. L'élution des protéines, avec le même tampon contenant une concentration croissante de NaCl de 0 à 500 mM, se fait à un débit de 35 ml/h et est suivie par la lecture de la DO à 280 nm et le test d'activité protéasique (la figure 3.13). Le rendement en activité protéolytique est de 25% avec un facteur de purification de 61,22 fois. L'activité spécifique de l'enzyme est estimée à 75000 U/mg. La fraction active, éluée entre 140 et 200 mM NaCl, est rassemblée et utilisée pour la caractérisation biochimique de cette enzyme.

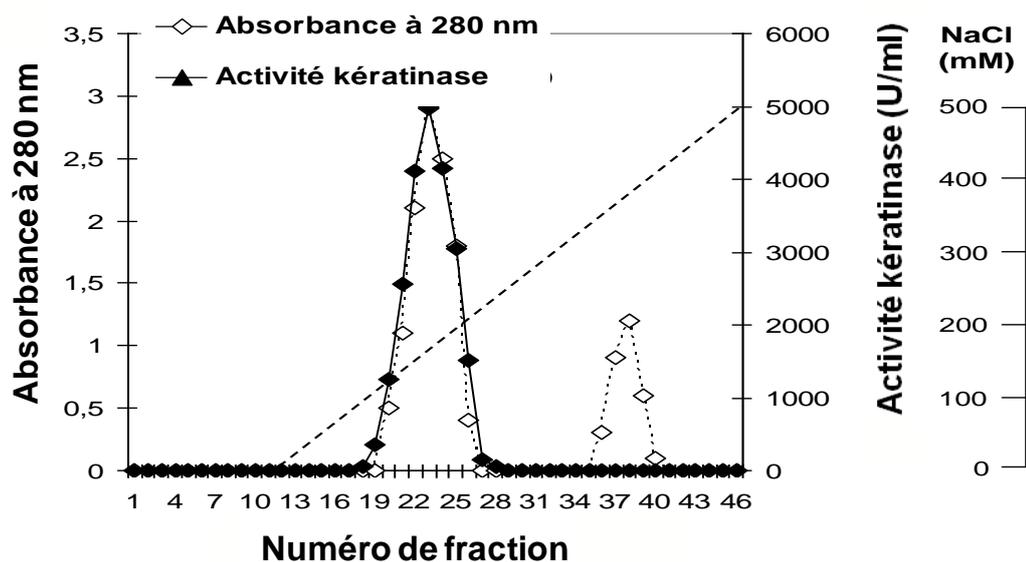


Figure 3.13 : Profil de chromatographie sur Mono S - Sepharose de la purification de la protéase SAPDZ de la souche DZ100.

3.2.2.2.5. Bilan de purification

Le bilan de purification de la protéase SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100 est représenté dans le tableau 3.11.

Tableau 3.11 : Bilan de purification de la protéase SAPDZ100 produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Etape de purification	Activité totale (U) $\times 10^3$	Quantité de protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification (fois)
Extrait cellulaire	7500 \pm 40	6120 \pm 85	1225 \pm 115	100	1
Traitement thermique (80°C pendant 30 min)	6600 \pm 31	1016 \pm 32	6496 \pm 458	88	5,30
Précipitation fractionnée au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40% - 70%)	5625 \pm 23	418 \pm 11	13456 \pm 612	75	10,98
HPLC (Bio-Sil SEC 125-5)	4500 \pm 19	66 \pm 4	68181 \pm 790	60	55,65
Mono S Sepharose	1875 \pm 10	25 \pm 1	75000 \pm 916	25	61,22

3.2.2.2.6. SDS/PAGE et zymogramme

Afin d'évaluer le degré de pureté de la SAPDZ et de déterminer sa taille, nous avons analysé des aliquotes qui sont conservés après chaque étape de purification et ont servi pour l'analyse par électrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (15%) dans les conditions natives (PAGE) et dénaturantes (SDS-PAGE).

Les profils électrophorétiques montrent que la SAPDZ se présente sous une seule bande majoritaire et homogène de taille apparente de 32 kDa (figure 3.14 A et B). Cette même masse moléculaire a été estimée par filtration en utilisant le système HPLC. L'activité a été vérifiée par zymogramme en utilisant l'azocaséine comme substrat.

3.2.2.2.7. Détermination de la taille exacte par MALDI-TOF/MS

L'analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF/MS) montre que la masse moléculaire exacte de la SAPDZ est 32019,10 Da (figure 3.14 C).

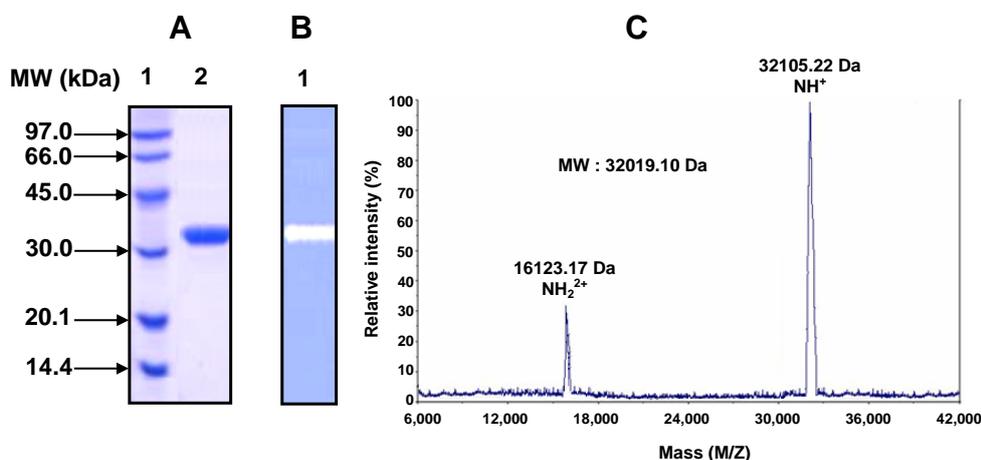


Figure 3.14: Analyse par SDS/PAGE de SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Ces résultats montrent que l'enzyme SAPDZ se présente sous forme d'un seul monomère, comme toutes les protéases déjà décrites, tout particulièrement celles provenant du genre *Bacillus* [112, 214].

3.2.2.3. Séquençage de l'extrémité NH₂-terminale de SAPDZ

Les 25 premiers acides aminés de l'extrémité NH₂-terminale de SAPDZ ont été identifiés : **AQTVPYGMAQIKDPAVHGQGYKGAN**. L'analyse de cette séquence a montré une uniformité, ce qui indique qu'elle a été isolée à partir d'une forme pure. En plus, elle présente une homologie significative avec les protéases alcalines issues des souches de *Bacillus* en particulier celles : *B. pumilus* CBS (numéro d'accèsion : CAO03040) (81% d'identité avec SAPDZ), *B. pumilus* K12 ((numéro d'accèsion : ADN04910) (83% d'identité avec SAPDZ) et *B. circulans* P1 (numéro d'accèsion : ADK11996) (84% d'identité avec SAPDZ).

En plus, le séquençage de SAPDZ montre quatre différences en termes de résidus d'acides aminés, à savoir M8I, A9P, D12A et G18A.

3.2.2.4. Effet des inhibiteurs spécifiques et des ions métalliques sur l'activité de la SAPDZ

Afin de mieux identifier la nature de cette enzyme, nous avons suggéré d'examiner un certain nombre d'inhibiteurs en fonction de leur effet sur l'activité enzymatique de SAPDZ. Les résultats obtenus présentés dans le tableau III.12 permettent de tirer les conclusions suivantes (en respectant un rapport molaire inhibiteur/SAPDZ = 100) :

- Le PMSF et le DFP inhibent complètement l'activité enzymatique. Ainsi, la protéase purifiée, comme toutes les protéases déjà décrites de *Bacillus circulans*, est une protéase à serine appartenant à la famille des subtilisines ;
- les inhibiteurs à thiol (2-ME, DTNB, NEM, EPNP, Iodoacetamide, Leupeptin), les inhibiteurs à acide aspartique (Pepstatin A), les inhibiteurs de la chymotrypsine (TPCK, TLCK), les inhibiteurs de la trypsine (SBTI), les Inhibiteurs compétitifs de la trypsine (Benzamidine) et les inhibiteurs à cystéine (MIA) n'ont aucun effet sur l'activité protéolytique de cette enzyme ;
- par contre, on remarque une légère diminution de l'activité en présence des inhibiteurs de métallo-protéases (EDTA, EGTA). Ceci suggère qu'un facteur métallique n'est pas impliqué dans l'activité protéolytique de cette enzyme.

Tableau 3.12: Effet de différents inhibiteurs et des agents réducteurs sur la stabilité de la SAPDZ purifiée produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100 (rapport molaire inhibiteur/protéase =100).

Inhibiteur/agent réducteur	Concentration	Activité résiduelle (%)
Témoin	–	100 ± 2,5
PMSF	5 Mm	0 ± 0,0
DFP	2 mM	0 ± 0,0
SBTI	2 mg/ml	104 ± 2,6
TLCK	1 mM	101 ± 2,5
TPCK	1 mM	98 ± 2,5
Benzamidine	10 mM	101 ± 2,5
MIA	50 µM	99 ± 2,5
<i>LD</i> DTT	10 mM	97 ± 2,5
2-ME	5 mM	98 ± 2,5
DTNB	10 mM	99 ± 2,5
EPNP	5 mM	101 ± 2,5
NEM	2 mM	96 ± 2,4
Iodoacétamide	5 mM	97 ± 2,5
Leupeptine	50 µg/ml	95 ± 2,4
Pepstatine A	2 µg/ml	101 ± 2,5
EDTA	10 mM	88 ± 2,1
EGTA	2 mM	90 ± 2,2

Plusieurs travaux ont montré que l'activité enzymatique de certaines protéases exige la présence de certains ions, tels que le calcium et le magnésium [6]. Ainsi l'effet de quelques ions métalliques (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} et Li^{+}) à une concentration de 5 mM, sur l'activité a été étudié. Les résultats soient consignés dans le tableau 3.13. On note que le Mn^{2+} et Ca^{2+} , active l'enzyme avec une augmentation considérable de 280 et 450% de l'activité enzymatique, respectivement. De tels effets s'observent aussi après l'addition de Zn^{2+} et Mg^{2+} qui montre une augmentation de l'activité relative jusqu'à 195 et 180%. Ces observations laissent supposer que ces ions divalents interviennent dans la stabilisation de l'enzyme. En plus à l'exception des ions bivalents (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} et Fe^{2+}) les ions monovalents, l'activité protéolytique n'est pas affectée. Par contre, elle est inhibée respectivement par : Ni^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+} à des concentrations de 5 mM. Des résultats similaires ont été observés avec la protéase produite par les *Bacillus pumilus* CBS [112].

Tableau 3.13 : Effet des ions métalliques sur l'activité de la SAPDZ purifiée produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Ion métallique (5 mM)	Activité résiduelle (%)
Témoin	100 ± 2,5
Ca ²⁺ (CaCl ₂)	450 ± 7,5
Mn ²⁺ (MnCl ₂)	280 ± 3,8
Mg ²⁺ (MgCl ₂)	195 ± 3,1
Zn ²⁺ (ZnCl ₂)	180 ± 4,2
Co ²⁺ (CoCl ₂)	113 ± 2,7
Cu ²⁺ (CuCl ₂)	110 ± 2,6
Ba ²⁺ (BaCl ₂)	99 ± 2,5
Fe ²⁺ (FeCl ₂)	98 ± 2,5
Ni ²⁺ (NiCl ₂), Cd ²⁺ (CdCl ₂), Hg ²⁺ (HgCl ₂)	0 ± 0,0
Li ⁺ (LiSO ₄), K ⁺ (KCl), Na ⁺ (NaCl)	100 ± 2,5

3.2.2.5. Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la SAPDZ

L'activité protéolytique de l'enzyme purifiée a été déterminée à des pH variant de 2 à 13. Les activités relatives comparées à l'activité optimale obtenue à pH 12,5, sont présentées sur la figure 3.15.

Les résultats montrent que la protéase SAPDZ est hautement active dans une gamme de pH variant de 9 et 12. Au-delà de cet intervalle, l'activité décroît considérablement. En plus on remarque que pour des pH inférieurs à 4, la protéase perd moins de 50% de son activité initiale.

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que la protéase produite par la souche DZ100 est une protéase fortement alcaline puisque l'optimum d'activité est observé à pH 12,5.

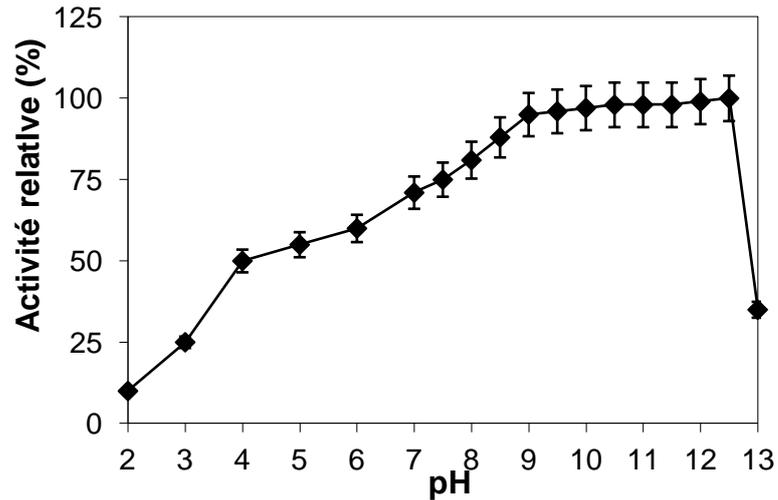


Figure 3.15 : Effet du pH sur l'activité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

La stabilité a été également examinée après pré-incubation à différents pH allant de 8 à 12,5 pendant 120 h à 70 °C. L'ensemble des résultats portés sur la figure III.16 montre que la protéase SAPDZ est stable dans la gamme des pH étudiée puisqu'elle montre des activités résiduelles de l'ordre de 100%. De part et d'autre des pH 9 et 12, la stabilité diminue pour atteindre 75 et 50% respectivement.

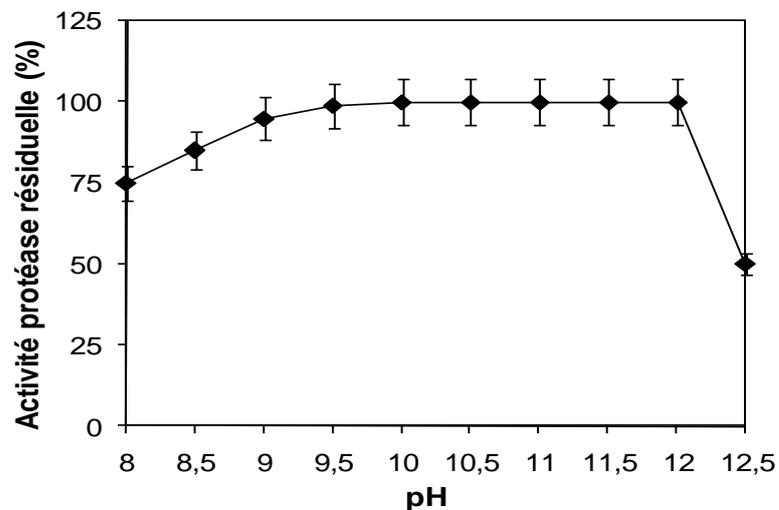


Figure 3.16 : Effet du pH sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

A titre comparatif, le pH optimal des protéases produite par les *B. licheniformis* (Alcalase) qui a une activité maximale dans une gamme de pH de 8

à 9 et celles qui sont produites par *B. clausii* (Savinase) qui est active a des pH variant entre 8 et 10 [215].

D'après les résultats obtenus, la SAPDZ s'est révélé une protéase alcaline étant donné que l'optimum d'activité est observé à pH 12,5. Ceci lui confère une large application industrielle notamment en détergence et en tannerie.

3.2.2.6. Effet de la température sur l'activité et la stabilité de la SAPDZ

La température est un critère de choix dans l'introduction d'une protéase dans une application industrielle. Pour cela, le dosage de l'activité protéolytique a été effectué à des températures allant de 40 à 100°C. Les activités relatives ont été déterminées en présence et en absence de calcium à une concentration de 5 mM.

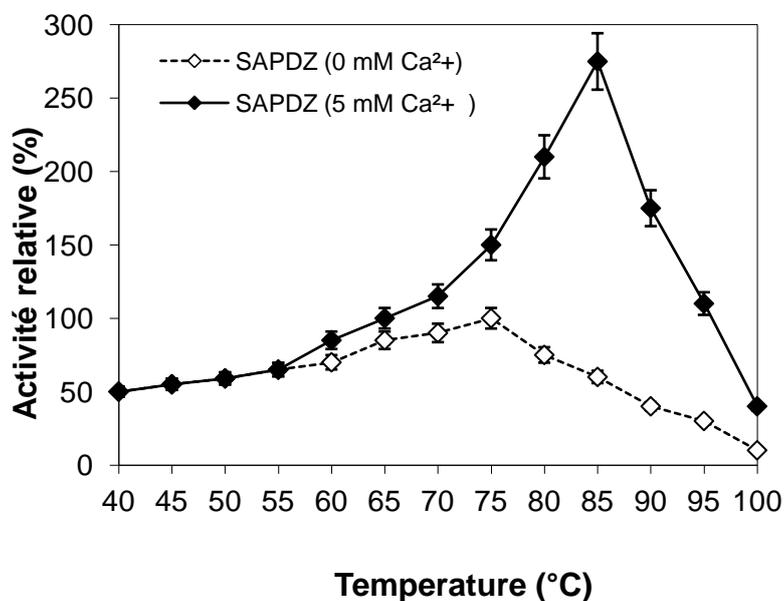


Figure 3.17 : Effet de la température sur l'activité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

D'après la figure 3.17, on remarque que pour des températures inférieures à 55 °C, les activités relatives sont identiques en présence ou absence de CaCl₂ (à 5 mM). L'optimum de température pour l'activité de la SAPDZ, en présence de 5 mM de calcium est observé à 85 °C, alors qu'elle est de 75 °C en absence de calcium. A 85 °C, l'activité mesurée en présence de CaCl₂ est 4.5 fois plus élevée que celle réalisée en son absence (figure 3.17).

Plusieurs travaux ont montré que la thermostabilité des enzymes peut être améliorée par l'addition de certains ions tels que les ions Ca^{2+} , qui sont connus comme éléments stabilisateurs de plusieurs enzymes aux températures élevées [216, 217]. Ainsi, la stabilité thermique de l'enzyme produite par *B. circulans* DZ100 a été étudiée après pré-incubation de la protéase à différentes températures (70 à 100) pendant 120 h en présence et en absence du calcium (5 mM). Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 3.17.

L'étude de l'effet de la température sur la stabilité thermique de la SAPDZ à différentes températures nous a permis de constater que cette enzyme est totalement stable à des températures inférieures ou égales à 65 °C en présence ou en absence du calcium. A des températures supérieures à 65 °C, l'étude de la thermostabilité en absence de Ca^{2+} a montré que la SAPDZ possède des temps de demi-vie qui diminuent avec l'augmentation de la température. Par contre, ces valeurs croissent avec l'ajout de 5 mM Ca^{2+} qui prouve l'implication de ces ions divalents dans l'amélioration de la thermo-stabilité de l'enzyme. On remarque aussi que les temps de demi-vie de la SAPDZ à 70, 80, 90 et 100 °C sont respectivement de 18, 12, 4 et 1 h en absence de Ca^{2+} . Alors qu'en présence de 5 mM Ca^{2+} ces temps de demi-vie sont respectivement de l'ordre de 24, 18, 6 et 2 h (figure 3.18).

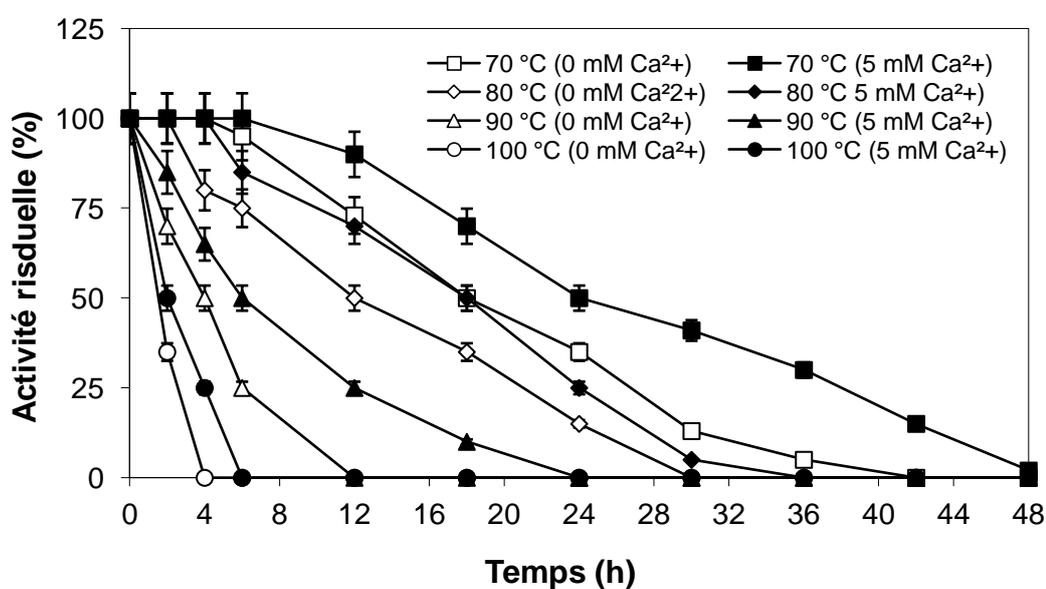


Figure 3.18: Effet de la température sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

En fait, la plupart des protéases sont signalées à être significativement stabilisées par l'ajout des ions de Ca^{2+} à des températures élevées. L'ajout de Ca^{2+} augmente le temps de demi-vie de certaines protéases et améliore leur thermostabilité. Des résultats comparables ont été retrouvés avec la protéase de *B. pumilus* qui demeure stable pendant 19 min à 70°C [218]. Ces propriétés fournissent également un appui supplémentaire pour la candidature de ces enzymes pour des futures applications industrielles.

3.2.2.7. Spécificité du substrat pour la SAPDZ

La spécificité de clivage de la SAPDZ vis-à-vis de divers substrats protéiques a été aussi étudiée. Cette étude montre que la kératine et la kératine azure, la caséine et l'azo-caséine sont les plus hydrolysées par la SAPDZ parmi les substrats protéiques naturelles et modifiés testés (tableau 3.14).

En considérant l'activité d'hydrolyse de la kératine à 100%, les taux d'hydrolyse de la caséine, l'azocaséine, la gélatine et de l'albumine était de 95, 91, 81 et 72%, respectivement. Toutefois, nous avons remarqué une hydrolyse modérée de l'hémoglobine. Aucune activité collagénase n'a été détectée sur le collagène de type I ou II. Ces résultats, rapportés pour la première fois, confirment l'utilité potentielle de cette enzyme dans l'industrie du traitement du cuir surtout lors des étapes d'épilage/confitage enzymatiques.

En plus, la spécificité de clivage de la protéase SAPDZ vis-à-vis de divers esters et substrats synthétiques a été également étudiée. Cette étude montre que lorsqu'on trouve à la position P1 un résidu de Tyr ou de Phe, la protéase SAPDZ montre une activité estérase sur BTEE (100%) et une activité amidase sur ATEE (95%), qui sont des substrats spécifiques des chymotrypsine-like protéases [45]. Cependant, lorsqu'on trouve à la position P1 un résidu d'Arg, la SAPDZ ne montre ni une activité estérase sur BAEE, ni une activité amidase sur BAPNA, qui sont des substrats spécifiques des trypsine-like protéases [1]. Ceci n'est pas étonnant car le profil d'inhibition de la SAPDZ montre bien qu'elle n'est pas sensible aux inhibiteurs spécifiques des chymotrypsines (TPCK) et des trypsines (SBTI et le TLCK).

Tableau 3.14 : Spécificité de la protéase SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ10 vis-à-vis divers substrats.

Substrat	Concentration	Absorbance (nm)	Activité relative (%)
Protéine naturelle			
Kératine	30 g/l	660	100 ± 2,5
Caséine	30 g/l	660	95 ± 2,4
Gélatine	30 g/l	660	81 ± 2,1
Albumine	30 g/l	660	72 ± 2,0
Hémoglobine	30 g/l	660	66 ± 1,6
Protéine modifié			
Kératine azure	20 g/l	440	100 ± 2,5
Azocaséine	20 g/l	440	91 ± 2,3
Collagène de type I	4 mg/ml	490	0 ± 0,0
Collagène de type II	4 mg/ml	490	0 ± 0,0
Ester			
BTEE	10 mM	253	100 ± 2,5
ATEE	10 mM	253	95 ± 2,4
BAEE	10 mM	253	0 ± 0,0
BCEE	10 mM	253	0 ± 0,0
Peptide synthétique			
Met Suc-(Ala) ₂ -Pro-Val-pNA	5 mM	410	100 ± 2,5
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA	5 mM	410	95 ± 2,4
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Met-pNA	5 mM	410	80 ± 2,1
Suc-(Ala) ₂ -Pro-Leu-pNA	5 mM	410	75 ± 2,0
Glu-(Ala) ₂ -Pro- Leu-pNA	5 mM	410	63 ± 1,6
Suc-(Ala) ₂ -Val-Ala-pNA	5 mM	410	63 ± 1,6
Suc-(Ala) ₂ -Phe-pNA	5 mM	410	70 ± 1,8
Suc-(Ala) ₂ -Val-pNA	5 mM	410	77 ± 2,0
Suc-Ala-Pro- Ala-pNA	5 mM	410	42 ± 1,4
Suc-Tyr-Leu-Val-pNA	5 mM	410	35 ± 1,2
Suc-(Ala) ₃ -pNA	5 mM	410	51 ± 1,5
BAPNA	5 mM	410	0 ± 0,0

On remarque aussi une affinité de la SAPDZ vis-à-vis des résidus aromatiques et hydrophobes d'acides aminés tels que Val, Phe, Met, Leu et Ala en position P1 (extrémité C-terminal).

En plus, on constate que la SAPDZ est active en présence de valine dans les peptides. Cette affinité a été observée pour la SAPB [112, 115] et la KERAB [110].

3.2.3. Paramètres cinétiques de la SAPDZ

En rapportant les vitesses initiales des réactions enzymatiques en fonction des concentrations croissantes (0,05 à 50 mM) en substrats [protéine naturelle (kératine) ou modifiées (azo-kératine), des esters (BTEE) et des peptides synthétiques (Met Suc-(Ala)₂-Pro-Val-pNA)], nous avons remarqué que les 4 enzymes (SAPDZ, KERAB, KerA, SAPB-L33I/T33S/N99Y) adoptent une cinétique classique Michaelienne. Par la suite nous avons tracé les représentations graphiques linéaires de Lineweaver–Burk (doubles inverses : 1/V en fonction de 1/[S]) correspondante à chaque enzyme. Ceci nous a permis de déduire les valeurs des paramètres cinétiques : constante de dissociation ou de Michaelis-Menten (K_m) et vitesse maximale (V_{max}), constante catalytique (k_{cat}) et l'efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) moyennant le programme Hyper32.

Tableau 3.15. : Les paramètres cinétiques des enzymes SAPDZ, KERAB, KerA et SAPB-L31I/T33S/N99Y pour l'hydrolyse des substrats (protéines, esters et peptide synthétiques).

Substrat	Enzyme	K_m (mM)	k_{cat} ($\times 10^4 \text{ min}^{-1}$)	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)
Kératine	SAPDZ	0,501 \pm 0,011	22,44 \pm 1,81	44,79
	KERAB	0,530 \pm 0,016	9,50 \pm 2,11	17,92
	KerA	0,703 \pm 0,034	6,15 \pm 0,14	8,74
	SAPB-L33I/T33S/N99Y	0,602 \pm 0,032	8,66 \pm 1,14	14,38
Kératine azure	SAPDZ	0,344 \pm 0,008	12,46 \pm 0,95	36,22
	KERAB	0,472 \pm 0,017	7,01 \pm 0,32	14,85
	KerA	0,610 \pm 0,022	5,62 \pm 0,14	9,21
	SAPB-L33I/T33S/N99Y	0,498 \pm 0,019	6,85 \pm 0,15	13,75
BTEE	SAPDZ	0,620 \pm 0,034	31,75 \pm 3,08	51,21
	KERAB	0,643 \pm 0,027	25,81 \pm 2,12	40,13
	KerA	0,836 \pm 0,040	21,40 \pm 1,75	25,59
	SAPB-L33I/T33S/N99Y	0,917 \pm 0,042	28,72 \pm 2,54	31,31
Met Suc-(Ala) ₂ -Pro-Val-pNA	SAPDZ	0,411 \pm 0,015	148,89 \pm 9,22	363,26
	KERAB	0,759 \pm 0,044	45,57 \pm 5,10	60,04
	KerA	0,911 \pm 0,049	80,31 \pm 7,16	88,15
	SAPB-L33I/T33S/N99Y	0,383 \pm 0,010	47,65 \pm 5,15	124,41

En utilisant la kératine comme un substrat naturel, les valeurs des paramètres cinétiques (K_m , et V_{max}) calculées de la SAPDZ sont de 0,501 mM et $21,150 \times 10^3$ U/mg, respectivement. Son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) déduite est de $44,79 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

Pour les autres enzymes : KERAB, KerA et SAPB-L33I/T33S/N99Y leurs rapports k_{cat}/K_m sont respectivement de $17,92 \times 10^4$, $8,74 \times 10^4$ et de $14,38 \times 10^4 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. On constate que l'efficacité catalytique de la kératinase SAPDZ est 5,12 fois plus élevée que celle de KerA, 3,11 fois par rapport la SAPB-L33I/T33S/N99Y et 2,49 fois par rapport la KERAB (tableau 3.15).

En plus, pour un substrat synthétique, nous avons remarqué aussi que l'efficacité catalytique de la SAPDZ est de $363,26 \times 10^3 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$: 6,05 fois plus élevée que celle de la KERAB.

3.2.4. Caractérisation moléculaire de la SAPDZ

3.2.4.1. Clonage et séquençage du gène codant la SAPDZ

Dans le but de déterminer la séquence complète de l'enzyme mature, nous avons amplifié par PCR, la partie du gène qui code pour la protéase mature à partir de l'ADN génomique de *Bacillus circulans* DZ100 en tant que matrice. Les oligonucléotides utilisés (Oligo F-TBA et Oligo R-TBA) ont été déterminés en se basant sur les séquences nucléotidiques des gènes *sapB* codant pour la protéase alcaline SAPB de *Bacillus pumilus* CBS [112], *aprP* codant pour la protéase alcaline DHAP de *Bacillus pumilus* TYO-67 [219] et du gène *AP* codant pour la protéase alcaline DHAP de *Bacillus pumilus* UN-31-C-42 [220]. Ces oligonucléotides ont été testés par le programme BLAST du site NCBI pour écarter tout risque d'hybridation non spécifique (Annexe 7). Le fragment amplifié, présente une taille approximativement de 1149 bp. Ce fragment a été par la suite cloné dans le vecteur de clonage pCR-Blunt et le produit de la ligation a été transformé dans la souche *E. coli* BL21 déficiente en activité protéasique. La sélection des clones ayant hébergé l'insert a été faite sur milieu GNL additionné de kanamycine. Les colonies ayant des halos devraient héberger des constructions recombinantes exprimant une activité SAPDZ. Pour confirmer cette éventualité, les plasmides de ces colonies ont été extraits et analysés par digestion enzymatique. Comme le montre la figure 3.19, les produits de digestion

de plusieurs colonies positives sont formés d'une bande de 3,5 kbp qui correspond au vecteur et une bande de 1,149 kbp qui correspond au fragment qui code pour la SAPDZ. Un plasmide baptisé pABT1 (figure III.20) a été retenu pour la détermination de la séquence du fragment cloné.

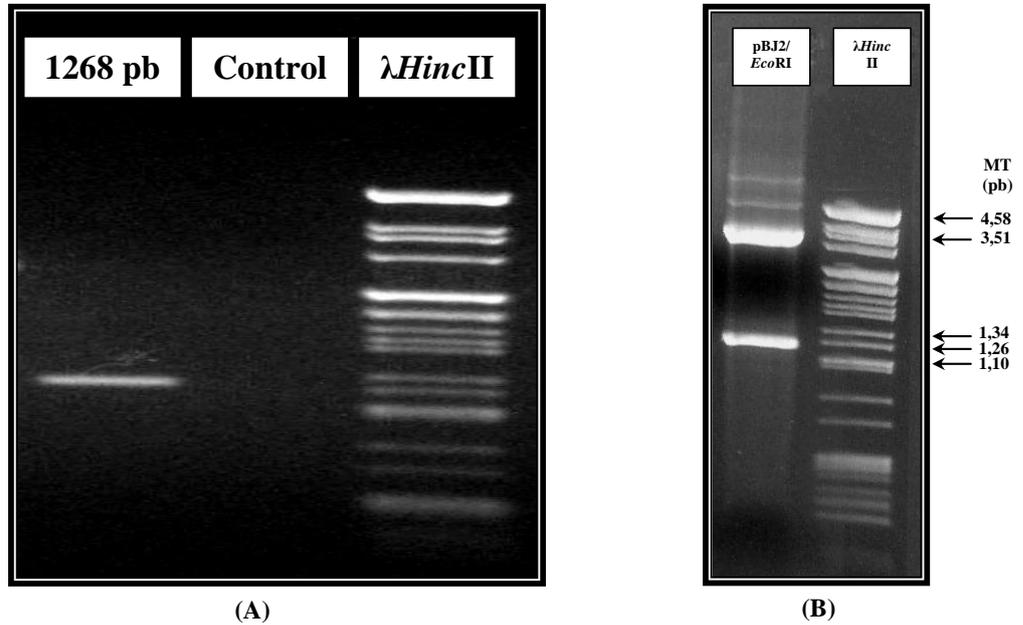


Figure 3.19 : Gels d'agarose (1%) présentant le produit de la PCR du gène *sapDZ* (A) et les produits de digestion du vecteur recombinant pABT1 (4760 pb) par *EcoRI*. MT : Marqueur de taille λ -*HincII* (4,58 ; 3,51 ; 3,27 ; 2,84 ; 2,19 ; 1,96 ; 1,79 ; 1,67 ; 1,61 ; 1,34 ; 1,26 ; 1,1 ; 0,86 ; 0,73 ; 0,56 kb).

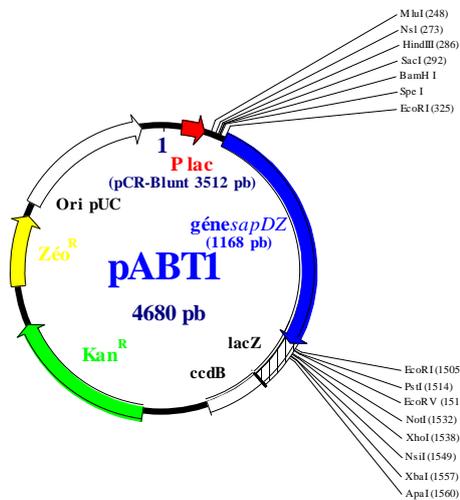


Figure 3.20 : Catre de restriction du plasmide pABT1 (4680 pb) pour le clonage du gène *sapDZ*.

Le séquençage de la totalité du gène (nommé pABT1) codant pour la SAPDZ mature a été effectué plusieurs fois sur le fragment PCR ainsi que sur plusieurs plasmides recombinants (pABT2) moyennant les techniques de séquençage décrites dans la partie Matériels et Méthodes. La séquence nucléotidique complète (1149 pb) a été établie et déposée dans la base de données DataBank/EMBL sous le numéro d'accès : **KC621293**. L'analyse de la séquence nucléotidique ainsi obtenue nous a permis d'identifier une phase de lecture ouverte de 1168 pb qui code pour une pré-pro-protéase, correspondant à 383 amino-acides, organisée en trois régions. Moyennant le programme SignalP, version 3.0 de prédiction de séquence signal putative [221, 222], nous avons révélé la présence d'un **peptide signal** de 29 Aa (87 pb) du résidu de Met1 jusqu'au résidu d'Ala29. Ce peptide impliqué dans la sécrétion de l'enzyme est composé d'une courte séquence N-terminale chargée positivement (3 Lys) suivie d'un large domaine central hydrophobe d'environ 20 Aa et d'un domaine C-terminal contenant un site de clivage (Ala29-Asn30-Ala31) reconnu par le peptide signal peptidase.

Nous avons aussi identifié une séquence de 79 Aa du résidu d'Asn30 jusqu'au résidu de Tyr108, ce qui correspond à la séquence du **pro-peptide**. Par homologie à d'autres subtilisines, nous médions que ce pro-domaine jouerait un rôle d'inhibiteur compétitif pour l'enzyme en plus de son rôle primordial dans le repliement correct de l'enzyme. Ce rôle de chaperonne intramoléculaire se fait *via* son domaine-IMC et qui par la suite sera auto-protéolysé pour générer la **protéase mature** active de 275 Aa, allant du résidu d'Ala109 jusqu'au résidu d'Asn383 et ayant une masse moléculaire prédite, moyennant le serveur ExPASy, de 27756.66 Da. De plus, nous avons repéré la triade catalytique ; D32, His64 et Ser221 chez la SAPDZ mature correspondant aux résidus conservés (Signature des subtilases) : 28-39, 64-75 et 216-226, caractéristique des protéases à sérine [223].

Tableau 3.16_: Différence en acides aminés entre les protéases alcalines produites par *Bacillus circulans* (SAPDZ), *B. pumilus* (SAPB), *B. circulans* (SAPP1) et *B. pumilus* (KERK12) moyennant un alignement de séquence protéique en utilisant le logiciel BioEdit.

Région	SAPDZ <i>B. circulans</i> DZ100	SAPB <i>B. pumilus</i> CBS	SAPP1 <i>B. circulans</i> P1	KERK12 <i>B. pumilus</i> K12
Peptide signal	Ser	Ser -27	-	Thr -27
Pro-peptide	Thr	Lys -81		Lys -81
Protéase mature	Met	Ile 8	Ile 8	Ile 8
	Ala	Pro 9	Pro 9	Pro 9
	Asp	Ala 13	Ala 13	Ala 13
	Gly	Ala 18	Ala 18	Ala 18
	Ile	Val 51	Val 51	Val 51
	Ser	Tyr 104	Tyr 104	Tyr 104
	Pro	Pro 129	Pro 129	Ala129
	Asn	Asn 130	Asn 130	Ser 130
	Pro	Gly 157	Gly 157	Gly 157
	Phe	Phe 159	Thr 159	Ser 159
	Asp	Asp 172	Asp 172	Gly162
	Gly	Ile 175	Ile 175	Ile 175
	Gly	Gly 182	Ser 182	Ser 182
	Asn	Asn 183	Ser 183	Asn 183
	Pro	Val 185	Val 185	Val 185
	Pro	Ala 200	Ala 200	Ala 200
	Arg	Leu 233	Leu 233	Leu 233
	Tyr	Tyr 238	Asn 238	Asn238
	Ser	Ser 242	Ser 242	Thr 242
Thr	Thr 243	Asn 243	Asn 243	
Gly	Pro 256	Pro 256	Pro 256	
Asp	Asp 259	Asn 259	Asp 259	
Identité (%)	-	96,33	94,92	93,80
% de différence en Aa de SAPDZ		13	18	22

3.2.4.2. Modélisation

La modélisation moléculaire de l'enzyme SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100 a été réalisée avec le serveur ExPASy, swiss-model Workspace et Geno3D en utilisant la structure 3D (code PDB : 1SCJ) de la subtilisine E de la souche *Bacillus subtilis* comme matrice (figure 3.22).

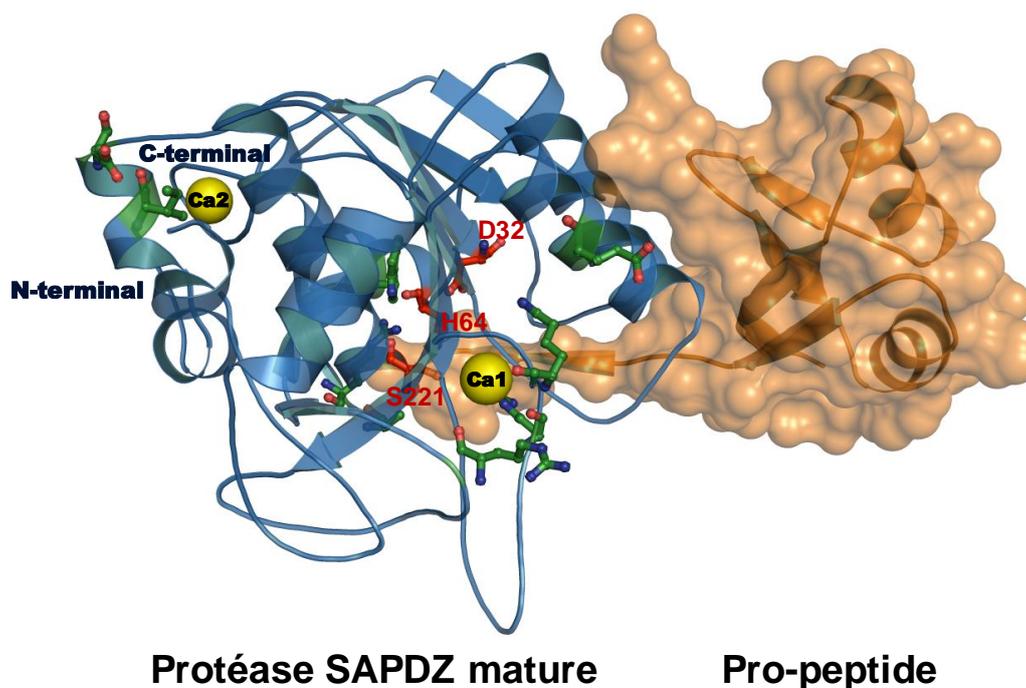


Figure 3.22 : Modèle structural de la protéase SAPDZ généré basé sur la structure 3D de la subtilisine E (code PDB: 1SCJ). La triade catalytique dans le site actif (D32, H64 et S221) de l'enzyme mature est indiquée en rouge. Le pro-peptide est indiqué en orange jauni. Les deux sites de calcium (Ca1 et Ca2) sont présentés sous forme de sphères jaunes. Cette figure a été préparée en utilisant le programme PyMol.

3.2.4.3. Surexpression, localisation cellulaire et purification de la SAPDZ

Dans le plasmide pABT0, le gène *sapDZ* a été cloné sous la dépendance du promoteur *P_{T7}*. Afin d'assurer l'expression maximale de ce gène à partir de ce promoteur, le plasmide pABT1 a été transféré dans la souche BL21(DE3)pLysS contenant le gène codant à l'ARN polymérase T7. D'autre part le gène *sapdz* a été aussi placé sous le contrôle d'autres promoteurs à savoir : *P_{lac}* et *P_{tac}*, dans les vecteurs pUT57 et pTrc99A, pour obtenir respectivement les nouvelles constructions pABT1 et pABT2 (Annexe 8). La comparaison des niveaux d'expression de cette protéine a été évaluée *via* la détermination des activités spécifiques issues de chaque construction. A la lumière des résultats obtenus (tableau 3.17), le promoteur *P_{tac}* (plasmide pABT2) semble être le plus adéquat pour une meilleure expression de la SAPDZ (figure 3.23).

L'étude de l'activité recombinante (rSAPDZ), a montré qu'elle s'exprime efficacement au niveau de l'espace extracellulaire d'*Escherichia coli* et qu'elle possède les mêmes propriétés physico-chimiques et cinétiques que la SAPDZ native.

Tableau 3.17: Comparaison de la surexpression du gène *sapDZ* sous le contrôle de différents promoteurs.

Souche	Construction	Activité Spécifique (U/mg)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS /pABT1	<i>P_{T7}-sapDZ</i>	12500
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS /pABT2	<i>P_{trc}-sapDZ</i>	75000

La construction *P_{trc}-sapDZ* (pABT2) a servi à la production de l'enzyme recombinante afin de la purifier à homogénéité. La rSAPDZ pure possède les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques similaires à celles trouvées pour la protéine native.

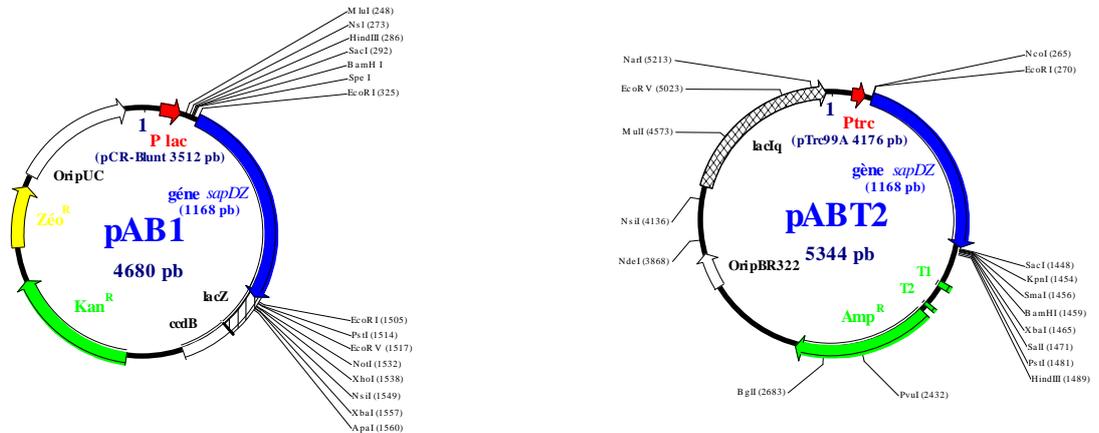


Figure 3.23 : Cartes de restriction des plasmides pABT1 et pABT2.

3.2.5. Conclusion

Cette investigation a visé la purification de l'enzyme SAPDZ et la caractérisation biochimique et moléculaire de son activité protéasique. Les techniques de purification utilisées dans ce travail, ont permis d'aboutir à une solution enzymatique homogène comme il a été prouvé par HPLC, native PAGE, SDS-PAGE et MALDI-TOF/MS. Par rapport au surnageant de culture, la SAPDZ a été purifiée environ 61,22 fois avec un rendement d'environ 25%. L'étude de

l'enzyme purifiée, a montré que l'activité spécifique est de 75000 U/mg, sur la kératine azure, que la température optimale d'activité est de 85 °C et que le pH optimum est de 12,5. Nous avons montré aussi que la SAPDZ peut être classée comme étant un membre de la famille des subtilisines. Par ailleurs, le gène *sapDZ* codant pour cette activité a été cloné, totalement séquencé et surexprimé chez *Escherichia coli* BL21. La protéine recombinante purifiée à partir de l'espace extracellulaire possède les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques identiques à celles trouvées pour la protéine native.

Les caractéristiques intéressantes de la SAPDZ nous permettent de conclure que cette enzyme est convenable pour des éventuelles applications industrielles en tannerie et détergence. Un tel aboutissement devrait nous inciter à pousser nos études ultérieures vers la compréhension des relations structure-fonctions de la SAPDZ. Nous projetons à court terme de déterminer la structure 3D de cette protéase, ce qui constituera un apport notable pour les tentatives d'amélioration des propriétés enzymatiques.

Chapitre 3-3

APPLICATIONS BIOTECHNOLOGIQUES DE LA PROTÉASE SAPDZ PRODUITE PAR LA SOUCHE DE *BACILLUS CIRCULANS* DZ100

3.3.1. Introduction

Les secteurs de détergence et de tannerie sont les industries qui utilisent les plus gros volumes d'enzymes notamment des protéases alcalines. A cet égard, l'utilisation des protéases alcalines dans les produits détergents et dans le traitement de cuir pourrait intervenir dans l'amélioration de la qualité du produit final et réduire la pollution résultant de l'utilisation excessive des détergents et produits chimiques qui sont corrosifs, toxiques et non biodégradables.

Dans le but d'évaluer les propriétés kératolytique en tannerie et détergence de la SAPDZ, un procédé de fermentation à été réalisé dans un fermenteur de 100 litres avec un volume réactionnel de 60 litres en milieu de culture en présence d'anti-mousse. Le fermenteur à été inoculé par une préculture de souche sauvage *Bacillus circulans* DZ100 de 24 h sous une agitation de 250 rpm, une aération de 0,5 vvm, à pH 8,0 sous une température de 37°C pendant 48 h. L'enzyme semi-purifiée à été récupéré à la fin après ultrafiltration sur membrane afin de récupérer un surnageant clair qui à subi une concentration de 30 fois par rota-vapeur puis des prétraitements (thermique pendant 30 min à 80°C et une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium 40 à 70%).

3.3.2. Applications biotechnologiques de la protéase SAPDZ de *bacillus circulans* DZ100

3.3.2.1. Evaluation des performances de *Bacillus circulans* DZ100 dans la dégradation des substrats kératolytiques

Les résidus à base de kératine (plumes de volailles, cheveux, poils,...) sont très abondants dans la nature. Leur traitement se limite jusqu'à présent à l'incinération, un procédé très polluant. Cependant, l'intérêt croissant pour l'environnement ainsi que la richesse de ces substances en protéines et en Aa essentiels (le tryptophane, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine) nous amènent à chercher une autre alternative

plus valorisante pour le traitement de ce type de déchet. En l'occurrence, la voie de la dégradation enzymatique, faisant intervenir une activité protéase (kératinase), semble être très prometteuse et en accord avec les exigences écologiques.

Tout d'abord, on doit montrer que la souche *B. circulans* DZ100 est capable de croître sur un milieu adéquat à base de : farine de plumes de volailles, plumes de volailles entières, poils (chèvres et de vache), cheveux humain et laine de mouton à raison de 20 g/l comme seule source de carbone et d'azote (figure 3.24 A, B et C).



A : Les différents substrats kératinolytiques



B : Les substrats kératinolytiques+ milieu de culture+ DZ100 à t=0 h



C : Les substrats kératinolytiques+ milieu de culture+ DZ100 à t=36 h

Figure 3.24 : Dégradation de différents substrats kératinolytiques par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

La souche de *B. circulans* DZ100 est apte de se multiplier et de produire des kératinases sur milieu de culture à base de différentes sources de kératinases (farine, plumes, poils, cheveux ou laine) (figure 3.24C). Cette caractéristique a été observée chez plusieurs souches notamment les *B. pumilus* CBS [112, 115] et les *B. pumilus* F3-4 [224].

On remarque, pour la culture à base de plume de poulet, une dégradation et une solubilisation presque totale des plumes, après 36 h de culture. Ceci confirme que la souche DZ100 produit une enzyme menée d'une activité kératinolytique extracellulaire nécessaire pour la préparation d'hydrolysat protéique à partir de plumes.

Les résultats illustrés dans le tableau III.18 montrent que la souche *B. circulans* DZ100 dégrade et solubilise totalement la farine de plumes (100%), suivie par les plumes entières (90%), les poils de chèvres (75%) et les poils de vaches (57%). Cependant, un faible taux d'hydrolyse est observé dans le cas des cheveux humain (31%), la laine de moutons (15%) et la laine de lapin (10%). Cette différence peut être expliquée par la variabilité des substrats kératinolytiques utilisés. Il est à noter que des taux d'hydrolyse de 97% et 98.5% (de la farine de plumes) ont été atteints pour les souches de *B. pumilis* F3-4 [224] et de *B. pumilus* CBS [112, 115].

Tableau 3.18 : Effets des substrats à base de kératine sur l'activité kératinolytique de SAPDZ après 36 h d'incubation.

Substrats à base de kératine	Quantité de protéine soluble (mg/ml)	Activité kératinolytique (U/ml)	Groupement SH libre (μ M)	% de biodégradation de la kératine
Farine de plume de poulet	5,18	15000	7,26	100
Plume de poulet	4,49	12500	6,31	90
Plume de canard	4,01	10250	5,22	81
Poils de chèvre	3,22	8125	4,20	75
poils de vache	2,14	5100	2,90	57
Cheveu humain	1,81	3100	1,55	31
Laine de mouton	1,26	2850	1,04	15
Laine de lapin	0,78	1025	0,55	10

Le suivi de la production de kératinase par la souche DZ100 montre une meilleure production dans le milieu à base de farine de plumes (15000 U/ml), puis avec les plumes entières (poulet = 12500 U/ml et canard = 10250 U/ml), les poils de chèvres (8125 U/ml) et les poils de vaches (5100 U/ml). Par contre, un faible niveau est observé dans le cas de cheveu humain (3100 U/ml), la laine de mouton (2850 U/ml) et la laine de lapin (1025 U/ml). En même temps, nous avons évalué la quantité de protéines produites et la présence des ponts disulfures (ou ponts S-S) *via* la détection des groupements sulfhydriles portés par les Aa soufrés. Nos résultats montrent que la quantité de protéines varie de 5,18 à 0,78 mg/ml et suggèrent que la souche *B. circulans* DZ100 possède une capacité de dégradation des ponts S-S abondants sur les substrats kératinolytiques testés.

En effet, d'après les profils chromatographiques par HPLC-C18 des acides aminés libérés (résultats non présentés) on enregistre la dominance de phenylalanine, tryptophane, leucine, isoleucine, valine et alanine. Cependant, aucun aminoacide n'est détecté dans le cas du témoin : substrat kératinolytique sans ajout d'enzyme.

Nous signalons que ce profil d'acides aminés coïncide avec celui de la kératinase produite par la souche de *Bacillus licheniformis* PWD-1 [225], la protéase SAPB de *Bacillus pumilus* CBS [112, 215], la kératinase KERAB de *Streptomyces* sp. AB1 [110] et la kératinase KERUS de *Brevibacillus brevis* US575 [154].

3.3.2.2. Evaluation des performances de SAPDZ dans le traitement des cuirs

Les enzymes kératinolytiques peuvent être utilisées aussi dans les opérations de rivières (confitage et épilage/pelanage enzymatique) lors du traitement du cuir afin de réduire essentiellement l'utilisation des réactifs chimiques polluants pour l'environnement. Pour cela, SAPDZ a été testée dans le traitement du cuir en incubant des peaux brutes de lapin, de chèvre, de vache et de mouton (100 ml ; 2000 U) à l'étuve 37°C.

Après 36 h d'incubation, une élimination totale des poils a été obtenue, et aucun endommagement des constituants du collagène du cuir n'a été observé à l'œil nu (figure .25).

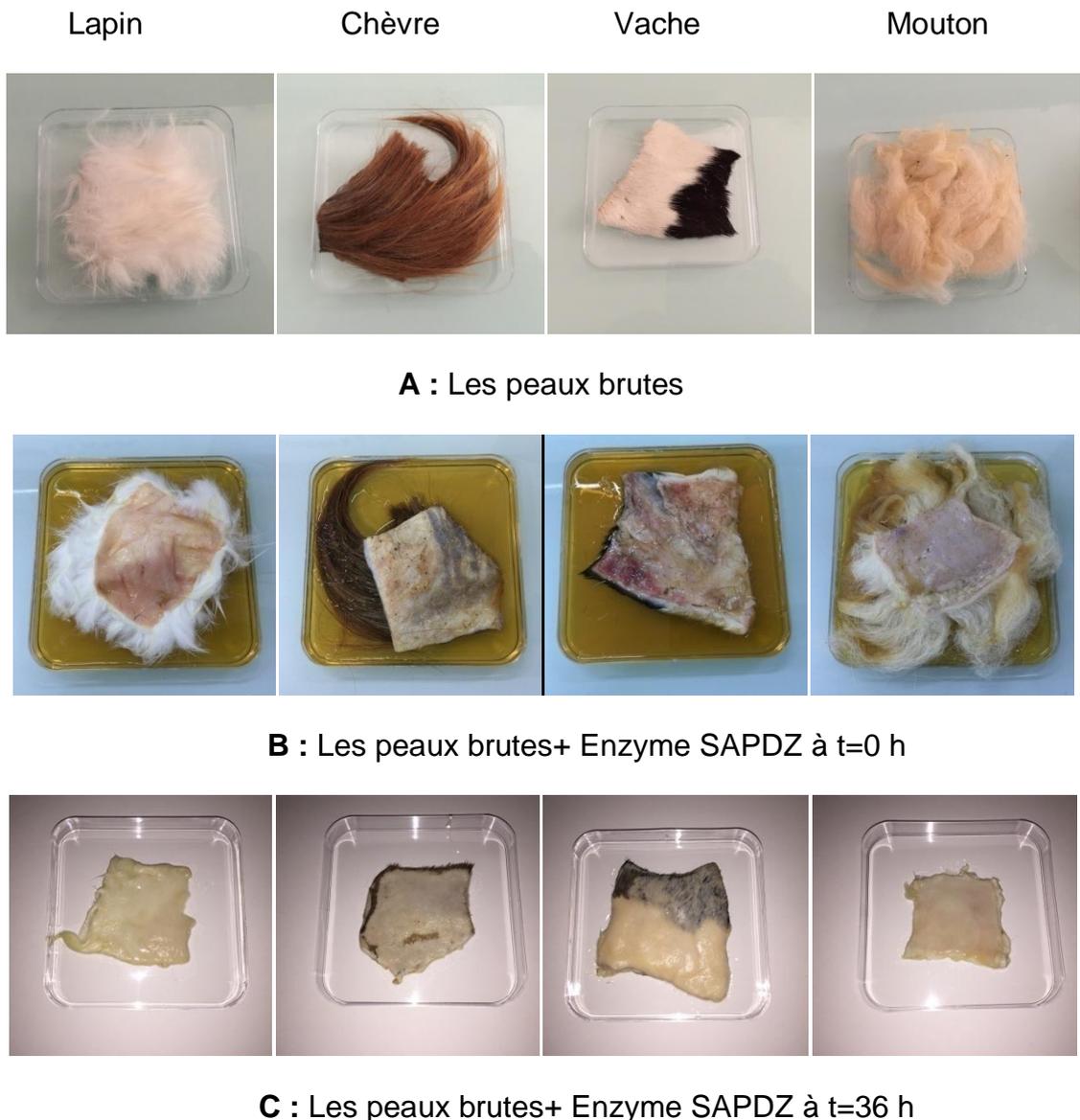


Figure 3.25 : Effet d'épilage de la protéase SAPDZ dans le traitement des cuirs.

De plus, les peaux traitées conservent apparemment leurs textures avec des porosités claires, comparées au témoin qui reste intact (pourvu de poils). Ceci suggère que la SAPDZ a la potentialité d'accomplir toute seule le processus d'épilage qui confirme la dégradation des protéines kératinolytiques.

3.3.2.3. Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées par rapport au nombre total de liaisons peptidiques. Un degré d'hydrolyse est égale à 100% lorsque toutes les liaisons peptidiques d'une molécule protéique sont hydrolysées ; en d'autres termes, la protéine est totalement décomposée en ses éléments constitutifs, formés d'acides aminés.

Comme les enzymes sont des biocatalyseurs spécifiques, aucune enzyme n'est capable seule d'hydrolyser toutes les liaisons peptidiques d'une protéine jusqu'à un DH de 100%. En effet, le DH d'une enzyme est un paramètre important de la réaction, car il a été démontré que la fonctionnalité de l'hydrolysats obtenu est largement dépendante du DH [226]. Plus le DH est élevé plus la taille moyenne des peptides engendrés est réduite et plus l'hydrolysats est efficacement utilisé.

Dans le cadre d'une étude sur la valorisation des ressources locales riches en protéines, essentiellement les déchets kératiniques (plumes de volailles, poils, cheveux, laines, etc.) et dans la nécessité de substituer des produits commercialisés (comme les hydrolysats protéiques et les extraits de levures) par des produits locaux et bon marché, l'obtention de protéases ayant un DH élevé est d'une grande importance. Habituellement, les hydrolysats sont obtenus par une hydrolyse des protéines (caséine, gélatine, etc.), sous l'action d'enzymes commercialisées (Alcalase, Neutrase, Flavourzyme ...).

Dans ce contexte, les enzymes protéolytiques SAPDZ, KERAB, KerA, SAPB-L311/T33S/N99Y et BPN' ont été testées pour leur efficacité d'hydrolyser la farine de plumes (figure 3.26).

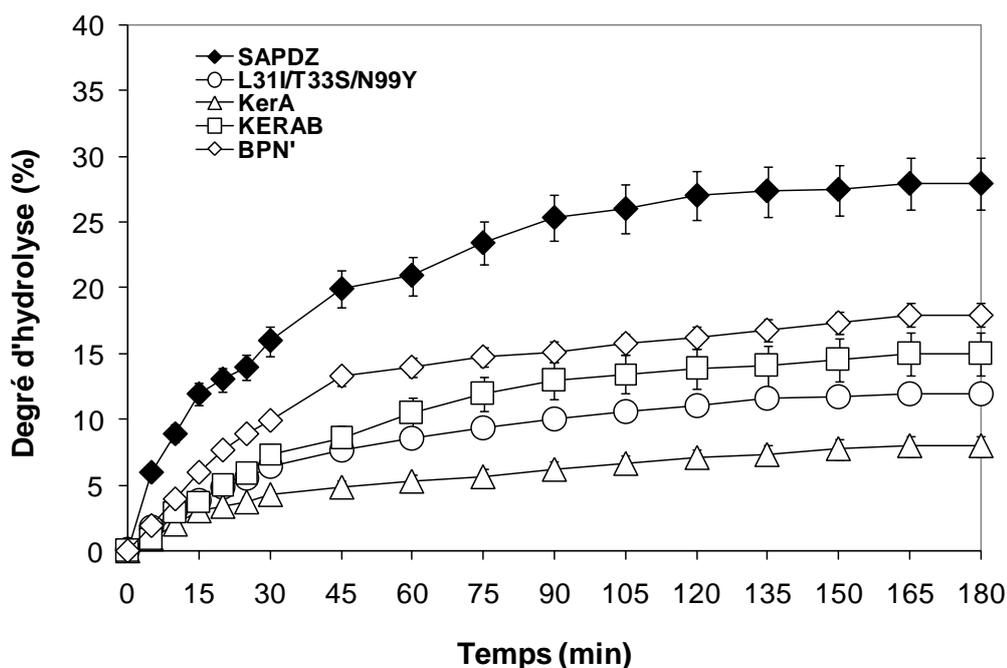


Figure 3.26 : Hydrolyse de la farine des plumes par les SAPDZ, KERAB, KerA, SAPB-L311/T33S/N99Y et BPN'.

Les résultats de la figure 3.25 montrent que la protéase SAPDZ présente un DH élevé et plus important que celle de KERAB, KerA, SAPB-L311/T33S/N99Y et BPN'. En effet, le degré d'hydrolyse de la caséine par protéase SAPDZ a été mesuré et comparé à celui de quatre protéases (KERAB, KerA, SAPB-L311/T33S/N99Y et BPN'). Les résultats présentés sur cette figure montrent que le DH varie en fonction du temps selon le système enzymatique étudié. La vitesse de la réaction décroît avec le temps, et la réaction finit par s'arrêter à une valeur donnée de DH. Le DH de la protéase SAPDZ est de l'ordre de 28%, alors qu'il est de 18%, 15% et 12% pour les protéases BPN', KERAB et SAPB-L311/T33S/N99Y, respectivement. Cependant, le DH est de 8% pour la KerA. Par conséquent la protéase SAPDZ, en particulier, est la meilleure candidate pour la préparation des hydrolysats protéiques.

3.3.2.4. Effet de certains additifs de détergents sur la stabilité de la SAPDZ

Les protéases sont les enzymes les plus introduites dans les détergents liquides ou solides. Grâce à leur activité, elles permettent de supprimer les taches protéiques par leur dégradation en peptides et en acides aminés solubles. L'intérêt de développer des protéases pour les incorporer dans les détergents est lié à la tendance actuelle de faire des lavages à des températures de plus en plus basse et l'utilisation moindre de surfactants chimiques afin de préserver l'environnement. Toutefois, la protéase détergente recherchée doit être très active et stable en solution alcaline et vis-à-vis des détergents. Or, la souche *B. Circulans* DZ100 produit la protéase SAPDZ dont l'optimum d'activité est située vers pH 12,5. Pour cela, on a recours d'étudier la stabilité de la SAPDZ, vis-à-vis des détergents liquides et solides à une concentration de 7 mg/ml. Une pré-incubation de 120 h à 40°C a été effectuée (figures 3.27 et 28). Les activités résiduelles ont été déterminées à pH 10 et à 70 °C.

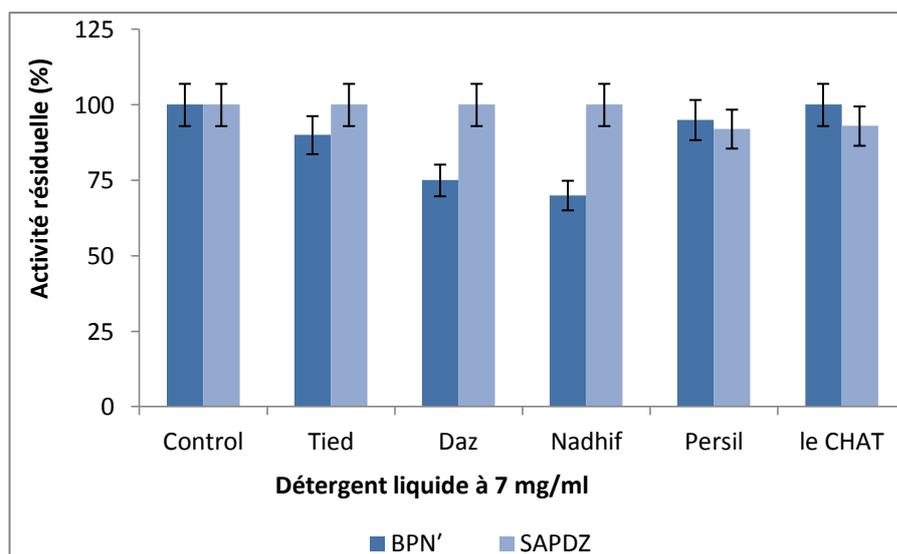


Figure 3.27 : Effet de différents détergents liquides sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

L'analyse des résultats de la figure 3.27 montre que la protéase SAPDZ présente une stabilité et compatibilité remarquable avec les détergents liquides et solides par rapport à l'enzyme commerciale BPN'. En effet, en présence des détergents liquides Tied, Daz et Nadif, les activités résiduelles enregistrées sont de 100% contre 70% à 90% pour l'enzyme commerciale. Cependant, l'activité de la protéase SAPDZ est légèrement affectée en présence des détergents le CHAT et Persil pour atteindre respectivement 93% et 92%, après une pré-incubation de 1 h à 40 °C.

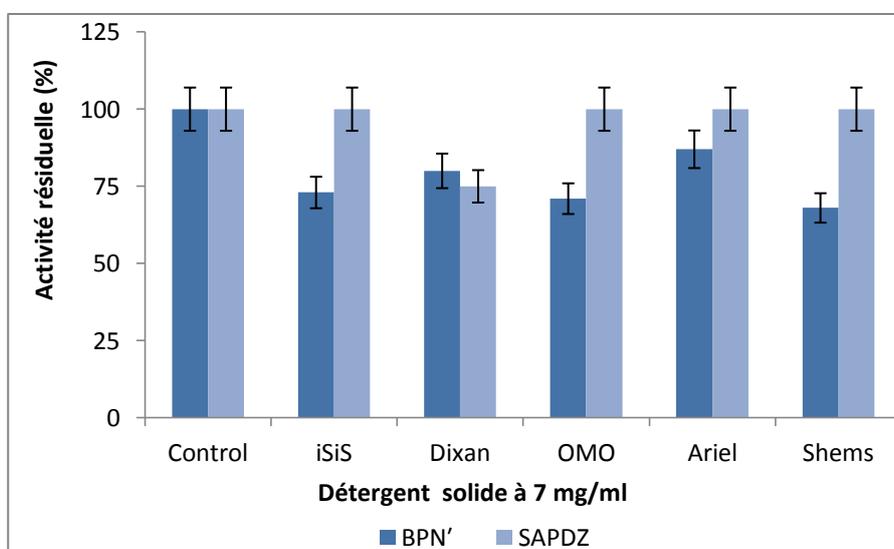


Figure 3.28 : Effet de différents détergents solides sur la stabilité de la SAPDZ produite par la souche *Bacillus circulans* DZ100.

Quant à l'analyse des résultats de la figure 3.28 montre que la protéase SAPDZ présente une stabilité et compatibilité remarquable avec les détergents solides par rapport à l'enzyme commerciale BPN'. En effet, en présence des détergents solides iSiS, OMO, Ariel et Shems, les activités résiduelles enregistrées sont de 100% contre 68% à 87% pour l'enzyme commerciale. Cependant, l'activité de la protéase SAPDZ est légèrement affectée en présence du détergent Dixan pour atteindre 75% contre 80% pour la protéase BPN' après une pré-incubation de 1 h à 40 °C.

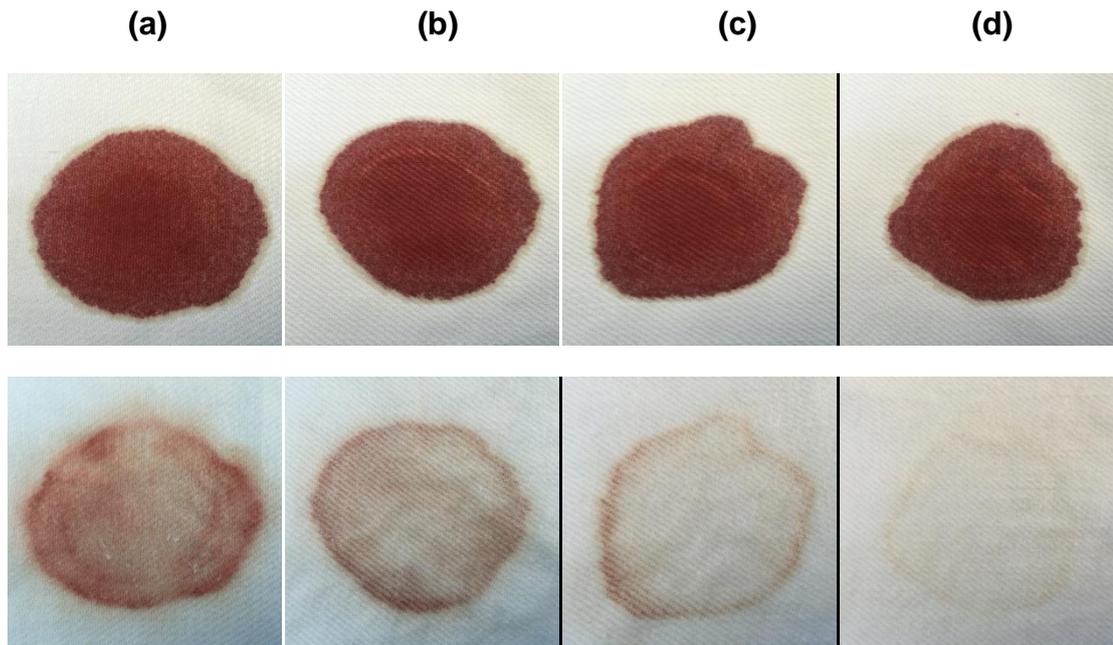
A la lumière de ces résultats, l'activité protéolytique de la protéase SAPDZ semble répondre à la majorité des exigences d'une bonne protéase détergente.

3.3.2.5. Evaluation des performances de la SAPDZ et BNP' pour l'élimination des taches

Afin de déterminer l'efficacité de la SAPDZ pour l'élimination de différentes taches à base de protéine (sang et chocolat), on s'est basé sur des tests visuels d'évaluation de pouvoir détergent sur des pièces de tissus en coton (8 × 8 cm), (figure 3.29). Le lavage est mené à 40 °C pendant une heure sous une agitation de 250 rpm afin de mimer les conditions de la machine à laver. D'après cette figure, l'ajout de la SAPDZ aux solutions détergentes améliore leurs performances dans le sens d'une meilleure décoloration des taches de sang et de chocolat surtout dans le cas d'iSiS.

D'après la figure 3.29, on remarque que l'ajout de la protéase SAPDZ à la solution détergente améliore les performances du détergent iSiS dans le sens d'une meilleure décoloration des taches du sang et du chocolat. Des travaux similaires ont montré la capacité des protéases alcalines dans l'élimination des taches du sang, en tenant l'exemple de la protéase alcaline thermostable produite par la souche *Bacillus alveayuensis* CAS 5 qui a éliminé totalement le sang suite à sa combinaison avec un détergent à concentration de 5 mg/ml pendant 20 min [227].

Taches de sang



Taches aux chocolats

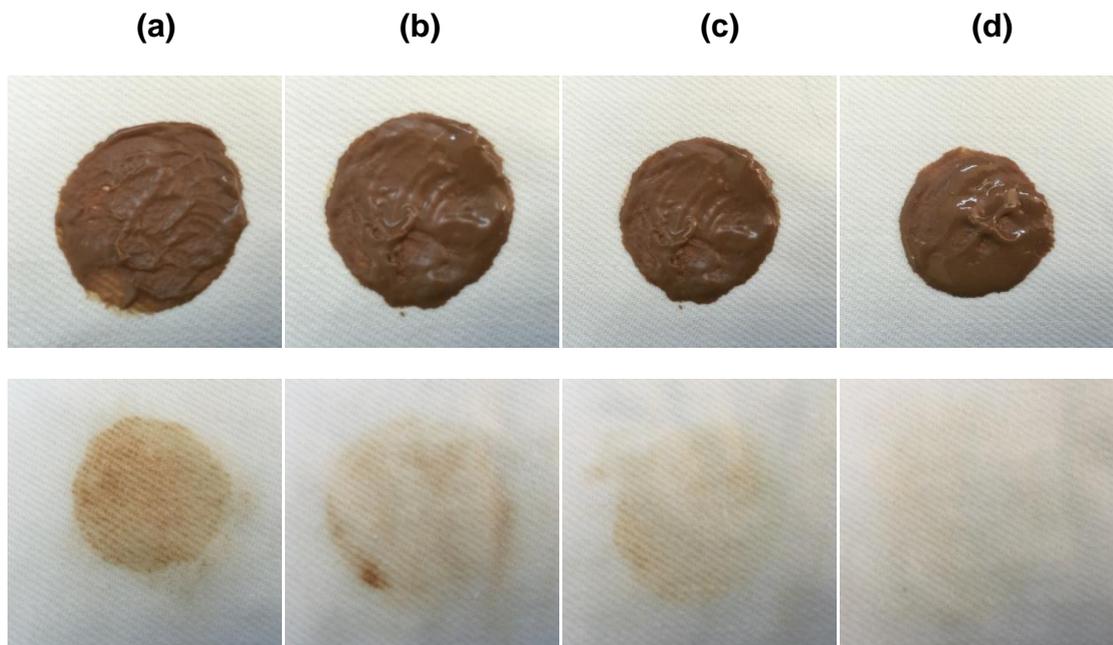


Figure 3.29 : Performances des protéases SAPDZ et BPN' dans le détergent liquide commerciale iSiS à 7 mg/ml sur différentes taches de sang (en haut) et du chocolat (en bas). (a) traitement par l'eau de robinet ; (b) traitement par iSiS; (c) Traitement par BPN' (500 U/ml) + iSiS; (d) Traitement par SAPDZ (500 U/ml) + iSiS. I: tissu non traités (contrôle) et II : tissus traités.

3.3.3. Conclusion

Cette partie de notre étude porte, d'une part, sur l'optimisation de la production de la SAPDZ par la souche de *Bacillus circulans* DZ100. Le niveau de production sur le milieu optimisé à base de caséine et peptone de soja est de 15000 U/ml en Erlenmeyer est de 75000 U/ml en fermenteur. D'autre part, nous avons montré également que la SAPDZ demeure active et stable en présence des détergents commerciaux (liquides et solides). La SAPDZ est efficace sur les taches de sang et chocolat, ceci est évalué, en comparaison avec une enzyme commerciale, par des tests de lavage utilisant le détergent iSiS additionné de l'enzyme SAPDZ.

La souche *B. circulans* DZ100 s'est révélée, également, capable de se développer sur milieu minéral additionné de : farine de plumes de volailles, plumes entières (poulet et canard), poils (de chèvres et de vache), cheveu humain et laine (de moutons et de lapin) comme seule source de carbone et d'azote. Les plumes et les cheveux ainsi que la laine, lavés, séchés et broyés ou non, sont complètement ou partiellement solubilisés, par la SAPDZ toute seule, au bout de 36 h de culture.

En tenant compte de toutes ces données, la souche *Bacillus circulans* DZ100 et l'enzyme SAPDZ semblent être intéressantes. Cette enzyme pourrait être utilisée avec succès dans plusieurs applications biotechnologiques comme bio-additif dans les détergents, dans les fourrages protéolytiques utiles dans l'alimentation animale et dans l'élaboration d'hydrolysats protéiques de plumes à usages microbiologiques.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Actuellement, les protéases microbiennes, en particulier celles produites par le genre *Bacillus* dominant le marché mondial des enzymes. Ces biocatalyseurs sont d'une grande importance économique, en considérant les applications industrielles multiples dans lesquelles elles sont impliquées. Les protéases détergentes et celles introduites en tannerie forment le groupe d'enzyme le plus recherché grâce aux avantages qu'elles présentent surtout dans la substitution des agents chimiques toxiques et polluants. L'obtention de nouvelles protéases pourrait soit conduire à de nouvelles applications biotechnologiques, soit à une amélioration des performances des enzymes existantes. L'application éventuelle de ces protéases intéressantes au niveau industriel, passe par la mise au point d'un procédé de production économique et reproductible. Ceci sera possible par la construction de souches hyperproductrices de ces enzymes et par l'optimisation des conditions de production à l'échelle laboratoire puis en fermenteur. En plus, la pénurie mondiale en protéases capables d'assurer la synthèse peptidique a suscité le développement de la recherche des nouvelles protéases tolérantes aux solvants organiques capables d'assurer la synthèse, tout en assurant de bons rendements et en substituant les agents chimiques toxiques.

Dans ce cadre nous avons initié un nouveau projet visant la recherche et l'identification de nouvelles activités protéasiques plus efficaces à partir de différents biotopes Algériens et capables d'agir dans les conditions extrêmes introduits dans différents procédés industriels. La purification et la caractérisation biochimique et moléculaire de l'enzyme ainsi que des éventuelles applications biotechnologiques notamment en tannerie et détergence ont été également effectuées dans ce présent travail.

La première partie de ce travail a porté sur l'isolement et le criblage de souches bactériennes protéolytiques produisant des enzymes actives et stables. En effet, nous avons isolé 135 nouvelles souches à partir des effluents d'abattoirs de la wilaya de Blida (Algérie). Ces souches ont été testées sur gélose nutritive au lait (test semi-qualitatif), 12 souches ont été retenues du fait qu'elles présentent un rapport du diamètre de l'halo sur le diamètre de la colonie (constitue un premier

critère de sélection) supérieur à la souche de référence (AB1). Ces 12 souches ont été sujettes à une étude de production sur milieu liquide pour une étude quantitative. Cette dernière a conduit à la sélection de 4 souches intéressantes à savoir : DZ007, DZ020, DZ055 et DZ100 vue qu'elles présentent un niveau de production supérieur à 226,54 U/ml (constitue un deuxième critère de sélection). Ensuite, la souche DZ100 a été retenue du fait qu'elle demeure active et stable dans une large gamme de pH alcalins (9,0-12,0) et de températures élevées (30-60 °C).

A la lumière de ces résultats, une seule souche (DZ100) a été retenue pour la suite du travail. L'identification de cette souche a été basée sur les méthodes biochimiques par galeries API CH50 d'une part, et sur les méthodes de biologie moléculaire par détermination de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S, d'autre part. Les résultats obtenus ont permis d'identifier la souche *Bacillus* DZ100 en tant qu'une sous espèce de *Bacillus circulans*. Cette souche apte à être active dans des conditions extrêmes de pH et température sera bien étudiée dans les deux parties qui suivent à savoir, la purification et la caractérisation des enzymes protéolytiques et leurs introductions dans des applications industrielles notamment le traitement du cuir (tannerie) et la détergence (formulation des détergents de lavages).

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à l'étude biochimique et moléculaire détaillée de l'enzyme SAPDZ. En effet, la protéase produite par la souche de « *Bacillus circulans* » DZ100 s'avère être très intéressante pour plusieurs applications industrielles. Ceci nous a incités à approfondir l'étude sur ces propriétés physico-chimiques. Pour cela, nous avons purifié à homogénéité la protéase nommée SAPDZ en quatre étapes de purification à savoir, un traitement thermique (30 min à 80°C), une précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium (40% à 70%), une chromatographie sur une colonne de filtration sur gel (Bio-Sil SEC 125) en utilisant le système HPLC suivie d'une chromatographie échangeuse de cations (Mono S) en utilisant le système FPLC. La SAPDZ est purifiée avec un facteur de purification de 61,22 fois et un rendement d'environ 25% et montre une activité spécifique de 75000 U/mg. L'analyse de l'enzyme pure, montre qu'elle est sous forme d'un seul monomère ayant une taille estimée à 32 kDa par filtration sur gel, PAGE et SDS-PAGE, puis précisée à 32019,10 Da par MALDI-TOF/MS. En

plus, le séquençage de l'extrémité NH₂-terminale (25 Aa), montre une forte homologie avec les subtilisines des autres souches de *B. pumilus*. La caractérisation biochimique de l'enzyme purifiée nous a permis de conclure que les optima de pH et de température de la SAPDZ sont de 12,5 et 85 °C, respectivement. Il s'agit d'une enzyme à sérine appartenant à la famille des protéases à sérine vue qu'elle est totalement inhibée par le PMSF et le DFP. L'étude cinétique a révélé également que la SAPDZ est douée d'une efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) très importante et ce comparativement aux protéases de références ; KERAB, KerA et SAPB-L33I/T33S/N99Y déterminée dans les conditions optimales de chaque enzyme. En utilisant la kératine comme un substrat naturel, les valeurs des paramètres cinétiques (K_m , et V_{max}) calculées de la SAPDZ sont de 0,501 mM et $21,150 \cdot 10^3$ U/mg, respectivement. Son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) déduite est de $44,79 \cdot 10^4$ min⁻¹ mM⁻¹. Pour les autres enzymes : KERAB, KerA et SAPB-L33I/T33S/N99Y leurs rapports k_{cat}/K_m sont respectivement de $17,92 \cdot 10^4$, $8,74 \cdot 10^4$ et de $14,38 \cdot 10^4$ min⁻¹ mM⁻¹. On constate que l'efficacité catalytique de la kératinase SAPDZ est 5,12 fois plus élevée que celle de KerA, 3,11 fois par rapport la SAPB-L33I/T33S/N99Y et 2,49 fois par rapport la KERAB. En plus, pour un substrat synthétique, nous avons remarqué aussi que l'efficacité catalytique de la SAPDZ est de $363,26 \cdot 10^3$ min⁻¹ mM⁻¹ : 6,05 fois plus élevée que celle de la KERAB. La SAPDZ maintient aussi une stabilité remarquable, pendant 120 h à 40 °C, en présence de plusieurs détergents commerciaux, ce qui la rend très attractive pour une éventuelle application en détergence.

Dans un autre volet de cette deuxième partie, le gène *sapDZ* codant pour l'activité protéase en question a été cloné, totalement séquencé et surexprimé au niveau de l'espace périplasmique chez *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. L'analyse de la séquence nucléotidique montre une phase de lecture ouverte (ORF) de 1149 pb (383 Aa) qui code pour un peptide signal de 87 pb (29 Aa), un pro-peptide de 237 pb (79 Aa) et la protéase mature de 825 pb (275 Aa), biologiquement active. La protéine recombinante purifiée possède les caractéristiques physico-chimiques et cinétiques identiques à celles trouvées pour la protéine native.

Dans une troisième partie nous nous sommes intéressés à l'élaboration de la production en fermenteur de la protéase SAPDZ par la souche « *Bacillus circulans* » DZ100. Les résultats obtenus ont montré que le meilleur niveau de production passe de 15000 U/ml en Erlenmeyer à 75000 U/ml en fermenteur (100 litres), après 36 h de croissance, sur le milieu optimisé à base de caséine comme source de carbone et d'énergie et peptone de soja comme source d'azote. Par ailleurs, nous avons montré que la préparation protéolytique homogène de la SAPDZ satisfait aux exigences d'une excellente protéase détergente et pourrait être utilisée avec succès dans des applications de traitement de cuir et de détergence comme bioadditifs dans la formulation des poudres lessivielles. D'une part, la souche *B. circulans* DZ100 s'est révélée, également, capable de se développer sur milieu minéral additionné de : farine de plumes de volailles (poulets), plumes entières (poulet et canard), poils (de chèvres et de vaches), cheveux humain et laine (de moutons et de lapin) comme seule source de carbone et d'azote. Les plumes et les cheveux ainsi que la laine, lavés, séchés et broyés ou non, sont complètement ou partiellement solubilisés, par la SAPDZ toute seule, au bout de 36 h de culture. D'autre part, la caractérisation de la SAPDZ semi-purifié en comparaison avec une enzyme commerciale (BPN') a montré que la SAPDZ est active en présence des détergents commercialisés liquides (Tied, Daz, Nadhif, Persil et le Chat) et solides (iSiS, Dixan, OMO, Ariel et Shems) à une concentration finale de 7 mg/ml. En plus, nous avons montré qu'elle est très efficace sur des taches de sang et de chocolat, ceci est évalué par des tests de lavage utilisant le détergent de lavage (iSiS) supplémentés de la SAPDZ. Par ailleurs et afin de mieux conserver la SAPDZ, un procédé de séchage, par lyophilisation de l'extrait enzymatique de la souche DZ100 a été réalisé.

En tenant compte de toutes ces données, réalisées dans la partie précédente, la souche « *Bacillus circulans* » DZ100 et l'enzyme SAPDZ semblent être intéressantes et pourraient être utilisées avec succès dans des applications biotechnologiques comme bio-additif dans les détergents, fourrages protéolytiques utile dans l'alimentation animale et dans l'élaboration d'hydrolysats protéiques de plumes. En effet, la production d'hydrolysats protéiques à usages industriel et microbiologiques apporterait une solution économiquement prometteuse à la substitution des produits importés tels que l'extrait de levures et les peptones

commerciales par les peptones de kératines. Ceci est du à la capacité de la SAPDZ d'achever, toute seule, le procédé de dégradation de ces substrats protéiniques et kératinolytiques.

En guise de perspective, nous envisageons la réalisation des deux parties suivantes:

- Une étude de relations structure-fonctions de cette enzyme.
- L'encapsulation de cette enzyme afin d'assurer sa stabilité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. et Deshpande, V.V. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases", *Microbiol, Mol, Biol, Reviews*, 62, (1998), 597-635.
2. Bayouth, A. « Production, purification et caractérisation des élastases de *Pseudomonas aeruginosa* MN1 et MN7. Clonage et séquençage des gènes correspondants », Thèse de Doctorat, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, 2009.
3. Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications", *Appl Microbiol Biotechnol* 59, (2002b), 15-32.
4. Gupta, R., et al., "An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases". *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002a. 60(4): p. 381-95.
5. Fujinami, S. and Fujisawa, M. "Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes--past, present and future". *Environ Technol*, 2010. 31(8-9): p. 845-56.
6. Ogawa, J. and Shimizu, S. "Industrial microbial enzymes: their discovery by screening and use in large-scale production of useful chemicals in Japan". *Curr Opin Biotechnol*, 2002. 13(4): p. 367-75.
7. Maurer, K.H. "Detergent proteases ». *Current Opinion Biotechnol*, 2004. 15(4): p. 330-334.
8. Niyonzima, F.N. and More, S. "Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis". *Prep Biochem Biotechnol*, 2015. 45(3): p. 233-58.
9. Lalmanach, G. "Proteolytic enzymes: from structures to transport pathways". *Biochimie*, 2008. 90(2): p. 191-3.
10. Han, J., et al., "An anticoagulant serine protease from the wasp venom of *Vespa magnifica*". *Toxicon*, 2008. 51(5): p. 914-922.
11. Shpacovitch, V., et al., "Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity". *J Leukoc Biol*, 2008.

12. Bayot, A., et al., "Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors". *Biochimie*, 2008. 90(2): p. 260-9.
13. Dahlback, B. "Blood coagulation". *Lancet*, 2000. 355(9215): p. 1627-32.
14. Barrett, A.J. "An introduction to the proteinases". BARRETT, A.J. et SALVESSEN, G. *Proteinase Inhibitors*, 1986. 1: p. 3-22.
15. Barrett, A.J., Rawlings, N.D. and O'Brien, E.A. "The MEROPS database as a protease information system". *J Struct Biol*, 2001. 134(2-3): p. 95-102.
16. Rawlings, N.D., et al., "MEROPS: the peptidase database". *Nucleic Acids Res*, 2008. 36(Database issue): p. D320-5.
17. Barrett, A.J., Rawlings, N.D and Woessner, J.F., "Handbook of proteolytic enzymes". Academic Press, Londres, 1998: p. 1666.
18. van der Hoorn, R.A. "Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms". *Annu Rev Plant Biol*, 2008.
19. Barrett, A.J. "Protein degradation in health and disease. Introduction: the classification of proteinases". *Ciba Found Symp*, 1979(75): p. 1-13.
20. Kato, T., et al., "Purification of a new extracellular 90-kDa serine proteinase with isoelectric point of 3.9 from *Bacillus subtilis* (natto) and elucidation of its distinct mode of action". *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992. 56(7): p. 1166-8.
21. Tobe, S., et al., "Expression of *Bacillus* protease (Protease BYA) from *Bacillus* sp. Y in *Bacillus subtilis* and enhancement of its specific activity by site-directed mutagenesis-improvement in productivity of detergent enzyme". *Biol Pharm Bull*, 2006. 29(1): p. 26-33.
22. Jelinek, B., et al., "The Crystal Structure of a Trypsin-like Mutant Chymotrypsin: The Role of Position 226 in the Activity and Specificity of S189D Chymotrypsin". *Protein J*, 2008. 27(2): p. 79-87.
23. Lin, X., et al., "Nucleotide sequence and expression of *kerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1". *Appl Environ Microbiol*, 1995. 61(4): p. 1469-74.
24. Drenth, J., et al., "Subtilisin Novo. The three-dimensional structure and its comparison with subtilisin BPN". *Eur J Biochem*, 1972. 26(2): p. 177-81.
25. Barrett, A.J. and Rawlings, N.D. "Families and clans of serine peptidases". *Arch Biochem Biophys*, 1995. 318(2): p. 247-50.

26. Schechter, I. and Berger, A. "On the size of the active site in proteases. I. *Papain*". *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. 27(2): p. 157-62.
27. Branden, C. and Tooze, J. "Introduction to protein structure". New York: *Garland Publishing, Inc.* 1991.
28. Janowski, R., et al., "Two polymorphs of a covalent complex between papain and a diazomethylketone inhibitor". *J Pept Res*, 2004. 64(4): p. 141-50.
29. Xie, D., et al., "Dissection of the pH dependence of inhibitor binding energetics for an aspartic protease: direct measurement of the protonation states of the catalytic aspartic acid residues". *Biochemistry*, 1997. 36(51): p. 16166-72.
30. Kumar, A.G., et al., "Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries". *Bioresour Technol*, 2008. 99(7): p. 2364-72.
31. Wang, Y., et al., "Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression". *Fungal Genet Biol*, 2008. 45(1): p. 17-27.
32. Nakahama, K., et al., "Cloning and sequencing of *Serratia protease gene*". *Nucleic Acids Res*, 1986. 14(14): p. 5843-55.
33. Miyoshi, S. and Shinoda, S. "Microbial metalloproteases and pathogenesis". *Microbes Infect*, 2000. 2(1): p. 91-8.
34. Rawlings, N.D. and Barrett, A.J. "Evolutionary families of metallopeptidases". *Methods Enzymol*, 1995. 248: p. 183-228.
35. Wang, J., et al., "Variation of extracellular proteases produced by *Vibrio vulnificus* clinical isolates: Genetic diversity of the metalloprotease gene (*vvp*), and serine protease secretion by *vvp*-negative strains". *Microb Pathog*, 2008.
36. Ghorbel-Frikha, B., et al., "Production and purification of a calcium-dependent protease from *Bacillus cereus* BG1". *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2005. 32(5): p. 186-94.
37. Manni, L., et al., "Biochemical and molecular characterization of a novel calcium-dependent metalloprotease from *Bacillus cereus* SV1". *Process Biochem*, 2008. In press.
38. Seemuller, E., et al., "The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease". *FEBS Lett*, 1995. 359(2-3): p. 173-8.

39. Zwickl, P., Lottspeich, F. and Baumeister, W. "*Expression of functional Thermoplasma acidophilum proteasomes in Escherichia coli*". FEBS Letters, 1992. 312(2-3): p. 157-160.
40. Seemuller, E., et al., "*Proteasome from Thermoplasma acidophilum: a threonine protease*". Science, 1995. 268(5210): p. 579-82.
41. Orłowski, M., "*Selective activation of the 20 S proteasome (multicatalytic proteinase complex) by histone h3*". Biochemistry, 2001. 40(50): p. 15318-26.
42. Orłowski, M. and Wilk, S. "*Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex*". Arch Biochem Biophys, 2000. 383(1): p. 1-16.
43. Orłowski, M. and Wilk, S. "*Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome*". Arch Biochem Biophys, 2003. 415(1): p. 1-5.
44. Azarkan, M., et al., "*Crystallization and preliminary X-ray analysis of a protease inhibitor from the latex of Carica papaya*". Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2006. 62(Pt 12): p. 1239-42.
45. Taussig, S.J. and Batkin, S. "*Bromelain, the enzyme complex of pineapple (Ananas comosus) and its clinical application*". An update. J Ethnopharmacol, 1988. 22(2): p. 191-203.
46. Brandelli, A., Daroit, D.J. and Riffel, A. "*Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications*". Appl Microbiol Biotechnol, 2010. 85(6): p. 1735-50.
47. Baeyens-Volant, D., et al., "*A novel form of ficin from Ficus carica latex: Purification and characterization*". Phytochemistry, 2015. 117: p. 154-167.
48. Zare, H., et al., "*Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (Ficus carica cv. Sabz) latex*". Phytochemistry, 2013. 87: p. 16-22.
49. Williams, D.C. and Whitaker, J.R. "*Multiple Molecular Forms of Ficus glabrata Ficin. Their Separation and Relative Physical, Chemical, and Enzymatic Properties*". Plant Physiol, 1969. 44(11): p. 1574-83.
50. Azarkan, M., et al., "*Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from Ficus carica latex*". Phytochemistry, 2011. 72(14-15): p. 1718-31.
51. Chitpinyol, S., Goode, D. and Crabbe, M.J. "*Studies on the binding of alpha-crystallin to recombinant prochymosins and chymosin*". Mol Vis, 1998. 4: p. 1.

52. Kappeler, S.R., et al., "*Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk*". *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 342(2): p. 647-54.
53. Derkx, F.H., Bouma, B.N. and Schalekamp, M.A. "*Prorenin-renin conversion by the contact activation system in human plasma: role of plasma protease inhibitors*". *J Lab Clin Med*, 1984. 103(4): p. 560-73.
54. Takaoka, M., et al., "*Pepsin, an aspartic protease, converts porcine big endothelin to 21-residue endothelin*". *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. 166(1): p. 436-42.
55. Brattsand, M. and Egelrud, T. "*Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation*". *J Biol Chem*, 1999. 274(42): p. 30033-40.
56. Wysocka, M., et al., "*Substrate specificity and inhibitory study of human airway trypsin-like protease*". *Bioorg Med Chem*, 2010. 18(15): p. 5504-9.
57. Johnson, D.A. and Travis, J. "*Rapid purification of human trypsin and chymotrypsin I*". *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 573-6.
58. Agasthya, A.S., et al., "*Isolation and Molecular Characterisation of Alkaline Protease Producing Bacillus thuringiensis*". *Cell Biochem Biophys*, 2013. 66(1): p. 45-51.
59. Bezawada, J., et al., "*Comparison of protease activities in different Bacillus licheniformis strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material*". *Environ Technol*, 2010. 31(1): p. 63-72.
60. Agrahari, S. and Wadhwa, N. "*Isolation and characterization of feather degrading enzymes from Bacillus megaterium SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site*". *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2012. 48(2): p. 199-205.
61. Banik, R.M. and Prakash, M. "*Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from Bacillus cereus*". *Microbiol Res*, 2004. 159(2): p. 135-40.
62. Deivasigamani, B. and Alagappan, K.M. "*Industrial application of keratinase and soluble proteins from feather keratins*". *J Environ Biol*, 2008. 29(6): p. 933-6.
63. Sellami-Kamoun, A., et al., "*Stability of thermostable alkaline protease from Bacillus licheniformis RP1 in commercial solid laundry detergent formulations*". *Microbiol Res*, 2008. 163(3): p. 299-306.

64. Tronchin, G., et al., "Purification and partial characterization of a 32-kilodalton sialic acid-specific lectin from *Aspergillus fumigatus*". *Infect Immun*, 2002. 70(12): p. 6891-5.
65. Hajji, M., et al., "Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1". *Process Biochemistry*, 2010. 45(10): p. 1746-1752.
66. Hajji, M., et al., "Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1". *Process Biochemistry*, 2007. 42(5): p. 791-797.
67. Boyce, A. and Walsh, G. "Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry". *Chemosphere*, 2012. 88(2): p. 211-8.
68. Siezen, R.J., Renckens, B. and Boekhorst, J. "Evolution of prokaryotic subtilases: genome-wide analysis reveals novel subfamilies with different catalytic residues". *Proteins*, 2007. 67(3): p. 681-94.
69. Smith, E.L., et al., "Subtilisin Carlsberg. V. The complete sequence; comparison with subtilisin BPN'; evolutionary relationships". *J Biol Chem*, 1968. 243(9): p. 2184-91.
70. Steinmetz, A.C., Demuth, H.U and Ringe, D. "Inactivation of subtilisin Carlsberg by N-((tert-butoxycarbonyl)alanylprolylphenylalanyl)-O-benzoylhydroxyl- amine: formation of a covalent enzyme-inhibitor linkage in the form of a carbamate derivative". *Biochemistry*, 1994. 33(34): p. 10535-44.
71. Huang, H.W., et al., "Kinetic studies of the inhibitory effects of propeptides subtilisin BPN' and Carlsberg to bacterial serine proteases". *Protein Eng*, 1997. 10(10): p. 1227-33.
72. Lerner, C.G., Kobayashi, T. and Inouye, M. "Isolation of subtilisin pro-sequence mutations that affect formation of active protease by localized random polymerase chain reaction mutagenesis". *J Biol Chem*, 1990. 265(33): p. 20085-6.
73. McPhalen, C.A. and James, M.N. "Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and Cl-2-subtilisin Novo". *Biochemistry*, 1988. 27(17): p. 6582-98.
74. Shinde, U., et al., "Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(15): p. 6924-8.

75. Tang, L.B., et al., "Isolation and characterization of levansucrase-encoding gene from *Bacillus amyloliquefaciens*". *Gene*, 1990. 96(1): p. 89-93.
76. Subbian, E., Yabuta, Y. and Shinde, U.P. "Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin". *J Mol Biol*, 2005. 347(2): p. 367-83.
77. Yabuta, Y., et al., "Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. A functional peptide chaperone designed using sequence databases". *J Biol Chem*, 2003. 278(17): p. 15246-51.
78. Inouye, M., Fu, X. and Shinde, U. "Substrate-induced activation of a trapped IMC-mediated protein folding intermediate". *Nat Struct Biol*, 2001. 8(4): p. 321-5.
79. Shinde, U. and Inouye, M. "Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding". *Semin Cell Dev Biol*, 2000. 11(1): p. 35-44.
80. Zhu, X.L., et al., "Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process". *Nature*, 1989. 339(6224): p. 483-4.
81. Barr, P.J., "Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases". *Cell*, 1991. 66(1): p. 1-3.
82. Shinde, U. and Inouye, M. "The structural and functional organization of intramolecular chaperones: the N-terminal propeptides which mediate protein folding". *J Biochem*, 1994. 115(4): p. 629-36.
83. Silen, J.L. and Agard, D.A. "The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo". *Nature*, 1989. 341(6241): p. 462-4.
84. Winther, J.R., Sorensen, P. and Kielland-Brandt, M.C. "Refolding of a carboxypeptidase Y folding intermediate in vitro by low-affinity binding of the proregion". *J Biol Chem*, 1994. 269(35): p. 22007-13.
85. Shinde, U. and Inouye, M. "Propeptide-mediated folding in subtilisin: the intramolecular chaperone concept". *Adv Exp Med Biol*, 1996. 379: p. 147-54.
86. Kobayashi, T. and Inouye, M. "Functional analysis of the intramolecular chaperone. Mutational hot spots in the subtilisin pro-peptide and a second-site suppressor mutation within the subtilisin molecule". *J Mol Biol*, 1992. 226(4): p. 931-3.

87. Eder, J. and Fersht, A.R. "*Pro-sequence-assisted protein folding*". Mol Microbiol, 1995. 16(4): p. 609-14.
88. Eder, J., Rheinneckner, M. and Fersht, A.R. "*Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence*". J Mol Biol, 1993. 233(2): p. 293-304.
89. Subbian, E., Yabuta, Y. and Shinde, U.P. "*Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin*". J Mol Biol, 2005. 347(2): p. 367-83.
90. Li, Y., et al., "*Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants*". J Biol Chem, 1995. 270(42): p. 25127-32.
91. Teplyakov, A., Gros, P. and Hol, W.G. "*Crystallographic study of eglin-C binding to thermitase*". Adv Exp Med Biol, 1996. 379: p. 5-9.
92. Yabuta, Y., et al., "*Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: dissecting conformational changes coincident with autoprocessing and the role of Ca(2+) in subtilisin maturation*". J Biochem, 2002. 131(1): p. 31-7.
93. Greenlfield, N. and Fasman, G.D. "*Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation*". Biochemistry 1969. 8: p. 4108-4116.
94. Fu, X., Inouye, M. and Shinde, U. "*Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked*". J Biol Chem, 2000. 275(22): p. 16871-8.
95. Ohta, Y., et al., "*Pro-peptide as an intramolecular chaperone: renaturation of denatured subtilisin E with a synthetic pro-peptide [corrected]*". Mol Microbiol, 1991. 5(6): p. 1507-10.
96. Dressler, D. and Potter, H. "*Discovering Enzymes*" (Hardcover) W H Freeman & Co (February 1991) 1991: p. 263 pages .
97. Wells, J.A. and Powers, D.B. "*In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin*". J Biol Chem, 1986. 261(14): p. 6564-70.
98. Takagi, H., et al., "*Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease*". J Biol Chem, 1990. 265(12): p. 6874-8.
99. Zhao, H. and Arnold, F.H. "*Directed evolution converts subtilisin E into a functional equivalent of thermitase*". Protein Eng., 1999. 12: p. 47-53.

100. Wells, J.A., et al., "Cloning, sequencing, and secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin in *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res", 1983. 11(22): p. 7911-25.
101. Jacobs, M., et al., "Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*". Nucleic Acids Res, 1985. 13(24): p. 8913-26.
102. Yamagata, Y., et al., "Molecular cloning and nucleotide sequence of the 90k serine protease gene, *hspK*, from *Bacillus subtilis* (natto) No". 16. Curr Microbiol, 1995. 31(6): p. 340-4.
103. Yamagata, Y., Isshiki, K. and Ichishima, E. "Subtilisin Sendai from alkalophilic *Bacillus* sp.: molecular and enzymatic properties of the enzyme and molecular cloning and characterization of the gene, *aprS*". Enzyme Microb Technol, 1995. 17(7): p. 653-63.
104. Jacobs, M.F., "Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*". Gene, 1995. 152(1): p. 69-74.
105. Strongin, A.Y., et al., "Direct comparison of the subtilisin-like intracellular protease of *Bacillus licheniformis* with the homologous enzymes of *Bacillus subtilis*". J Bacteriol, 1979. 137(2): p. 1017-9.
106. Khan, M.S. and Ahmad, I. "In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of *Cinnamomum*-, *Syzygium*- and *Cymbopogon*-species against *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*". Phytomedicine, 2011. 19(1): p. 48-55.
107. Kim, J.D., "Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03". Mycobiology, 2007. 35(4): p. 219-25.
108. Kim, J.D., "Immobilization of Keratinase from *Aspergillus flavus* K-03 for Degradation of Feather Keratin". Mycobiology, 2005. 33(2): p. 121-3.
109. Habbeche, A., et al., "Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinolytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost". J Biosci Bioeng, 2014. 117(4): p. 413-21.
110. Jaouadi, B., et al., "Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with

- high stability in organic solvents*". Bioresour Technol, 2010. 101(21): p. 8361-9.
111. Jaouadi, B., et al., "*Enhancement of the thermostability and the catalytic efficiency of Bacillus pumilus CBS protease by site-directed mutagenesis*". Biochimie, 2010. 92(4): p. 360-9.
 112. Jaouadi, B., et al., "*Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Bacillus pumilus CBS with high catalytic efficiency*". Biochimie, 2008. 90(9): p. 1291-305.
 113. Zarai Jaouadi, N., et al., "*A novel keratinase from Bacillus tequilensis strain Q7 with promising potential for the leather bating process*". Int J Biol Macromol, 2015. 79: p. 952-64.
 114. Zarai Jaouadi, N., et al., "*Probing the crucial role of Leu31 and Thr33 of the Bacillus pumilus CBS alkaline protease in substrate recognition and enzymatic depilation of animal hide*". PLoS One, 2014. 9(9): p. e108367.
 115. Mitsuiki, S., et al., "*Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic Nocardiosis sp. TOA-1*". Enzyme and Microbial Technology, 2004. 34(5): p. 482-489.
 116. Gupta, R., et al., "*Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases*". Appl Microbiol Biotechnol, 2013. 97(23): p. 9931-40.
 117. Gupta, R. and Ramnani, P. "*Microbial keratinases and their prospective applications: an overview*". Appl Microbiol Biotechnol, 2006. 70(1): p. 21-33.
 118. Lin, X., et al., "*Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Bacillus licheniformis Strain*". Appl Environ Microbiol, 1992. 58(10): p. 3271-5.
 119. Moulder, J.W. and Evans, E.A. "*The biochemistry of the malaria parasite; studies on the nitrogen metabolism of the malaria parasite*". J Biol Chem, 1946. 164: p. 145-57.
 120. Liu, B., et al., "*Enhanced thermostability of keratinase by computational design and empirical mutation*". J Ind Microbiol Biotechnol, 2013. 40(7): p. 697-704.
 121. Danciulescu, C., Nick, B. and Wortmann, F.J. "*Structural stability of wild type and mutated alpha-keratin fragments: molecular dynamics and free energy calculations*". Biomacromolecules, 2004. 5(6): p. 2165-75.

122. Fraser, R.D. and Parry, D.A. "*The three-dimensional structure of trichocyte (hard alpha-) keratin intermediate filaments: the nature of the repeating unit*". J Struct Biol, 2006. 155(2): p. 375-8.
123. Yamamoto, S., et al., "*Molecular elements of the regulatory control of keratin filament modulator AHF/trichohyalin in the hair follicle*". Exp Dermatol, 2009. 18(2): p. 152-9.
124. Alibardi, L., Knapp, L.W. and Sawyer, R.H. "*Beta-keratin localization in developing alligator scales and feathers in relation to the development and evolution of feathers*". J Submicrosc Cytol Pathol, 2006. 38(2-3): p. 175-92.
125. Vanhoutteghem, A., et al., "*Serial cultivation of chicken keratinocytes, a composite cell type that accumulates lipids and synthesizes a novel beta-keratin*". Differentiation, 2004. 72(4): p. 123-37.
126. Godfrey, T. and Reichelt, P. eds. "*The application of enzymes in Industry*". 1985, In: Industrial Enzymology". The Nature Press, London.
127. Schafer, T., et al., « *Industrial enzymes* ». Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. 105: p. 59-131.
128. Nardello-Rataj, V., Ho Tan Tai, L. and Aubry, J.M. « *Les lessives en poudre : Un siècle d'innovations pour éliminer les taches* ». Actualité chimique 2003: p. 3-10.
129. Marchal, F., et al., « *Lyotropic liquid crystal behaviour of azelate and succinate monoester surfactants based on fragrance alcohols* ». J Colloid Interface Sci, 2008. 321(1): p. 177-85.
130. Richards, C., Tiddy, G.J. and Casey, S. "*Lateral phase separation gives multiple lamellar phases in a "binary" surfactant/water system: the phase behavior of sodium alkyl benzene sulfonate/water mixtures*". Langmuir, 2007. 23(2): p. 467-74.
131. Sachdef, A. and Krishnan, S. "*Heavy-duty liquid detergent. Liquid detergents*". New York : Marcel Dekker, 1997: p. 261-324.
132. Kumar, C.G., Malik, R.K. and M.P, T. "*Novel enzyme-based detergents : an indian perspective*". Curr. Sc., 1998. 75(1312-1318).
133. Kumar, C.G. and Takagi, H. "*Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint*". Biotechnol Adv, 1999. 17(7): p. 561-594.
134. Ghani, M., "*Protein-containing granules and granule formulations*". 2001.

135. Tindbaek, N., et al., "*Engineering a substrate-specific cold-adapted subtilisin*". Protein Eng Des Sel, 2004. 17(2): p. 149-56.
136. Kanth, S.V., et al., "*Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: Role of acid protease*". Bioresour Technol, 2009. . 100(8): p. 2430-5.
137. Varela, H., et al., "*Skin unhairing proteases of Bacillus subtilis : production and partial characterization*". Biotechnol. Lett., 1997. 19 p. 755-758.
138. Ganesh Kumar, A., et al., "*Production of alkaline protease by Pseudomonas aeruginosa using proteinaceous solid waste generated from leather manufacturing industries*". Bioresour Technol, 2008. 99(6): p. 1939-44.
139. Dalev, P., "*An enzyme-alkaline hydrolysis of feather keratin for obtaining a protein concentrate for fodder*". Biotechnology Letters, 1990. 12(1): p. 71-72.
140. Cheng, S.W., et al., "*Production and characterization of keratinase of a feather-degrading Bacillus licheniformis PWD-1*". Biosci Biotechnol Biochem, 1995. 59(12): p. 2239-43.
141. Cedrola, S.M., et al., "*Keratinases and sulfide from Bacillus subtilis SLC to recycle feather waste*". World J Microbiol Biotechnol, 2012. 28(3): p. 1259-69.
142. Mazotto, A.M., et al., "*Keratinase Production by Three Bacillus spp. Using Feather Meal and Whole Feather as Substrate in a Submerged Fermentation*". Enzyme Res, 2011. 2011: p. 523780.
143. Prasong, S., Yaowalak, S. and Wilaiwan, S. "*Characteristics of silk fiber with and without sericin component: a comparison between Bombyx mori and Philosamia ricini silks*". Pak J Biol Sci, 2009. 12(11): p. 872-6.
144. Mandal, B.B. and Kundu, S.C. "*Biospinning by silkworms: silk fiber matrices for tissue engineering applications*". Acta Biomater, 2010. 6(2): p. 360-71.
145. Joshi, S. and Satyanarayana, T. "*Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium Bacillus lehensis*". Bioresour Technol, 2013. 131: p. 76-85.
146. Masui, A., et al., "*Enzymatic hydrolysis of gelatin layers on used lith film using thermostable alkaline protease for recovery of silver and PET film*". Biotechnol Prog, 2004. 20(4): p. 1267-9.
147. Jain, R. and Jain, P.C. "*Production and partial characterization of collagenase of Streptomyces exfoliatus CFS 1068 using poultry feather*". Indian J Exp Biol, 2010. 48(2): p. 174-8.

148. Moreira-Gasparin, F.G., et al., "*Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from Myrothecium verrucaria*". *Biodegradation*, 2009. 20(5): p. 727-36.
149. Anbu, P., Hilda, A. and Gopinath, S.C. "*Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India*". *Mycopathologia*, 2004. 158(3): p. 303-9.
150. Sangali, S. and Brandelli, A. "*Feather keratin hydrolysis by a Vibrio sp. strain kr2*". *J Appl Microbiol*, 2000. 89(5): p. 735-43.
151. Forgacs, G., et al., "*Biological treatment of chicken feather waste for improved biogas production*". *J Environ Sci (China)*, 2011. 23(10): p. 1747-53.
152. Hmidet, N., et al., "*Chicken feathers: a complex substrate for the co-production of alpha-amylase and proteases by B. licheniformis NH1*". *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010. 37(9): p. 983-90.
153. Badis, A., et al., "*Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification*". *Desalination*, 2010. 259(1-3): p. 216-222.
154. Jaouadi, N.Z., et al., "*Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from Brevibacillus brevis US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities*". *PLoS One*, 2013. 8(10): p. e76722.
155. Jaouadi, B., et al., "*Excellent laundry detergent compatibility and high dehairing ability of the Bacillus pumilus CBS alkaline proteinase (SAPB)*". *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2009. 14 p. 503-512.
156. Nishihara, T., Iwabuchi, T. and Nohno, T. "*A T7 promoter vector with a transcriptional terminator for stringent expression of foreign genes*". *Gene*, 1994. 145(1): p. 145-6.
157. Amann, E., Ochs, B. and Abel, K.J. "*Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in Escherichia coli*". *Gene*, 1988. 69(2): p. 301-15.
158. Thomas, D.C., Levy, M. and Sancar, A. "*Amplification and purification of UvrA, UvrB, and UvrC proteins of Escherichia coli*". *J Biol Chem*, 1985. 260(17): p. 9875-83.

159. Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. "*Molecular cloning: A laboratory Manual*", 2nd edn. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
160. Ruan, J., "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (second edition) Volume 5 and the study of Actinomycetes systematic in China. Wei Sheng Wu Xue Bao, 2013. 53(6): p. 521-30.
161. Yabuuchi, E., "*Current topics on classification and nomenclature of bacteria. 7. Taxonomic outline of Archeae and bacteria in the Second Edition of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*". Kansenshogaku Zasshi, 2001. 75(8): p. 653-5.
162. Agbonlahor, D.E., Odugbemi, T.O. and Udofia, P.O. "*Differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria and yeasts using a modification of the "string" test*". Am J Med Technol, 1983. 49(3): p. 177-8.
163. Haslett, A.S., "*The chemical significance of the Gram test for bacteria*". Aust J Sci, 1947. 9(6): p. 211.
164. Zarái Jaouadi, N., et al., "*The overexpression of the SAPB of Bacillus pumilus CBS and mutated sapB-L311/T33S/N99Y alkaline proteases in Bacillus subtilis DB430: new attractive properties for the mutant enzyme*". Bioresour Technol, 2012. 105: p. 142-51.
165. Kembhavi, A.A., et al., "*The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays*". Arch. Biochem. Biophys., 1993. 303(2): p. 208-213.
166. Peterson, G.L., "*A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*". Anal Biochem, 1977. 83(2): p. 346-356.
167. DelMar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W. and Geokas, M.C. "*A sensitive new substrate for chymotrypsin*". Anal Biochem, 99(2), (1979) 316-20.
168. Ellman, G.L., "*Tissue sulfhydryl groups*". Arch Biochem Biophys, 1959. 82(1): p. 70-7.
169. Cock, P.J., et al., "*NCBI BLAST+ integrated into Galaxy*". Gigascience, 2015. 4: p. 39.
170. Zaslavsky, L. and Tatusova, T. "*Mining the NCBI Influenza Sequence Database: adaptive grouping of BLAST results using precalculated neighbor indexing*". PLoS Curr, 2009. 1: p. RRN1124.

171. Johnson, M., et al., *NCBI BLAST: a better web interface*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(Web Server issue): p. W5-9.
172. D'Addabbo, P., et al., "*GeneRecords: a relational database for GenBank flat file parsing and data manipulation in personal computers*". Bioinformatics, 2004. 20(16): p. 2883-5.
173. Karsch-Mizrachi, I. and Ouellette, B.F. "*The GenBank sequence database*". Methods Biochem Anal, 2001. 43: p. 45-63.
174. Ouellette, B.F., "*The GenBank sequence database*". Methods Biochem Anal, 1998. 39: p. 16-45.
175. Bradford, M.M., "*A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*". Anal. Biochem., 1976. 72: p. 248-254.
176. Laemmli, U.K., "*Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*". Nature, 1970. 227: p. 680-685.
177. Hewick, R.M., et al., "*A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator*". J Biol Chem, 1981. 256(15): p. 7990-7.
178. Hunkapiller, M.W. and Hood, L.E. "*Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (polybrene), and high pressure liquid chromatography*". Biochemistry, 1978. 17(11): p. 2124-33.
179. Abe, J., Onitsuka, N., Nakano, T., Shibata, Y., Hizukuri, S. and Entani, E. "*Purification and characterization of periplasmic alpha-amylase from Xanthomonas campestris K-11151*". J Bacteriol 176, 1994, 3584-8.
180. Adler-Nissen, J., "*Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food*". Ann Nutr Aliment, 1978. 32(2-3): p. 205-16.
181. Bouacem, K., et al., "*Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from Caldicoprobacter guelmensis*". Int J Biol Macromol, 2015. 81: p. 299-307.
182. Arnold, K., et al., "*The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*". Bioinformatics, 2006. 22(2): p. 195-201.
183. Guex, N. and Peitsch, M.C. "*SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*". Electrophoresis, 1997. 18(15): p. 2714-23.

184. Peitsch, M.C., "ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling". *Biochem Soc Trans*, 1996. 24(1): p. 274-9.
185. Van Gunsteren, W.F., et al., "Biomolecular simulation: the GROMOS96 manual and user guide. Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Zürich". Switzerland; Groningen, The Netherlands, 1996: p. 1-1042.
186. Fabrice, L., et al., "Screening and directed evolution of novel biocatalysts for industrial purposes". *L' Actualité chimique* 2002. 8: p. 27-30.
187. Nilegaonkar, S.S., Zambare, W.P., Kanekar, P.P., Dkakephalkar, P.K. and Sarnaik, S.S., "Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-236". *Biores. Technol.*, 98, (2007), 1238-1245.
188. Hutadilok, N.T., Anongnat, P. and Parasert, S. "Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp. PS719*". *J Biosci Bioeng*, 1999. 87: p. 581-587.
189. Bouacem, K., et al., "Novel serine keratinase from *Caldicoprobacter algeriensis* exhibiting outstanding hide dehairing abilities". *Int J Biol Macromol*, 2016. 86: p. 321-8.
190. Jaouadi, B. and Bejar, S. "Characterization of an original serine alkaline proteinase from *Bacillus pumilus* CBS". *Journal of Biotechnology*, 2008. 136, Supplement: p. S305.
191. Sobek, H., et al., "X-ray structure determination and comparison of two crystal forms of a variant (Asn115Arg) of the alkaline protease from *Bacillus alcalophilus* refined at 1.85 Å resolution". *J Mol Biol*, 1992. 228(1): p. 108-17.
192. Teplyakov, A.V., et al., "Protein engineering of the high-alkaline serine protease PB92 from *Bacillus alcalophilus*: functional and structural consequences of mutation at the S4 substrate binding pocket". *Protein Eng*, 1992. 5(5): p. 413-20.
193. Muro, T., et al., "Purification and some properties of protease I having transfer action from *Streptomyces griseus* var. *alcalophilus*". *Agric Biol Chem*, 1991. 55(2): p. 307-14.
194. Johnvesly, B. and Naik, G. "Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp. JB- 99* in a chemically defined medium". *Process Biochem.*, 2001. 37: p. 139-144.

195. Ben Elhoul, M., et al., "A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650". *Int J Biol Macromol*, 2015. 79: p. 871-82.
196. Kobayashi, T., et al., "Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16". *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995. 43(3): p. 473-81.
197. Yamane, T., et al., "Structure of a new alkaline serine protease (*M*-protease) from *Bacillus* sp. KSM-K16". *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1995. 51(Pt 2): p. 199-206.
198. Cao, Z.-J., et al., "Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme". *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2009. 36(2): p. 181-188.
199. Farag, A.M. and Hassan, M.A. "Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*". *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. 34(2): p. 85-93.
200. Suntornsuk, W., et al., "Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005. 21(6-7): p. 1111-1117.
201. Chandrasekaran, M., et al., "Isolation, characterization and molecular three-dimensional structural predictions of metalloprotease from a phytopathogenic fungus, *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sor". *J Biosci Bioeng*, 2016.
202. Rubino, J.T., et al., "Structural characterization of zinc-bound Zmp1, a zinc-dependent metalloprotease secreted by *Clostridium difficile*". *J Biol Inorg Chem*, 2016. 21(2): p. 185-96.
203. Lei, F., et al., "Purification and characterization of a new neutral metalloprotease from marine *Exiguobacterium* sp. SWJS2". *Biotechnol Appl Biochem*, 2016. 63(2): p. 238-48.
204. Kublanov, I., et al., "Keratinase of an anaerobic thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal Rift zone". *Microbiology*, 2009. 78(1): p. 67-75.
205. Kojima, M., et al., "Isolation and characterization of a feather-degrading enzyme from *Bacillus pseudofirmus* FA30-01". *Extremophiles*, 2006. 10(3): p. 229-235.

- 206.** Gessesse, A., et al., "Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather". *Enzyme and Microbial Technology*, 2003. 32(5): p. 519-524.
- 207.** Guerrero, R., "Bergey's manuals and the classification of prokaryotes. *Int Microbiol*, 2001. 4(2): p. 103-9.
- 208.** Gurtler, V. and V. Stanisich, *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*". *Microbiology*, 1996. **142**: p. 3-16.
- 209.** Claus, D. and Berkeley, R.C.W. "Genus *Bacillus* 1986: In : P.H.A. Sneath et al. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*", Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. Vol. 2. Cohn 1872, pp. 1105-1139.
- 210.** Souissi, N., et al., "Preparation and use of media for protease-producing bacterial strains based on by-products from Cuttlefish (*Sepia officinalis*) and wastewaters from marine-products processing factories". *Microbiol Res*, 2008. **163**(4): p. 473-80.
- 211.** Ku, T.W., Tsai, R.L. and Pan, T.M. "A simple and cost-saving approach to optimize the production of subtilisin NAT by submerged cultivation of *Bacillus subtilis natto*". *J Agric Food Chem*, 2009. **57**(1): p. 292-6.
- 212.** Akolkar, A., et al., "Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. *SP1(1)*". *Lett Appl Microbiol*, 2009. **48**(1): p. 77-83.
- 213.** Zaraï Jaouadi, N., et al., "Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities". *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76722.
- 214.** Kumar, C.G., "Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*". *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002. **34**(1): p. 13-17.
- 215.** Beg, Q. and Gupta, R. "Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*. *Enzyme Microb Technol.*, 2003. 32: p. 294-304.
- 216.** Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N. et Berdutina, A.V., "Properties and uses of protein hydrolysates". *App. Biochem. Microbiol.*, V.36 ,(2000),452-459.

217. Sana, B., Ghosh, D., Saha, M. and Mukherjee, J., "purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteobacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans", *Process Biochem.*, 41, 2006, 208-215.
218. Beg, Q. and Gupta, R., "Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*", *Enzyme Microbial and Technology* 32, 2003, 294-304.
219. Aoyama, M., et al., "Sequence of the gene encoding an alkaline serine proteinase of *Bacillus pumilus* TYO-67". *Microbiol Immunol*, 2000. **44**(5): p. 389-93.
220. Pan, J., Huang, Q. and Zhang, Y. "Gene cloning and expression of an alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*". *Curr Microbiol*, 2004. **49**(3): p. 165-9.
221. Nielsen, H., et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". *Protein Eng*, 1997. **10**(1): p. 1-6.
222. Dyrlov Bendtsen, J., et al., "Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0". *Journal of Molecular Biology*, 2004. **340**(4): p. 783-795.
223. Siezen, R.J. and Leunissen, J.A. "Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases". *Protein Sci*, 1997. **6**(3): p. 501-23.
224. Son, H.J., et al., "Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*". *Biotechnol Lett*, 2008. **30**(3): p. 461-465.
225. Williams, C.M., et al., "Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium". *Appl Environ Microbiol*, 1990. **56**(6): p. 1509-1515.
226. Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. "Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture". *Process Biochemistry*, 2000. **36**(1-2): p. 131-139.
227. Annamalai, N., Rajeswari, M.V. and Balasubramanian, T. "Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes". *Food and Bioproducts Processing*, 2014. **92**(4): p. 335-342.

ANNEXES

Annexe 1 : Les paramètres de l'étude physiologique

a) Test de l'oxydase

L'oxydase du cytochrome assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit. Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles et coques GRAM négatifs. Pour cela, une parcelle de culture est déposée sur un disque de papier filtre imprégné de réactif (disque oxydase). Une coloration rose se manifeste en quelques minutes en cas de réaction positive.

b) Test de la catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air, des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe. Elle est synthétisée par la plupart des bactéries en aérobies. Le test de la catalase sert à détecter la présence de cette enzyme dans une souche bactérienne donnée. Il consiste essentiellement à exposer les cellules bactériennes au peroxyde d'hydrogène, la présence de catalase se manifeste par la formation de bulles de gaz (dégagement d'oxygène).

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram positives. Il est mis en évidence par le contact directe de la culture avec une solution fraîche de H_2O_2 à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles.

c) Test de l'indole

La production de l'indole est mise en évidence sur une eau peptonée, après ensemencement et incubation à 37 °C pendant 18 à 24 h. Quelques gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées au milieu, après agitation, la présence d'indole se manifeste par apparition d'un anneau rouge en surface.

d) Test de mannitol-mobilité

Ce test permet à la fois l'étude de la dégradation du mannitol qui est un produit de l'hydrolyse du mannose et aussi de déterminer la mobilité. Les tubes sont ensemencés par piqûre centrale à l'aide d'un fil droit et incubés pendant 24 h

à la température adéquate. Un virage de la couleur rouge du milieu vers le jaune à orange se manifeste en cas de réaction positive et la lecture de la mobilité est comme suit:

- Envahissement du milieu : La bactérie est dite mobile;
- Croissance concentrée autour de la pique centrale : La bactérie est dite immobile.

e) Détermination du type respiratoire

La détermination du type respiratoire d'une bactérie nécessite un milieu de culture riche contenant un gradient de pression partielle en oxygène ; le principal milieu utilisé est la gélose Viande-Foie.

La gélose est régénérée par ébullition pendant 30 min puis coulée dans des tubes à essais. Les tubes sontensemencés à 45 °C par des pipettes Pasteur boutonnées en remontant du fond vers le haut du tube en spirales et incubés à 37 °C pendant 24 h.

Annexe 2 : Principe d'utilisation de l'ARN 16S.

En 1983, Kimura a émis le concept d'horloge "évolutionnaire" : la vitesse de l'évolution est constante, les mutations qui surviennent dans le génome n'ont pas nécessairement de conséquences phénotypiques, mais elles sont étroitement corrélées avec le temps. Dans ces conditions, il est possible de construire un arbre généalogique (phylogénique) en utilisant des méthodes mathématiques et en respectant quelques règles.

Le principe de base consiste à comparer des gènes homologues c'est à dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. Le choix des séquences à comparer a posé un problème car il était difficile de trouver une molécule qui soit présente et homologue chez tous les organismes et qui présente des niveaux successifs d'information. En effet, pour comparer des organismes très éloignés il faut utiliser des séquences qui restent sensiblement conservées durant des centaines de millions d'années, tandis que la comparaison d'organismes proches requiert l'étude de séquences où des mutations se seront accumulées en quelques millions d'années.

Le séquençage des ARN 16S peut-être automatisé et les données concernant ces molécules s'accroissent en permanence. L'utilité du séquençage des ARN 16S est reconnue par tous les taxonomistes mais, comme cette technique n'analyse qu'une faible partie du génome, elle ne permet pas de différencier les espèces proches les unes des autres. En revanche le séquençage des ARN 16S est très utile pour classer les bactéries dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce.

Lorsqu'il existe moins de 97% d'homologie entre les séquences des ARN 16S de deux souches, ces souches appartiennent à des espèces différentes. Par contre, si le pourcentage d'homologie est égal ou supérieur à 97%, le placement de deux souches dans une unique espèce ou dans deux espèces différentes doit reposer sur les résultats des hybridations ADN-ADN.

Annexe 3 : Courbe d'étalonnage de la tyrosine (dosage de protéases).

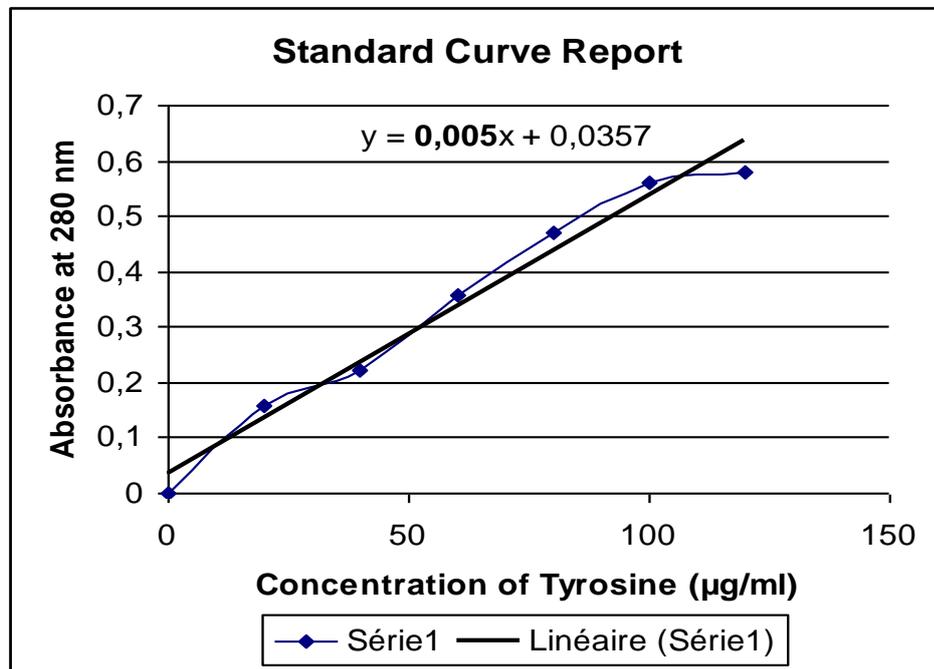
Une unité d'activité protéolytique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui libère 1 µg de tyrosine/ml/min dans les conditions expérimentales. Une courbe d'étalonnage (0-120 µg/ml) tyrosine est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1µg/ml de tyrosine correspond à une DO₂₈₀ de 0,0055.

$$Activité (UI) = \frac{DO * d * D}{T * 0.0055}$$

D : Dilution de l'enzyme ;

d : Dilution de l'enzyme dans le volume final du milieu réactionnel ;

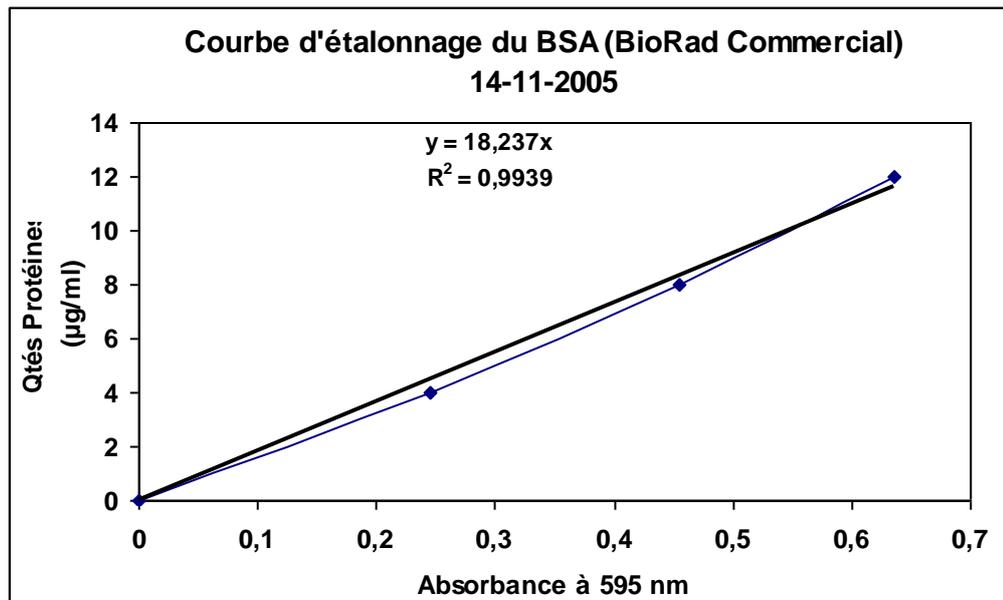
T : Temps de la réaction en min



Annexe 4 : Courbe d'étalonnage du BSA (quantité de protéines).

La quantité de protéine est définie à partir de la DO_{595} . Une courbe d'étalonnage (0-14 $\mu\text{g/ml}$) BSA est réalisée dans les mêmes conditions. Nous en avons déduit que : 1 $\mu\text{g/ml}$ de BSA correspond à une DO_{595} de 18,237.

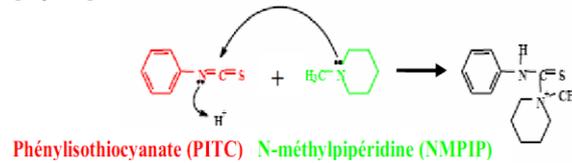
$$Qte (\mu\text{l/ml}) = \frac{DO_{595}}{\text{Prise d'essai}} * 18.237$$



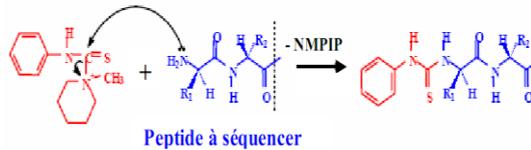
Annexe 5 : Détermination des extrémités NH2-terminales par la méthode d'Edman automatisée (dégradation d'Edman).

Les séquences N-terminales des différentes protéines purifiées : native (SAPDZ) et recombinante (rSAPDZ) sont déterminées par la méthode d'Edman automatisée sur microséquenceur de protéines [178, 179]. Cette méthode comporte les trois étapes classiques de séquençage, à savoir : le couplage, le clivage et la conversion.

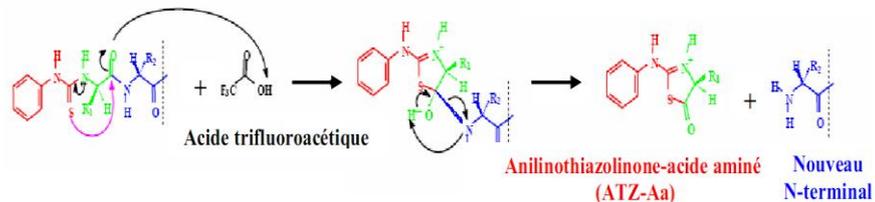
Etape 1 : Couplage du phénylthiocyanate (PITC) au N-méthylpiperidine (NMPIP : base)



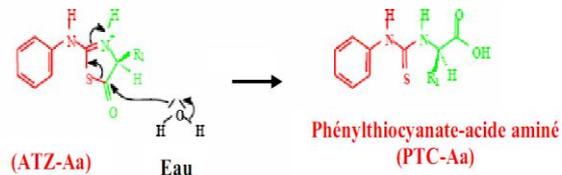
Etape 2 : Couplage du PITC-base au peptide



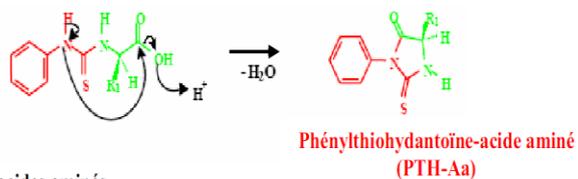
Etape 3 : Clivage de l'acide aminé N-terminal modifié par l'acide trifluoroacétique



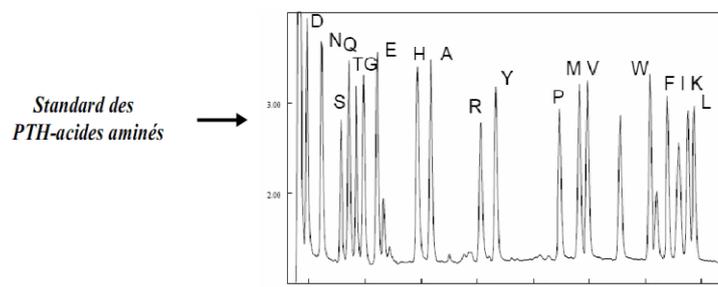
Etape 4 : Conversion de l'ATZ-acide aminé en PTC-acide aminé



Etape 5 : Conversion du PTC-acide aminé en PTH-acide aminé

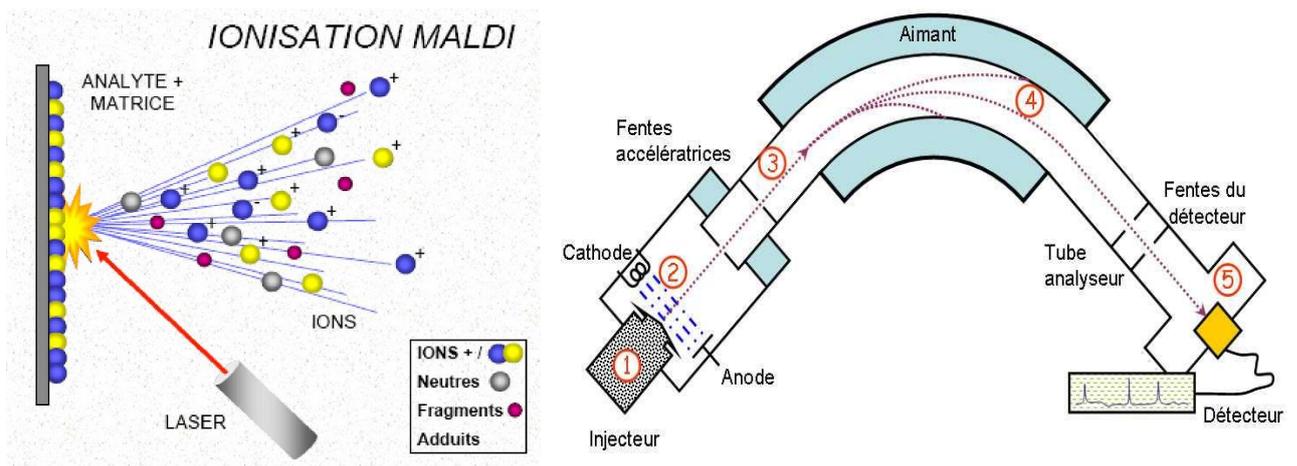


Etape 6 : Analyse des PTH-acides aminés



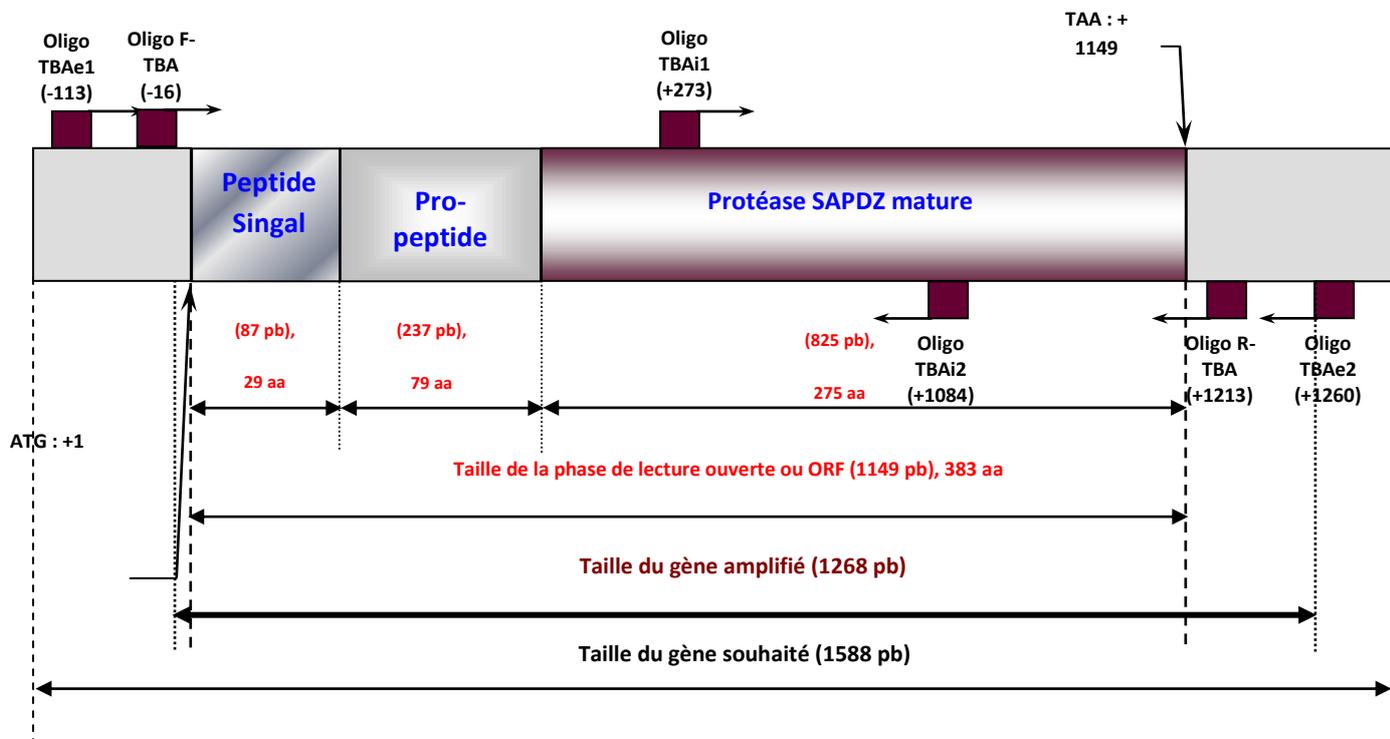
Annexe 6 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

Selon cette figure et sous l'impact du tir laser, l'échantillon (1) est introduit dans un faisceau d'électrons (2) est désorbé sous vide (environ 5.10^{-7} bar) et les molécules sont ionisées. Les ions obtenus (3) sont déviés par un aimant (4) et se séparent donc selon leur rapport masse/charge. A charge identique, les ions trop légers ou trop lourds sont déviés et ne seront pas détectés. Les ions de masse attendue sont comptés par un détecteur (5).



Annexe 7 : Localisation des amorces F-TBA, R-TBA, TBAe1, TBAe2, TBAi1 et TBAi2 dans le gène de la protéase alcaline (nommé sapDZ) de *Bacillus circulans* DZ100.

Ces amorces (F-TBA, R-TBA, TBAe1, TBAe2) ont été choisies grâce au logiciel DNACLUB en se basant sur la séquence du gène codant pour la protéase SAPB de *Bacillus pumilus* CBS [113] et de la protéase DHAP de *Bacillus pumilus* UN-31-C-42 [219]. Les amorces (TBAi1 et TBAi2) ont été choisies comme étant des amorces internes afin de séquencer la totalité de l'ORF du gène *sapDZ*. Elles ont été testées par le programme BLAST du site NCBI pour écarter tout risque d'hybridations non spécifiques. Les conditions de la réaction PCR sont celles décrites par Huang et al., (2003) [228]. Une optimisation des conditions expérimentales et des concentrations des différents réactifs s'est avérée indispensable pour obtenir une amplification spécifique.



Annexe 8: Catre de restriction du gène *sapDZ* par des enzymes coupant une seule fois (A), deux fois (B) et trois fois (C). Cette analyse est faite par le programme NEBcutter Version 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

A

Linear Sequence: sapDZ

GC=45%, AT=55%

Display: - NEB single cutter restriction enzymes
- Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

Minimum ORF length to display: 100 aa OK

Availability: All commercial

Display: 2 cutters

Zoom: Zoom in

List: 0 cutters

Help Comments

Cleavage code: blunt end cut, 5' extension, 3' extension, cuts 1 strand

Enzyme name code: Available from NEB, Has other supplier, Not commercially available, cleavage affected by GCG meth., cleavage affected by other meth., (enz.name): ambiguous site

B

Linear Sequence: sapDZ

GC=45%, AT=55%

Display: - NEB double cutter restriction enzymes
- Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

Minimum ORF length to display: 100 aa OK

Availability: All commercial

Display: 3 cutters

Zoom: Zoom in

List: 2 cutters

Help Comments

Cleavage code: blunt end cut, 5' extension, 3' extension, cuts 1 strand

Enzyme name code: Available from NEB, Has other supplier, Not commercially available, cleavage affected by GCG meth., cleavage affected by other meth., (enz.name): ambiguous site

C

Linear Sequence: sapDZ

GC=45%, AT=55%

Display: - NEB triple cutter restriction enzymes
- Main non-overlapping, min. 100 aa ORFs

Minimum ORF length to display: 100 aa OK

Availability: All commercial

Display: 3 cutters

Zoom: Zoom in

List: 3 cutters

Help Comments

Cleavage code: blunt end cut, 5' extension, 3' extension, cuts 1 strand

Enzyme name code: Available from NEB, Has other supplier, Not commercially available, cleavage affected by GCG meth., cleavage affected by other meth., (enz.name): ambiguous site

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications Internationales

- **Benkiar A.**, Zaraï Jaouadi N., Badis A., Rebzani F., Boulkour Touioui S., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi B. 2013. "Biochemical and molecular characterization of a thermo and detergent stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather biodegradation process", *International. Biodeterioration. Biodegradation*, **83**, pp. 129-138.
- Hatem Rekik, Nadia Zaraï Jaouadi, Wacim Bejar, Sidali Kourdali, Mouna Belhoul, Maher Hmidi, **Amina Benkiar**, Abdelmalek Badis, Naim Sallem, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. "Characterization of a purified decolorizing detergent-stable peroxidase from *Streptomyces griseosporus* SN9". *International Journal of Biological Macromolecules* 73 (2015) 253–263.
- Nadia Zaraï Jaouadi, Hatem Rekik, Abdelmalek Badis, Sahar Trabelsi, Mouna Belhoul, **Amina Benkiar**, Houda Ben Aicha, Abdessatar Toumi, Samir Bejar & Bassem Jaouadi. "Biochemical and molecular characterization of a serine keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with promising keratin-biodegradation and hide-dehairing activities". *PLoS One*, 8(10) (2013), e76722.

Communications Internationales

- **Benkiar A.**, Rebzani F., Zaraï Jaouadi N., Badis A., Boulkour Touioui S., Rekik H., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi B., "Isolement et criblage de souches bactériennes productrices de protéase alcaline en vue d'une application industrielle : épuration biologique des effluents industriels ». JIB2014-A.T.Biotech., 20-24 Décembre **2014** à Hammamet- TUNISIE.
- **Benkiar A.**, Zaraï Jaouadi N., Badis A., Rebzani F., Boulkour Touioui S., Rekik H., Naili B., Ferradji F.Z., Bejar S., Jaouadi B., "characterization of a typical keratinase SAPDZ from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather biodegradation bioprocess ». JIB2015-A.T.Biotech., 20-24 Décembre **2015** à Djerba- TUNISIE.