

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD Dahlab BLIDA -1

Faculté des Sciences
Département de Chimie
Filière : Chimie
Spécialité : Chimie des Produits Naturels



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité kératolytique chez les
actinobactéries d'origine marines**

Présenté par :

ELMOKREFI Abdelhamid et MAROUF Nour El Houda

Soutenu le 30 Septembre 2020

Devant le jury composé de :

Mr. A. BADIS	Professeur	Président
Mr. K. EDDOUAOUA	MCB	Examineur
Mme. F. FERRADJI	MCB	Promotrice

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

À « **Allah** », le tout puissant, qui nous a accordés le courage et la patience pour élaborer ce modeste travail.

Nous tenons tout particulièrement à remercier Mme FERRADJI Fatma Zohra pour nous avoir proposé ce thème et d'avoir accepté de le diriger avec beaucoup d'attention et de soin.

Nos sincères remerciements vont également à Mr BADIS Abdelmalek pour avoir accepté de présider ce jury. Nous lui sommes reconnaissantes pour ses enseignements, ses précieux conseils, ainsi que sa disponibilité à tout moment.

Nos plus vifs remerciements s'adressent à Mr EDDOUAOUA Kamel pour avoir accepté de juger ce travail.

En fin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes très chers parents mon père Mohammed et ma mère

Berkahoum

*Quoi que je fasse je ne pourrais pas leur rendre ce qu'ils ont fait
pour moi, si je suis arrivé là c'est bien grâce à eux.*

Que Dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.

*A ma grand-mère *Manny Khadidja**

A mes frères Zaki, Abderrahim et Abdelhadi

A ma sœur

A toute ma famille, spécialement la famille de SAADOU

A ma deuxième mère, ma maitresse Mme SI-CHAIEB

A la famille de SAKKAI

A tous ceux que j'aime.

ELMOKREFI Abdelhamid

Dédicaces

Je dédie ce projet

A mon cher père LYES. A ma chère mère NACERA RAHEM.

Pour tous leurs sacrifices, leurs amour, leur encouragement,

Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes frères ABD EL GHANI ET NASSIM.

Pour ses soutiens au long de mes études.

A toute ma famille, spécialement CHARIFI DJAMEL et Karima

Mon oncle FARID et sa femme HAYET

A tous mes cousins et mes cousines. Et tous ceux qui me sont

*chers. Je vous dis *merci*.*

MAROUF Nour El Houda

Résumé

La quantité croissante de déchets kératiniques récalcitrants générés par les industries de transformation de la volaille et les fermes avicoles constitue une menace sérieuse pour l'environnement. Des millions de tonnes de déchets de plumes sont produites chaque année en tant que sous-produit qui cause une grave pollution sur l'environnement. Leur dégradation est difficile en raison de la présence d'un polypeptide insoluble et très rigide.

La kératine est une protéine fibreuse récalcitrante, qui représente le principal constituant de divers déchets kératiniques, qui sont rejetés sous forme de plumes, de cheveux et de laines. Cette protéine résiste à la dégradation par les protéases et les catalyseurs chimiques courants en raison de sa stabilité mécanique élevée et des liaisons disulfure réticulées présentes dans leur structure.

Par conséquent, la kératinase a la capacité de dégrader les déchets kératiniques qui ne peuvent pas être dégradés en raison de leurs propriétés uniques par rapport à leurs homologues dans les catégories de protéases.

De nombreux microorganismes kératinolytiques tel que les actinobactéries d'origines marines ont été identifiés, ce qui a révélé la compétence d'hydrolyser les kératines en peptides et en acides aminés. Les kératinases actinobactériennes marines ont suscité beaucoup d'intérêt en tant qu'approche écologique pour convertir les déchets kératiniques en produits de valeur.

Mots clés : kératine, kératinase, actinobactéries marines, production, algues.

Abstract

The increasing amount of recalcitrant keratin waste generated by the poultry processing industries and poultry farms poses a serious threat to the environment. Millions of tons of waste feathers are produced each year as a by-product that causes severe environmental pollution. Their degradation is difficult due to the presence of an insoluble and very rigid polypeptide.

Keratin is a recalcitrant fibrous protein, which is the main constituent of various keratin waste, which is shed in the form of feathers, hair and wool. This protein is resistant to degradation by proteases and common chemical catalysts due to its high mechanical stability and the cross-linked disulfide bonds present in their structure.

Therefore, keratinase has the ability to degrade keratin waste, which cannot be degraded by conventional proteases due to their unique properties compared to their counterparts in the protease categories.

Numerous keratinolytic microorganisms such as actinobacteria of marine origin have been identified, which has revealed the ability to hydrolyze keratins into peptides and amino acids. Marine actinobacterial keratinase have generated much interest as an environmentally friendly approach to convert keratin waste into valuable products.

Key words: keratin, keratinase, marine actinobacteria, production, algae.

ملخص

يعتبر ريش الدواجن من النفايات المتزايدة والمزعجة وفي كثير من البلدان يتم التخلص منها كنفايات صلبة كرميها في الطبيعة أو حتى حرقها حيث يعد الريش بطيء التحلل ولا يستفاد منه في الغالب وذلك بسبب وجود الكيراتين الذي يصعب تحلله، فالكيراتين هي عائلة من البروتينات الليلية وهي صلبة وعديمة الذوبان موجودة لدى الطيور والثدييات وغيرها وتدخل بشكل أساسي في تكوين الشعر والمخالب والصوف، هذا البروتين مقاوم للتحلل بسبب صلابته العالية وروابط الكبريت الموجودة في هيكله. لكن من جهة أخرى نجد أن إنزيم الكيراتيناز لديه القدرة على تحطيم الروابط الكبريتية ونفايات الكيراتين بسبب خصائصه الفريدة. فمن بين العديد من الكائنات الحية الدقيقة المحللة للكيراتين نجد البكتيريا الشعاعية ذات الأصل البحري والتي كشفت عن القدرة على تحلل الكيراتين إلى ببتيدات وأحماض أمينية وكذلك بصفتها صديقة للبيئة.

الكلمات المفتاحية: الكيراتين، الكيراتيناز، البكتيريا الشعاعية البحرية، إنتاج، الطحالب.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Table des matières	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERALE	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 1 : ACTINOBACTERIES MARINES	3
1. Introduction	3
2. Actinobactéries	3
2.1. Historique	3
2.2. Définition	3
2.3. Critères taxonomiques des actinobactéries	6
2.3.1. Critères morphologiques	6
2.3.1.1. Critères macromorphologiques	6
2.3.1.2. Critères micromorphologiques	6
2.3.2. Critères chimiques	7
2.3.3. Critères physiologiques des actinobactéries	7
2.3.4. Critères moléculaires	8
2.4. Métabolites des actinobactéries	9
2.5. Importance des actinobactéries	12
3. Algues marines	13
3.1. Définition	13
3.2. Structure	13
3.3. Parties des algues	14
3.4. Classification	15
3.4.1. Algues rouges (Rhodophyta)	15
3.4.2. Algues brunes (Phaeophyceae)	16
3.4.3. Algues vertes (Chlorophyta)	16
3.5. Utilisations	17
4. Conclusion	17

CHAPITRE 2 : ACTIVITE KERATINOLYTIQUES	18
1. Introduction	18
2. Kératine	18
2.1. Historique	18
2.2. Définition	19
2.3. Structure	19
2.4. Classification des kératines	20
2.4.1. α -Kératine	20
2.4.2. β -kératine	20
2.5. Propriétés	21
2.6. Sources	21
3. Kératinase	23
3.1. Généralité sur les enzymes	23
3.2. Définition	24
3.3. Origine de kératinase	25
3.4. Mécanisme de biodégradation de la kératine	26
3.5. Applications des kératinases	28
3.6. Production de kératinases	29
3.7. Test de kératinase	29
3.8. Optimisation de la production de kératinase	30
4. Conclusion	30
MATERIELS ET METHODES	
CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE	31
1. Présentation de travail	31
2. Matériel	31
2.1. Matériel analytique	31
2.2. Matériel biologique	31
3. Méthodologie	31
3.1. Préparation de la farine de plumes	31
3.2. Repiquage des actinobactéries (<i>Streptomyces</i>)	34
DISCUSSION	36
CONCLUSION GENERALE	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	39

Liste des figures

Figure1.1	Schéma du cycle de vie des actinobactéries incluant un schéma d'une coupe transversale d'actinobactérie avec des hyphes vivants.	4
Figure1.2	(A) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre <i>Streptomyces</i> . (B) Aspect macroscopique d'une souche de <i>Streptomyces</i> .	5
Figure1.3	Applications biotechnologiques des actinobactéries.	12
Figure1.4	Morphologie comparée entre une algue et une plante.	15
Figure1.5	Une algue rouge * <i>Gelidium sesquipedal</i> *.	16
Figure1.6	Une algue brune * <i>Sargassum sp</i> *.	16
Figure1.7	Une algue verte * <i>Caulerpa prolifera</i> *.	17
Figure2.1	Représente la structure des kératines alpha et bêta.	20
Figure2.2	Schéma de la structure d'une plume.	22
Figure2.3	Structure 3D en rubon des kératinases complexes.	24
Figure2.4	Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.	25
Figure2.5	Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures.	26
Figure2.6	Représentation schématique de la dégradation des liaisons disulfure et peptide de kératine.	28
Figure3.1	Site de la ferme avicole.	32
Figure3.2	Schéma représentant les étapes de préparation de la farine de plumes.	33
Figure3.3	Représente les étapes de l'isolement et le repiquage.	35

Liste des tableaux

Tableau1.1	Habitats de certains actinomycètes.	5
Tableau1.2	Principaux caractères physiologiques des actinobactéries.	8
Tableau1.3	Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries.	11
Tableau2.1	Paramètres optimisés de quelques microorganismes.	30

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les kératinases sont une classe d'enzymes protéolytiques qui progressent par rapport aux protéases normales en termes de stabilité. Ils sont principalement actifs en présence de substrat kératinique, dans la structure de la kératine pour la convertir en formes simplifiées, tel que les kératinases dégradent la kératine [1].

Ce dernier est un matériau biologique résistant, chimiquement inerte, insoluble, formant des filaments, contenant du soufre (teneur élevée en cystéine). Celles-ci ont un faible taux de dégradation dans des conditions d'environnement naturel [2]. La protéine de kératine se trouve principalement dans l'épiderme des mammifères, des amphibiens, des reptiles et des oiseaux. Il forme le principal cadre structurel des cheveux, des ongles, des cornes, des becs, des plumes, des griffes, des poils et de la couche externe de la peau humaine qui sont considérés comme des tissus durs [3]. Le rôle principal de la kératine est de prévenir la perte de fluides corporels des humains et des animaux par la formation d'un revêtement extérieur de l'animal et des organes humains.

Mais le grand problème c'est la quantité énorme de déchets kératiniques sous forme de plumes, de poils et de laines, rejetés dans la nature sans traitement. Des millions de tonnes de plumes produites comme déchets de nombreuses exploitations avicoles, et abattoirs s'accumulent dans les environs, provoquant une pollution de l'environnement. L'élimination et la gestion inadéquates de ces déchets kératiniques de difficiles à dégrader sont l'un des problèmes majeurs auxquels sont confrontées ces industries [4]. De plus, l'élimination de ces déchets de plumes nécessite d'énormes quantités de terres qui présentent un risque pour le stockage, l'entretien, le contrôle des émissions, l'élimination des cendres et la contamination de l'air et des eaux souterraines. Les plumes jetées provoquent également différentes infirmités humaines, notamment le choléra des volailles, la mycoplasmosse et la chlorose.

De plus, la structure moléculaire de la kératine qui se compose de filaments intermédiaires rend une grande partie de la protéine inaccessible aux enzymes ainsi qu'aux produits chimiques pour leur digestion [5]. Cette propriété les rend insolubles dans l'eau, dans les solutions acides et alcalines faibles et dans les solvants organiques. Par conséquent, les kératines sont résistantes à la biodégradation par des enzymes protéolytiques courantes telles que la pepsine, la trypsine et la papaine [6].

Malheureusement, en raison d'une mauvaise gestion, ces déchets sont déversés en quantités énormes, ce qui représente une menace potentielle pour l'environnement. Les déchets de plumes étaient éliminés de manière indésirable en les brûlant dans des incinérateurs ou en les convertissant en aliments pour animaux de mauvaise qualité par un traitement à haute pression ou à haute température [7]. Cela entraîne deux inconvénients majeurs, d'une part, la perte d'acides aminés essentiels (tryptophane, méthionine et lysine) qui diminuent ainsi la quantité de protéines tout en affectant la digestibilité et la disponibilité des nutriments des aliments pour animaux produits et, d'autre part, l'exigence d'un apport énergétique élevé. En outre, ils libèrent des gaz à effet de serre nocifs, ce qui menace gravement la santé humaine et la nature [8].

Pour surmonter ces lacunes, il est urgent de disposer d'un roman et d'un biocatalyseur écologique pour dégrader les kératines. De façon imprévisible, les kératinases microbiennes, un biocatalyseur ingénieux exceptionnel, produit par différentes actinobactéries d'origines marines avec l'utilisation d'une variété de substrats agro-industriels (tels que les plumes de poulet, les laines, les poils et les ongles) provenant de nombreuses sources environnementales ont la capacité de dégrader les déchets de plumes contenant de la kératine en produits à valeur ajoutée tels que les acides aminés, les aliments pour animaux et les engrais [9].

Les kératinases actinobactériennes marines en raison de leur faible coût, de leur disponibilité facile et de leur nature sans contaminants ont été utilisées pour diverses applications industrielles [10]. Leur production est généralement réalisée sous fermentation immergée ou à l'état solide en utilisant des plumes de poulet comme une source de carbone et d'azote. Les kératinases en raison de leurs caractéristiques extraordinaires peuvent être utilisées pour diverses applications telles que dans l'industrie de transformation de la volaille et les produits pharmaceutiques la production de biocarburants, biorestauration, biofertilisants, en biomédical pour une meilleure délivrance de médicaments et une dégradation des prions et dans le traitement des eaux usées [11].

L'objectif principal de notre projet est basé sur la production de kératinase à partir des actinobactéries d'origines marines.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : ACTINOBACTERIES MARINES

1. Introduction

Les actinobactéries marines sont des composants actifs des communautés microbiennes marines et forment des populations stables et persistantes dans divers écosystèmes marins. La découverte de plusieurs nouveaux actinomycètes marins ayant une activité métabolique unique dans leur environnement naturel, et leur capacité à former des populations dans différents habitats et à produire de nouveaux composés avec diverses activités biologiques.

2. Actinobactéries

2.1. Historique

Les actinobactéries originaires il y a environ 270 millions d'années dans un environnement pauvre en oxygène étaient des anaérobies obligatoires, non filamenteuses et non sporulées avec des caractéristiques morphologiques simples [12].

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en 4 grandes périodes. La première période (1875-1900) a été nommée *période médicale*, dans cette période les actinobactéries ont été isolées par Julius Cohn. Cohn qui a été signalé pour la première fois les espèces actinobactériennes *Streptothrix foersteri*, qui présentent à la fois des caractéristiques bactériennes et fongiques dans leur morphologie [13]. La seconde période (1900-1919) c'est l'étude des actinomycètes du sol, et la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes. L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes, et le nom de Waksman est lié avec la découverte en 1944 par la production de la *streptomycine* qui est produite par *Streptomyces griseus* [14]. La dernière période (1940- 1970) peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes pour la production de métabolites secondaires et la biodégradation de composés organiques [15].

2.2. Définition

Étymologiquement le mot actinomycète est dérivé des mots grecs * Aktis-mykes* qui veut dire *champignons à rayons*. Les actinomycètes ont été considérées comme un

groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons. Les actinomycètes également connues sous le nom actinobactéries. Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif, dont le coefficient de Chargaff (C+G%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75%. Elles montrent la formation de spores et le mycélium comme des bactéries filamenteuses qui sont similaires aux membres des champignons, mais ils ont des différences puisque de nombreux genres d'actinomycètes ont été identifiés avec différentes techniques dans différents habitats tels que le sol, la mer... [16].

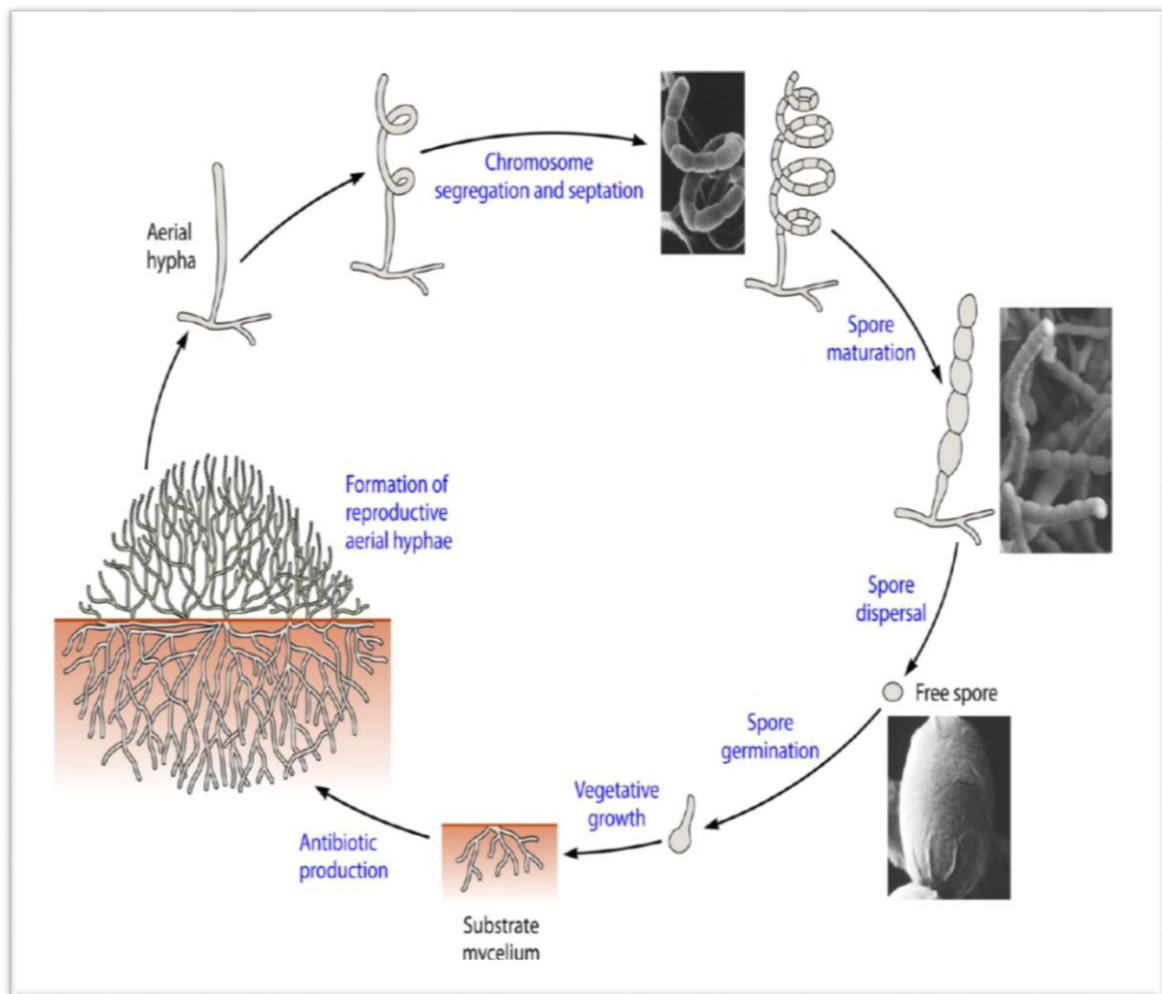


Figure 1.1 : Schéma du cycle de vie des actinobactéries incluant un schéma d'une coupe transversale d'actinobactérie avec des hyphes vivants [17].

En général, les actinobactéries sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimio-autotrophique et certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment

les substrats insolubles et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques et les résidus des plantes dans le sol et dans la mer.

Les actinobactéries se trouvent principalement dans trois genres, *Nocardia*, *Micromonospora* et *Streptomyces*. Le groupe des *Streptomyces* est dominant parmi les actinobactéries. Ils sont largement répandus dans la nature et résident principalement dans le sol et le milieu aquatique [18].

Tableau1.1 : Habitats de certains actinobactéries [19].

Actinomycètes	Habitats
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Le sol
<i>Frankia</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses
<i>Actinoplanes</i>	Le sol, l'eau douce
<i>Micromonospora</i>	Les sols humides
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées
<i>Streptomyces</i>	L'eau, la mer, le sol
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost
<i>Saccharopolyspora</i>	Moisi du foin

Les actinobactéries sont généralement aérobies, anaérobies facultatifs tels que *Oerskovia*, ou microaérophiles tels que *Actinomyces* et *Agromyces* ; mésophiles ou parfois thermophiles comme *Thermoactinomyces* et neutrophiles qui préfèrent un pH neutre ou peu alcalin [20]. Les actinobactéries sont généralement saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes tel que *Streptomyces scabies*, et autre sont pathogènes pour l'homme et pour les animaux comme *Actinomyces bovis* [21].

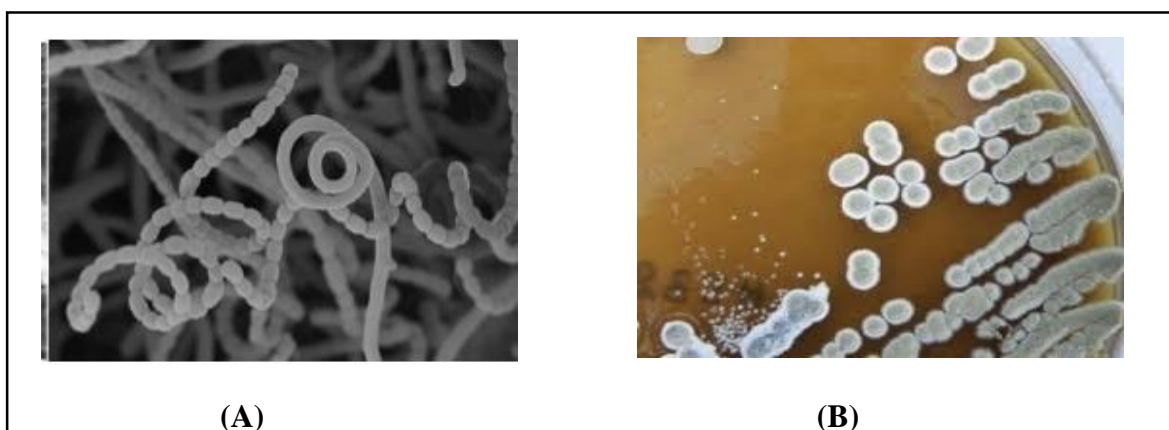


Figure1.2 : (A) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre *Streptomyces*. (B) Aspect macroscopique d'une souche de *Streptomyces* [22].

2.3. Critères taxonomiques des actinobactéries

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et fonctionnels, chimio-taxonomiques physiologiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédié aux actinobactéries. Un manuel complémentaire plus succinct fournit une aide à l'identification [23].

2.3.1. Critères morphologiques

Les critères morphologiques font appel aux caractéristiques culturels (critères macromorphologiques et aux critères micromorphologiques) [24].

2.3.1.1. Critères macromorphologiques

L'identification macromorphologique des actinobactéries est généralement basée sur la présence du mycélium du substrat (MS), et la production du mycélium aérien (ex : de nombreux *streptomyces*) ou non (ex : *Actinoplanes*, *Micromonospora*), ainsi que la couleur de ses derniers. La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

Il s'agit alors de noter les remarques suivantes :

- La présence ou l'absence de mycélium aérien ;
- La présence ou l'absence de mycélium du substrat ;
- La couleur du mycélium aérien et du mycélium du substrat ;
- La production et la couleur des pigments [24].

2.3.1.2. Critères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants sont :

- La fragmentation ou non du mycélium ;
- La formation de spores (leur formes, leur surface, leur mobilité....) ;
- La présence de sporanges sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ;
- La formation d'endospores ou la présence de structures particulières ;
- La présence de spores mobiles ou non mobiles [24].

2.3.2. Critères chimiques

Les critères morphologiques ne suffisent pas pour établir une détermination correcte des actinobactéries ce qui rend indispensable de considérer d'autres caractères comme l'étude de la composition chimique. La chimio-taxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes. Ces déterminations chimiques se montrent surtout efficaces pour délimiter des groupes et des genres.

L'étude de la composition des parois cellulaires permet la séparation des actinobactéries en différents groupes. Parmi ces compositions on trouve : les sucres et les acides aminés. Les sucres diagnostiqués sont principalement les couples (arabinose/galactose), (arabinose /xylose), (rhamnose/ galactose), ainsi que le madurose [25].

L'analyse des acides aminés qui la constituent est utilisée pour déterminer des chimiotypes. Deux acides aminés sont taxonomiquement très importants pour les actinobactéries, l'acide diaminopimélique (DAP) et la glycine. Cette dernière forme des liaisons ou des ponts entre les sous-unités peptidiques de la muréine [26].

Chez certains genres d'actinobactéries, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. Pour cette raison, il est indispensable d'utiliser d'autres critères chimiques essentiels pour la reconnaissance des genres, notamment la composition en lipides cellulaires. L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification microbienne. Les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis en trois groupes : les lipides contenant une partie polaire (phospholipides), les ménaquinones et les acides gras [27].

2.3.3. Critères physiologiques des actinobactéries

En plus des caractères morphologiques et chimiotaxonomiques, la détermination des espèces se base également sur les caractères physiologiques. La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques en particulier : l'oxygène, le pH, la température...etc [28].

- **Le pH**

Pour le pH, la plupart des actinobactéries se comportent comme des bactéries neutrophiles, et font une croissance optimale dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9.

- **La température**

La température optimale de croissance est entre 25 à 30°C, mais les espèces thermophiles peuvent croître à des températures entre 50 et 65°C.

- **L'oxygène**

On peut diviser les actinobactéries selon leurs types respiratoires en deux groupes :

- Les formes fermentatives anaérobies ;
- Les formes oxydatives aérobies.

Tableau1.2 : Principaux caractères physiologiques des actinobactéries [29].

Caractères physiologiques	Caractéristiques
Taux d'humidité	Faible à modérés
Température	Mésophile à thermophile 50 °C- 65 °C
pH	Neutrophile : 5 - 9
O ₂	fermentatives anaérobies oxydatives aérobies

2.3.4. Critères moléculaires

La biologie moléculaire s'est imposée comme un outil puissant en taxonomie. Actuellement, il n'est plus possible de proposer une nouvelle espèce sans effectuer des analyses génétiques. Ces analyses ont permis de regrouper ou de séparer ces espèces entre elles, et de proposer la création de nouvelles espèces [30].

Les principales analyses moléculaires utilisées pour la détermination des espèces sont :

- la détermination du pourcentage de guanine-cytosine (GC%) ;
- l'analyse des séquences des protéines ribosomiques l'hybridation ADN-ADN ;
- l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S [31].

2.4. Métabolites des actinobactéries

Les métabolites secondaires des actinobactéries sont connus pour diverses activités biologiques. Environ 23 000 antibiotiques ont été découverts à partir de différents microorganismes et plus de 10000 produits par des actinobactéries.

Les actinobactéries des algues marines sont des procaryotes d'une valeur économique et une bonne source de métabolites secondaires uniques pour la découverte de nouveaux antibiotiques. Les actinobactéries marines produisent des métabolites secondaires conservant un type varié d'activités biologiques. Les actinobactéries marines principalement le genre *Streptomyces*, ont la capacité de produire une gamme variée de métabolites secondaires sous forme de biomolécules qui comprennent des antibiotiques. Ce groupe a un vaste potentiel pharmacologique que les autres groupes microbiens. Les possibilités d'isoler une nouvelle souche de *Streptomyces* des habitats terrestres se sont réduites. Plus de 400 espèces de *Streptomyces* représentent 65 à 80% des métabolites secondaires associés. Ces métabolites sont connus pour leurs activités antimicrobiennes, antitumorales anti-inflammatoires et ont été examinés pour leurs diverses activités biologiques [32]. Bien que certains des autres genres comme *Saccharopolyspora*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora* et *Actinoplanes* montrent une petite partie de l'attention. Une cause impérative pour déterminer de nouveaux métabolites secondaires est de surmonter le problème des agents pathogènes résistants, qui sont plus sensibles aux médicaments actuellement utilisés [33].

La procédure de synthèse de nouveaux médicaments thérapeutiques consiste à obtenir des métabolites secondaires des actinobactéries marines, ce qui peut être efficace pour lutter contre une variété de microbes résistants [34]. La présence d'actinobactéries terrestres a été décrite dans l'écosystème marin relativement disponible. L'énorme diversité de cet habitat ainsi que sa manipulation sont la raison fondamentale pour laquelle les chercheurs fascinent pour découvrir de nouveaux producteurs de métabolites. La description

taxonomique des premières actinobactéries marines *Rhodococcus marinonascens* est une indication de l'occurrence de genres rares distincts dans l'écosystème marin. Les actinobactéries peuvent être isolées à partir de sédiments marins qui représentent environ 10% des bactéries colonisant les collections marines. Les chercheurs découvrent régulièrement de nouveaux genres provenant d'environnements marins et déterminent de nouveaux producteurs de métabolites jamais signalés auparavant. Malgré les améliorations apportées aux méthodes d'isolement d'actinobactéries marines rares, nombre de ces microorganismes persistent toujours incultes et doivent être identifiés à l'aide de techniques moléculaires [35].

Les actinobactéries regroupent 5 classes, 21 ordres, 49 familles, 222 genres et environ 3000 espèces. Les *Streptomycètes* représentent le plus grand genre appartenant à l'ordre des *Actinomycétales* qui renferment une diversité de morphotypes comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés [36].

Tableau1.3 : Classes, ordres et familles du phylum des actinobactéries [36].

Classes	Ordres	Familles
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
	<i>Actinopolysporales</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>
	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>
	<i>Catenulisporales</i>	<i>Catenulisporaceae, Actinospicaceae</i>
	<i>Corynebacteriales</i>	<i>Corynebacteriaceae, Dietziaceae, Mycobacteriaceae, Nocardiaceae, Segniliparaceae, Tsukamerullaceae</i>
	<i>Frankiales</i>	<i>Frankiaceae, Acidothermaceae, Cryptosporangiaceae, Geodermatophilaceae, Nokamurellaceae</i>
	<i>Glycomycetales</i>	<i>Glycomycetaceae</i>
	<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>
	<i>Kineosporales</i>	<i>Kineosporaceae</i>
	<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae, Beutenbergiaceae, Bogoriellaceae, Brevibacteriaceae, Cellulomonadaceae, Dermabacteriaceae, Dermacoccaceae, Dermatophilaceae, Intrasporangiaceae, Jonesiaceae, Micobacteriaceae, Promicomonosporaceae, Rarobacteriaceae, Ruaniaceae</i>
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>
	<i>Propionibacteriales</i>	<i>Propionibacteriaceae, Nocardioidaceae</i>
	<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>
	<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>
	<i>streptosporangiales</i>	<i>Streptosporangiaceae, Nocardiopticaceae, Thermomonosporaceae</i>
<i>nitriliruptoria</i>	<i>Nitriliruptorales</i>	<i>Nitriliruptoraceae</i>
	<i>Euzebyales</i>	<i>Euzebyaceae</i>
<i>Rubrobacteria</i>	<i>rubrobacterales</i>	<i>Rubrobacteraceae</i>
<i>Thermophilia</i>	<i>Thermophilales</i>	<i>Thermophilaceae</i>
	<i>solirubrobacterales</i>	<i>Solirubrobacteraceae, Conexibacteraceae, Patulibacteraceae</i>
<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Acidimicrobiales</i>	<i>Actinomicrobiaceae</i>

2.5. Importance des actinobactéries marines

Les actinobactéries marines ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactifs comme les antibiotiques [37].

Les actinobactéries jouent un rôle primordial dans les domaines suivant :

- Agronomique ;
- Alimentaire ;
- Domaine environnemental ;
- Ainsi que le domaine pharmacologique ;
- Biologie ;
- Médecine.

La recherche de nouvelles molécules actives contre le sida, la maladie d'Alzheimer, le processus de vieillissement et certaines maladies vise à la découverte de nouveaux médicaments à base des actinobactéries d'origines marines [38].

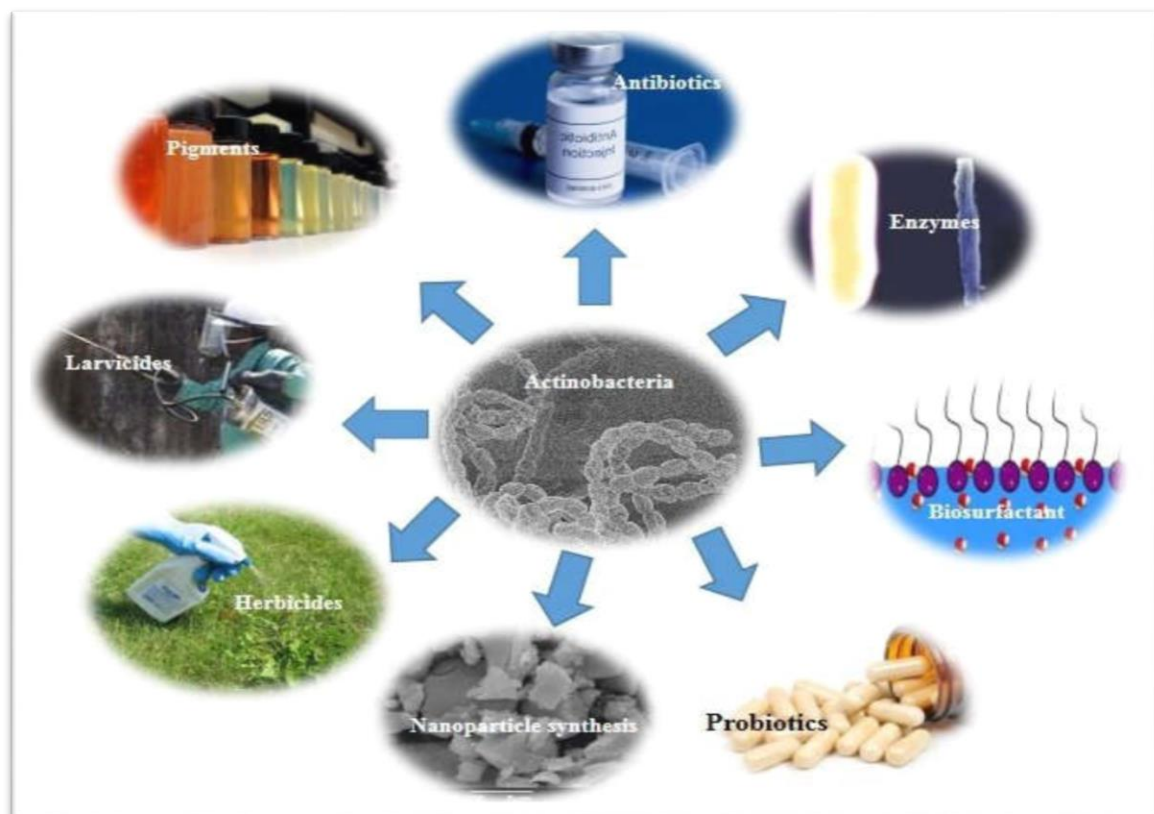


Figure1.3 : Applications biotechnologiques des actinobactéries marine [39].

3. Actinobactéries associés aux algues marines

3.1. Définition

Les microorganismes d'origine marine ont été reconnus comme un grand réservoir biologique actif comme métabolites secondaires qui ont un impact considérable sur la vie humaine. Plus de 91% des produits naturels marins ont été caractérisés à partir des actinobactéries marines. Les actinobactéries marines sont des sources pratiquement illimitées de nouveaux composés avec de nombreuses applications thérapeutiques. Pour l'isolement des actinomycètes marins ; des sédiments marins, échantillons de sol marin, eau de mer, poudre de roche marine et des plantes marines ont été collectés dans différentes localisations marines [40].

Parmi les organismes marins, les algues marines représentent un grand groupe d'organismes. Selon une étude récente, une estimation de 72 500 espèces d'algues a été décrite dans le monde, alors que la plupart d'entre elles sont marines. La tendance accrue à explorer les métabolites secondaires bioactifs des algues marines a permis de découvrir de nouveaux composés susceptibles d'être utilisés dans la médecine future [41].

Les algues marines produisent des métabolites secondaires bioactifs qui comprennent des composés polyphénoliques, des polysaccharides, des peptides et leurs dérivés. Ces métabolites indiquent une diversité structurelle et fonctionnelle par rapport à leur homologue terrestre en raison des différences dans leurs voies métaboliques. Parmi le grand nombre de fonctionnalités biologiques des produits naturels d'algues marines, des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anticancéreux et antimicrobiens ont pu être mis en évidence sur la base d'un grand nombre d'études approfondies. En plus des métabolites secondaires bioactifs susmentionnés, les algues contiennent une grande variété de produits naturels avec une grande diversité structurelle en raison d'une gamme de bioactivités différentes[42].

3.2. Structure

Les algues ressemblent à des plantes. Elles ont des structures reproductrices simples et n'ont pas de structures avancées comme les racines, les tiges, les feuilles, les tissus vasculaires. Leur efficacité photosynthétique est plus élevée que les plantes terrestres, car

l'eau de mer dissout environ 60 fois plus de CO₂ que l'atmosphère et trois mille fois plus que les roches sédimentaires. Leurs rendements de production de la biomasse des macroalgues sont 15 à 20 fois supérieurs à ceux de la biomasse terrestre. Les algues regroupent un ensemble de végétaux photosynthétiques très divers et dont l'appareil végétatif relativement simple est appelé *thalle*. Le thalle présente une grande diversité de formes allant de lames simples à des structures plus complexes. Les cellules des algues possèdent les mêmes éléments de structure que celles des plantes supérieures. Elles ont une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des plastes pigmentés ou chromatophores (comportant de la chlorophylle souvent masquée par des pigments surnuméraires qui donnent aux thalles des couleurs) [43].

Elles ont des formes et des dimensions très variables macroscopiques. Elles sont essentiellement aquatiques vivant dans les eaux douces ou marines, et certaines vivent sur la neige ou la glace des régions polaires et des hautes montagnes. D'autres, au contraire, supportent dans les eaux des sources thermales des températures élevées (algues thermophiles). Elles comprennent un effectif de 20 000 à 30 000 espèces dans le monde, soit 18% du règne végétal [44].

3.3. Parties des algues

Les parties des algues sont :

Thalle : le corps simple ou plus avancé comme la structure est connue comme un thalle.

Lamina ou lames : les principales parties aplaties en forme de feuille photosynthétiques.

Flotteurs : les flotteurs remplis de gaz sont un organe entre la lame et stipe.

Stipe : est une structure en forme de tige, peut être long et difficile à soutenir.

Crampon : une structure spécialisée en forme de racine

Fronde : désigné comme partie combinée de la lame et du stipe [45].

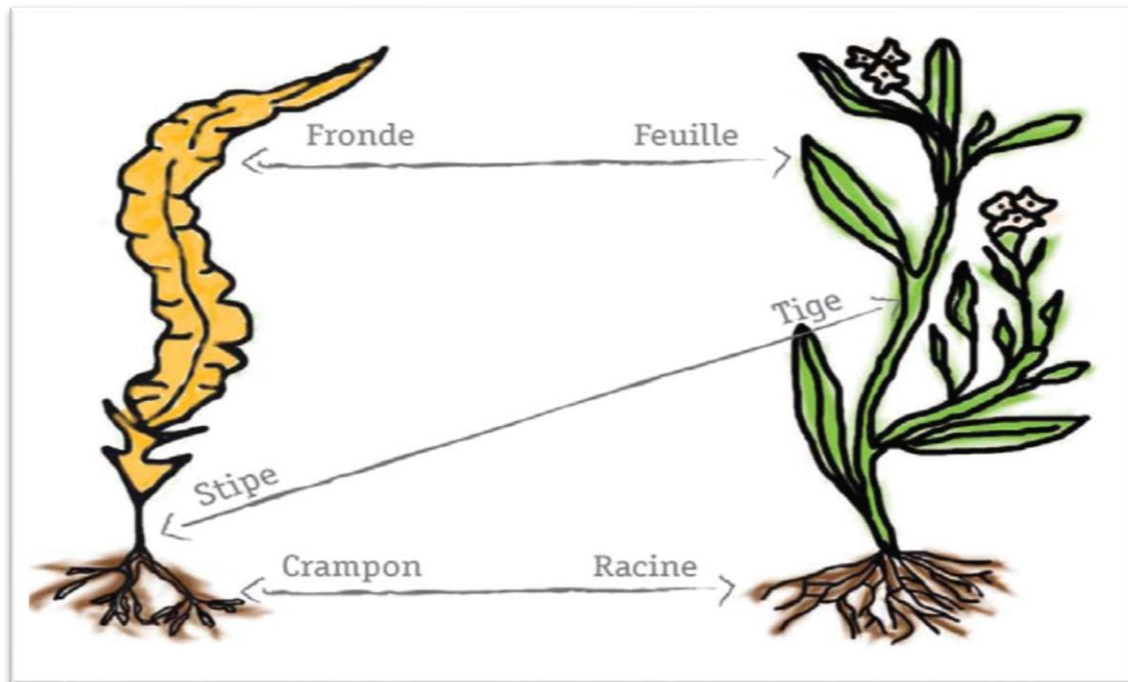


Figure1.4 : Morphologie comparée entre une algue et une plante [46].

3.4. Classification

De nombreux critères écologiques, physiologiques ou biochimiques interviennent dans la phylogénie des algues comme les structures cellulaires. Les algues marines sont des organismes morphologiquement et fonctionnellement diversifiés communément divisés selon leurs pigmentations en trois groupes : algues rouges (Rhodophyta), algues brunes (Phaeophyceae) et algues vertes (Chlorophyta) [47].

3.4.1. Algues rouges (Rhodophyta)

Plus de 7100 espèces d'algues rouges sont actuellement signalées. Elles sont diversifiées selon leurs formes varie d'unicellulaire, filamenteux, ramifié .La couleur rouge de ces algues due à la présence d'un pigment rouge, la phycoérythrine. L'analyse chimique des matériaux d'algues rouges a révélé la présence des terpénoïdes : sesquiterpènes, stérols, caroténoïdes et chlorophylles [48].

Les algues rouges sont majoritairement constituées de polysaccharides, de petites quantités de protéines, de traces des lipides et les matières inorganiques. Le corps des algues rouges contient de grandes quantités de matières mucilagineuses telles que l'agar ou la carraghénane [49].



Figure1.5 : Une algue rouge **Gelidium sesquipedal** [50].

3.4.2. Algues brunes (Phaeophyceae)

La couleur brune de ces algues résulte de la dominance des pigments xanthophylle et la fucoxanthine qui masque les autre pigments (chlorophylle a et b, et la beta carotène). Les algues brunes sont principalement diversifiées dans les mers froides et tempérées où elles forment les grandes forêts sous-marines et dans les eaux tropicales [51].



Figure1.6 : Une algue brune **Sargassum sp** [52].

3.4.3. Algues vertes (Chlorophyta)

La couleur vertes de ces algues due à la coloration de leurs plastes par les chlorophylles a et b auxquelles sont associés des carotènes et des xanthophylles. Les algues

vertes contiennent des polysaccharides tels que : cellulose, mannane, rhamnane sulfaté, et les types ulvans et les Sous-unités monosaccharidique comme : le glucose, le mannose, le rhamnose, le xylose, l'acide iduronique et l'acide glucuronique [53].

Elles se produisent dans le monde entier, généralement dans les eaux tropicales peu profondes et habitats marins subtropicaux. Par exemple : la famille des *Caulerpaceae* du genre *Caulerpa*, *Caulerpa prolifera* [54].



Figure1.7 : Une algue verte **Caulerpa prolifera** [55]

3.5. Utilisations

Les algues marines sont couramment utilisées aujourd'hui en :

- Industrie ;
- Alimentation humaine et animale ;
- Production de biocarburants ;
- Domaine biologique ;
- Domaine pharmaceutique ;
- Et autre domaine [56], [57].

4. Conclusion

Les microorganismes marins en particulier les actinobactéries, ont été évolué avec la plus grande diversité génomique et métabolique, les efforts devraient être orientés vers l'exploration des actinobactéries marins comme source de nouveaux métabolites secondaires. L'exploitation des actinobactéries marins comme source de nouveaux métabolites secondaires n'en est qu'à ses débuts. Même avec les efforts de dépistage limités qui ont été consacrés à ce jour aux actinobactéries marins.

CHAPITRE 2 : ACTIVITE KERATINOLYTIQUE

1. Introduction

Avec l'avènement de l'ère industrielle moderne, où l'humanité a révolutionné technologiquement, de nombreux problèmes environnementaux et sanitaires sont également apparus en raison de divers produits chimiques utilisés pour la réalisation de divers processus industriels, et ce préjudice a appelé à des alternatives. Le remplacement de la catalyse chimique par la bio-catalyse est l'une des solutions efficaces pour faire face à ce problème. Plusieurs biocatalyseurs microbiens peuvent être utilisés efficacement dans divers procédés biotechnologiques et industriels. La kératinase est l'un des biocatalyseurs impératifs, qui a une capacité unique à dégrader des protéines hautement récalcitrantes, résistantes et abondantes appelées kératines, qui constituent diverses structures épidermiques de vertébrés comme les plumes, les cheveux, les ongles et autre. Chaque année, des millions de tonnes de déchets kératiniques sont générés par la volaille, l'élevage et les industries de transformation, ce qui met en évidence une utilisation potentielle des enzymes kératinolytiques pour la gestion des déchets solides.

2. Kératine

2.1. Historique

Selon la littérature, la première utilisation de la kératine a été rapportée le 16^{ème} siècle pour les applications médicinales par un herboriste chinois Li Shi Zhen. Il a suggéré une substance appelée Xue Yu Tan qui a été principalement dérivée à partir de cheveux humains pyrolysés. En 1850, la recherche était basée sur les méthodes d'extraction de la kératine de différentes sources et pour la dissoudre comme les autres protéines. En 1940, la recherche scientifique était pour le but de mieux comprendre les propriétés de la fibre kératinique par l'utilisation du microscope électronique, la diffraction des rayons X et d'autres méthodes. Depuis les années 1970, il y a eu des progrès exponentiels dans les techniques utilisées pour extraire et caractériser les kératines et leurs dérivés. Ainsi, toutes ces recherches ont jeté une base solide pour de nouvelles recherches dans le domaine des biomatériaux à base de kératine pour diverses applications [58].

2.2. Définition

Le terme «kératine» comprend un mélange complexe de protéines, telles que les kératines et les protéines associées à la kératine. La kératine est une protéine du cytosquelette intracellulaire riche en cystéine qui se trouve dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes différenciées. Les kératines appartiennent à la famille des protéines fibreuses qui devraient posséder de vastes applications biomédicales en raison de leur abondance, propriétés physico-chimiques et les activités biologiques intrinsèques [59]. La kératine est un matériau biologique, chimiquement inerte et un biopolymère naturel qui a une structure mécanique solide en raison du niveau abondant de réticulations disulfures, des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Par rapport à d'autres protéines connues, la kératine présente une stabilité plus élevée et une solubilité inférieure pour la réticulation des liaisons disulfure de cystéine. En outre, la liaison hydrogène, les liaisons hydrophobes et ioniques sont essentielles à la stabilité de la kératine. Les kératines sont insolubles dans l'eau, dans les acides faibles, les solutions alcalines, et dans les solvants organiques car la structure des kératines contient : liaison hydrogène, interactions hydrophobes et ponts disulfure entre les molécules individuelles vis à vis présence d'un pourcentage élevé de soufre contenant principalement la cystéine.

Les protéines de kératine ne sont solubles que dans les solutions contenant des agents dénaturants comme l'urée et des agents réducteurs tels que mercaptoéthanol, qui sont capables de cliver le disulfure de kératine [60].

2.3. Structure

La kératine résulte de la condensation de 18 acides aminés différents, ces derniers ont été identifiés et dosés, les résultats montrent que cette protéine contient la cystine (entre 14 et 16,8%) en grande proportion et (entre 14,3 et 15,5%) de l'acide glutamique.

Au niveau moléculaire, la caractéristique la plus distinctive des kératines est la forte concentration de résidus de cystéine (7 à 20% du total des résidus d'acides aminés) [61].

Avec la cystéine est un acide aminé non polaire qui contient des groupes soufre qui peuvent former des liaisons soufre - soufre (S \ S) cystine avec d'autres molécules Cys intra ou intermoléculaires. Les liens croisés entre la cystine intermoléculaire se lie avec d'autres

caractéristiques structurales des protéines, comme la cristallinité et la liaison hydrogène, donne à la kératine sa haute résistance et sa rigidité.

2.4. Classification des kératines

Les kératines sont des protéines dont les chaînes se présentent en hélice (α -kératine) ou en feuillet (β -kératine), qui se replient en forme tridimensionnelle [62].

2.4.1. α -Kératine

L' α -kératine est principalement présente dans les matières épidermiques dites de mammifères, telles que les cheveux, la laine et la corne. Pour les α -kératines, désigne le *filament intermédiaire* qui représente le caractère vue par microscopie électronique à transmission et montre une taille intermédiaire (7–10 nm de diamètre) [63].

2.4.2. β -kératine

Pour les β -kératines, le «filament» est appelé «filament bêta-kératine» et a un diamètre de 3 à 4 nm. La β -kératine a une teneur en glycine plus élevée et donc plus d'acides aminés non polaires que l' α -kératine. La structure de β -kératine est une feuille plissée, elle est stabilisée par deux facteurs :

- Les liaisons hydrogène entre les brins bêta contribuent à la formation d'une feuille
- La planarité de la liaison peptidique [64].

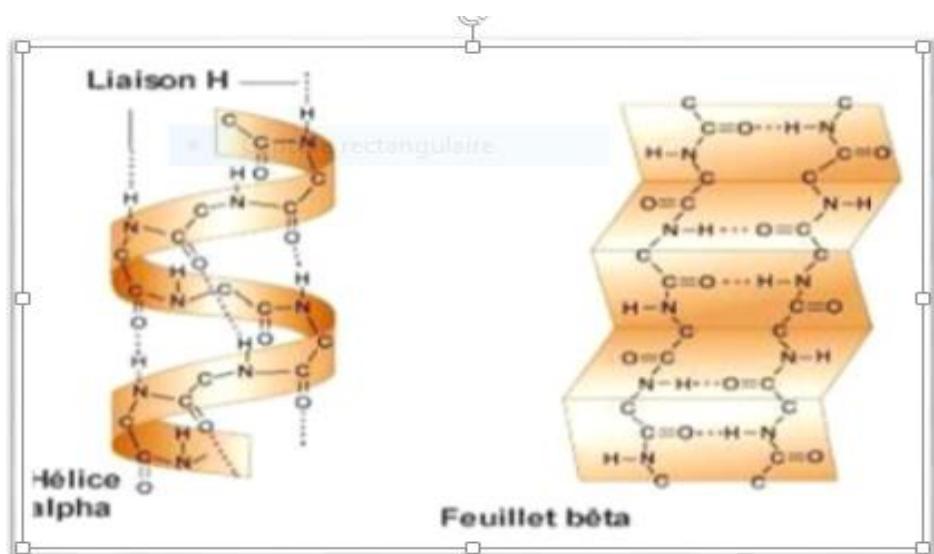


Figure 2.1 : Représente la structure des kératines alpha et bêta [65].

2.5. Propriétés

La kératine a les propriétés de biocompatibilité, de biodégradabilité et elle possède une surface hydrophile. la kératine peut promouvoir son utilisation comme l'un des matériaux pour des applications biomédicales, y compris la cicatrisation des plaies, les tissus dispositifs d'ingénierie et d'administration de médicaments.

➤ **La biocompatibilité :**

La biocompatibilité fait référence à la capacité des matériaux à interagir avec cellules hôtes sans produire de cytotoxicité systématique et locale, mutagenèse, carcinogenèse, réponses allergiques, irritation et inflammation.

➤ **La biodégradation :**

La biodégradation est définie comme le processus chimique par lequel les biomatériaux implantés se décomposent par hydrolyse à partir des microorganismes [66].

2.6. Sources

Les kératines sont divisées en deux catégories de kératines épithéliales (molles) et les kératines trichocytaires (dures).

Les kératines molles contiennent 1% de teneur en soufre (cystéine (<3%)), elles stabilisent les cellules dans les épithéliums. Elles se trouvent dans la couche cornée de la peau.

Les kératines dures contiennent 5% de teneur en soufre (cystéine (4–17%)), elles agissent comme échafaudage structurel. Elles se trouvent dans les structures liées à l'épiderme, comme la laine, les poils, les plumes, les ongles et les cornes et les sabots des mammifères, les reptiles et les oiseaux [67].

Parmi les sources kératiniques on a :

Kératine des cheveux humains

Les cheveux humains en fonction de leur teneur en humidité sont constitués de 65 à 96% protéines, 1–9% de lipides, 3% de mélanine et autres composés mineurs. Les cheveux humains contiennent principalement 5 à 12 couches de bêta-kératines responsables de protection des couches internes contre les dommages physiques et chimiques et retenir l'humidité [67].

Kératine de laine

La structure de la fibre de laine est extrêmement complexe et contient environ 82% protéines kératiniques riches en cystéine, environ 17% de protéines non kératiniques faible en cystéine située dans la membrane cellulaire et environ 1% de matière non protéique constituée de lipides cireux et d'une petite quantité de polysaccharide [68].

Kératine en plumes

La kératine des plumes de poulet contient plus de certains acides aminés tels que l'alanine, la glycine, la sérine, la valine et la cystéine, mais un pourcentage inférieur de lysine, de tryptophane et de méthionine [69].

Les plumes contiennent plus de 90% de protéines kératiniques et sont probablement les plus protéines abondantes et les moins chères disponibles. Les plumes sont considérées comme des sous-produits animaux. La plume de volaille constitue jusqu'à 10% du poids corporel total du poulet et produit d'énormes quantités dans les abattoirs de volaille ainsi que dans le ménage pendant la transformation de la volaille. Annuellement, plus de 5 million de tonnes de plumes sont produits chaque année par l'industrie de la volaille (un poulet vivant de 2 kg produit 180g de plumes). Ces milliards de kilogrammes de plumes ont créé un grave problème de déchets solides partout dans le monde [70]. Les plumes sont composées de trois parties : l'axe central (rachis), calamus et barbes ou barbules, qui contiennent principalement de la bêta-kératine.



Figure2.2 : Schéma de la structure d'une plume [71].

3. Kératinase

3.1. Généralité sur les enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique fabriquées par l'organisme. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés avec des chaînes linéaires. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens peptidiques [72]. Les enzymes sont essentielles à presque tous les processus de la vie et vitales pour la biotechnologie industrielle ou le diagnostic médical. De 30 à 40% de tous les gènes codent pour des enzymes. Ils permettent l'activation ou l'accélération des réactions chimiques par des voies métaboliques précisément coordonnées à l'intérieur des cellules et sont indispensables pour se défendre contre les agents pathogènes et d'autres processus. Ces enzymes jouent un rôle dans toutes les fonctions. Les fonctions des enzymes dépendent de nombreuses caractéristiques, telles que leur séquence, leur structure tridimensionnelle, leur stabilité et leurs interactions avec d'autres molécules [73].

Il existe plusieurs types des enzymes tel que ; lipase, protéase... etc.

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases. En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites extracellulairement ou intracellulairement. Ces enzymes sont généralement synthétisées sous forme de zymogènes inactifs, ce qui permet de protéger la cellule contre tout effet désastreux. Elles ont beaucoup de fonctions physiologiques, variant de la digestion générale des protéines à des processus régulatoires plus spécifiques. Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielle, biotechnologique, médicale et dans d'autres domaines. Les protéases microbiennes représentent approximativement 60 % du marché mondial des enzymes. La plupart des protéases commercialisées, essentiellement sont produites par des souches d'actinobactéries du genre *Streptomyces* [74].

Parmi ces enzymes protéolytiques on trouve **les kératinases**.

3.2. Définition

Les kératinases ou enzymes kératinolytiques sont généralement des protéases à sérines ou des métalloprotéases. Ils représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et de larges applications dans différents secteurs. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines plus efficacement que d'autres protéases. Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux et d'autres substrats kératiniques [75]. Elles ont été classées comme des protéinases de mécanisme inconnu tel que recommandé par l'IUBMB (Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire) avec le numéro [EC 3.4.21/24/99.11]. Des recherches récentes ont indiqué que les kératinases sont comme les protéases à sérine en raison de leur homologie élevée (97%) avec les protéases alcalines et leur inhibition par les mêmes inhibiteurs que les protéases à sérine [76].



Figure2.3 : Structure 3D en rubon des kératinases complexes [77].

Ces enzymes kératinolytique attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel [78]. Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont

tendance à hydrolyser les liaisons peptidique au niveau de lamine des acides aminés aromatiques et hydrophobes.

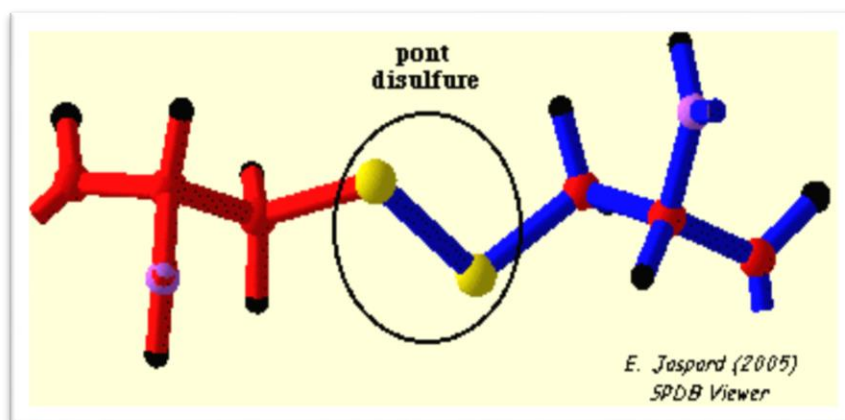


Figure2.4 : Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines [79].

3.3. Origine de kératinases

Les kératinases sont produites par une grande variété de bactéries, champignons et d'actinomycètes qui sont de nature omniprésente, en particulier dans les sites de déchets kératiniques tels que les décharges de plumes et les déchets des abattoirs [80]. Les actinomycètes kératinolytiques marines ont été isolés à partir de divers sites et ont montré la capacité d'hydrolyser divers substrats kératiniques avec des structures différentes. Parmi les souches d'actinomycètes d'origine marines, le genre *Streptomyces* était principalement utilisé pour la biodégradation de la kératine.

Certains *Streptomyces* mésophiles tels que *Streptomyces lbidoflavus* [81], *Streptomyces graminofaciens*, et *Streptomyces flavis* 2BG ont été identifiés comme des souches kératinolytiques. Les principales souches thermophiles des espèces d'actinomycètes kératinolytiques impliquent *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces fradiae*, *Streptomyces graminofaciens*, *Streptomyces pactum*. De plus, *Streptomyces hermonitrificans* et *Streptomyces gulbarguensis* ont été détectés dans les eaux comme divers actinomycètes kératinolytiques ont été identifiés montrant leur capacité à générer différents types de kératinases [82].

3.4. Mécanisme de biodégradation de la kératine

La biodégradation de la kératine par l'action des kératinases microbiennes est très compliquée ; cependant, c'est une approche peu coûteuse pour éviter la consommation d'énergie et le manque d'acides aminés significatifs. Les mécanismes de dégradation de la kératine varient en fonction du type d'organisme (les bactéries, les champignons et les actinobactéries). La réticulation des kératines par de forts ponts disulfures empêche leur décomposition par des protéases communes. Donc l'hydrolyse de la kératine nécessite une nouvelle génération de protéase, représentée sous forme de kératinases [83].

Au début, des études antérieures ont élucidé le processus de biodégradation de la kératine se limitant aux enzymes protéolytiques. Par la suite, la structure de la kératine a été tout à fait reconnue, et le mécanisme d'hydrolyse de la kératine pourrait ainsi être réalisé par la séparation des liaisons disulfure fortes dans les chaînes polypeptidiques de la kératine.

Une hypothèse a été proposée sur la base d'un autre processus connu sous le nom de sulfitolyse qui pourrait être synergiquement contribué avec l'enzyme protéase pendant le processus de kératinolyse. La sulfitolyse a été rapportée par Kunert [84] selon des études sur la dégradation de la laine native. Au cours de la sulfitolyse, la division des liaisons disulfure entre les chaînes polypeptidiques de la kératine en utilisant le sulfite inorganique pourrait survenir et des groupes thiol ont été libérés. De plus, les liaisons disulfures de la laine de kératine ont été clivées en cystéine et en sulfo-cystéine, ce qui a entraîné une dénaturation des protéines. La sulfitolyse provoque la dénaturation de la structure de la kératine et génère des sites actifs plus spécifiques pour les protéases, qui facilitent l'action ultérieure de la protéase.

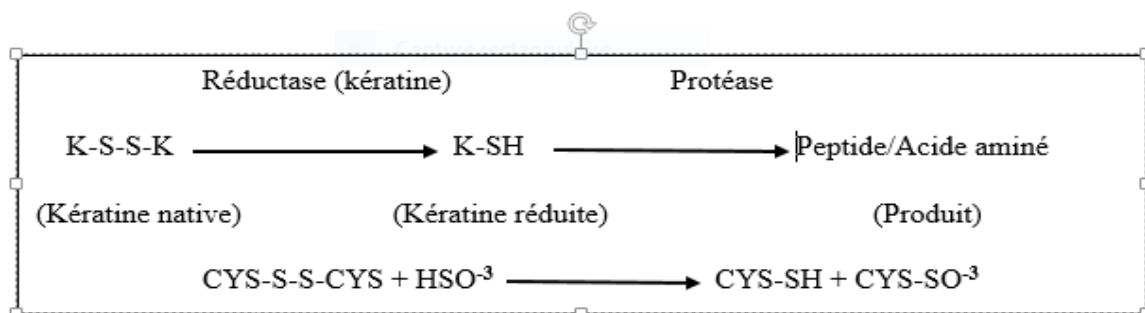


Figure2.5 : Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures [79].

Concernant les actinobactéries, la décomposition de la kératine commence par une croissance mycélienne sur la surface de la kératine suivie d'une sulfitoxydation et d'une protéolyse. Sangali et Brandelli [85] ont proposé un mécanisme reposant sur l'action de l'enzyme disulfure réductase, qui pourrait facilement réduire les liaisons disulfure des plumes par l'action de la souche *Vibrio* Kr2. En outre, Yamamura [86] a avancé un autre mécanisme de dégradation de la kératine par les kératinases d'actinobactéries. Ce mécanisme a élucidé l'hydrolyse de la kératine via l'activité à la fois de la protéine de type disulfure réductase et de la protéase qui ont été détectées dans la culture de *Stenotrophomonas* sp. D-1 pendant la décomposition de la kératine. Par ce processus, les liaisons disulfures sont réduites par la disulfure réductase générant une protéine partiellement dénaturée par conséquent, la protéase à l'accessibilité d'hydrolyser la kératine en tant que substrat et des produits solubles impliquant des peptides et des acides aminés seraient libérés. D'autre part, Qu et al [87] ont postulé une nouvelle proposition concernant le mécanisme de dégradation des plumes. Remarquablement, trois enzymes ont été identifiées à partir du surnageant de culture comme une sérine protéase. Par conséquent, les influences synergiques des trois enzymes sur le processus de dégradation ont été étudiées, ce qui révèle un nouveau mécanisme de dégradation des plumes ; Cependant, d'autres investigations minutieuses doivent être menées pour déterminer le site de liaison de chaque enzyme à l'intérieur de la kératine.

L'élucidation du mécanisme de dégradation de la kératine nécessitait une souche kératinolytique idéale qui pourrait coloniser exclusivement des substrats kératiniques avec une forte affinité pour se dégrader. Les enzymes impliquées dans la culture ont été discernées en utilisant des approches génomiques et protéomiques, illustrant la présence de trois protéases représentant respectivement une exoprotéase, une endoprotéase et une oligopeptidase. De plus, la disulfure réductase et le sulfite pourraient accélérer la vitesse de dégradation de la kératine, lors de l'ajout aux trois enzymes précédentes [88].

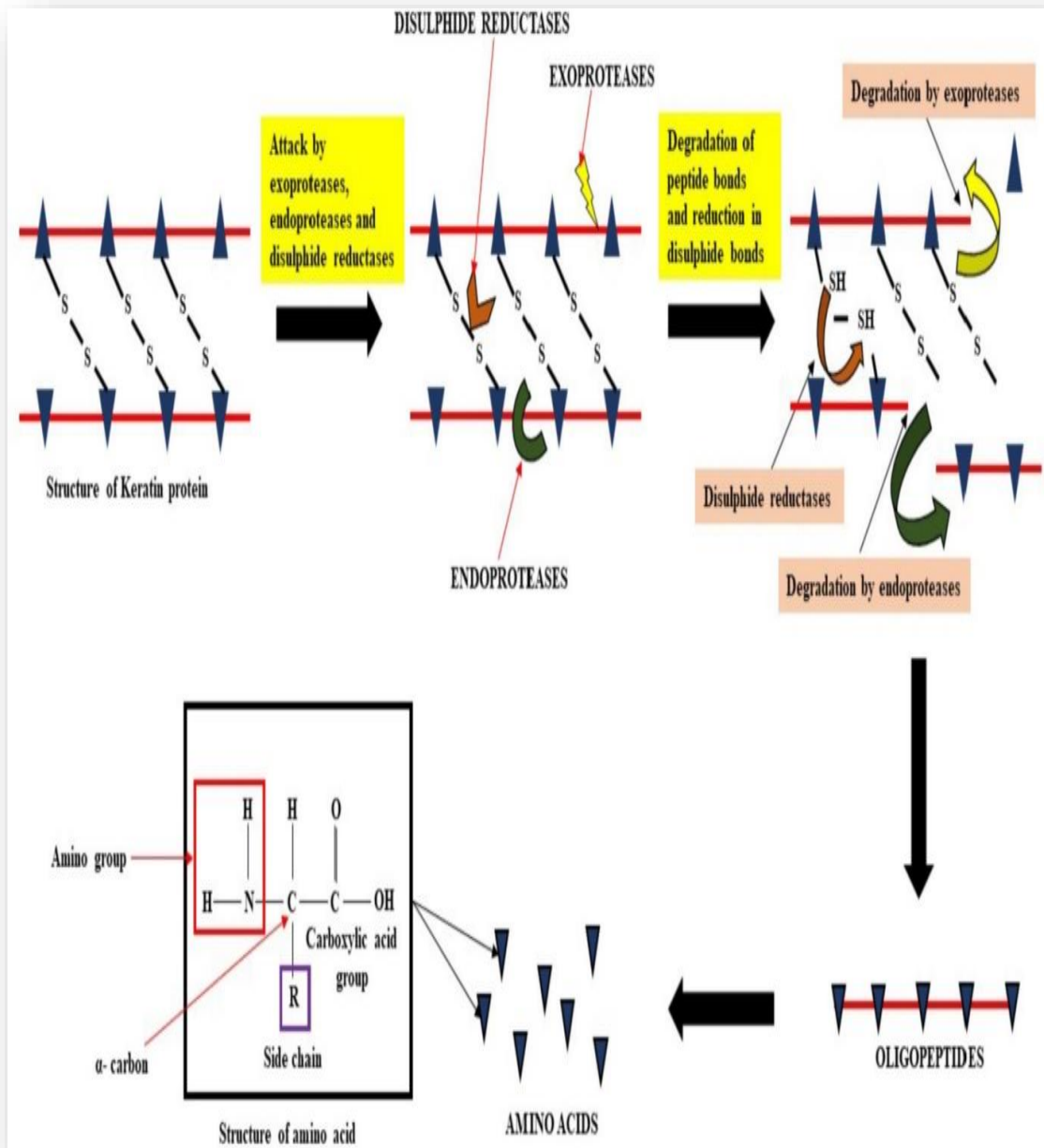


Figure2.6 : Représentation schématique de la dégradation des liaisons disulfure et peptide de kératine [89].

3.5. Applications des kératinases

Les kératinases ont plusieurs utilisations importantes dans les processus biotechnologiques. L'utilisation de ces enzymes comme alternative à l'épilation, catalyseur dans l'industrie du cuir, dans les engrais azotés à libération lente, les cosmétiques et les films biodégradables et d'autre application comme :

- ✓ Applications alimentaires ;
- ✓ Industrie des détergents ;
- ✓ Domaine pharmaceutique et médicale ;
- ✓ Traitement des eaux usées industrielles [90].

3.6. Production de kératinases

La production de kératinase par les actinobactéries marines est inductible car la biomasse kératinique dans les milieux de fermentation, en l'absence de toute autre source de carbone et d'azote, oblige les espèces microbiennes à exprimer les gènes de la kératinase. Les caractéristiques du processus de production d'enzymes inductibles offrent l'avantage que l'on ne voit pas avec les systèmes de production d'enzymes constitutifs [91].

La production de kératinase par le procédé enzymatique inductible offre le double avantage de produire de la kératinase extracellulaire et des produits de dégradation de la biomasse qui peuvent avoir une viabilité économique. L'importation de biomasse kératinique agro-déchets dans la constitution des milieux pour la production de kératinases est un autre avantage important car les processus de production en amont seraient très rentables.

L'utilisation de la biomasse kératinique de déchets agro-industriels ouvrirait de nouvelles perspectives dans la production et l'application de la kératinase. Par conséquent, l'exploration microbienne des nouvelles kératinases doit rester d'actualité et, en tant que telle, l'étude rapportée ici a été conçue pour optimiser certaines variables de processus qui amélioreraient la production de kératinase [91].

3.7. Test de kératinases

L'activité kératinolytique a été déterminée par la méthode modifiée de Letourneau, qui utilise l'azur de kératine comme substrat kératinique. L'azur de kératine a été mis en suspension dans du tampon carbonate (10 mM, pH 10) à une concentration de 4 mg / ml. Le mélange réactionnel contenait 1 ml d'enzyme et 1 ml de suspension de kératine azur. L'échantillon a été incubé à 37°C, 300 tr / min pendant 1 h. Après incubation, le mélange a été maintenu dans de la glace pendant 15 min, suivi d'une centrifugation à 5000 g pendant 15 min pour éliminer le substrat inutilisé. Le surnageant a été mesuré par spectrophotométrie à 595 nm [92].

3.8. Optimisation de la production de kératinases

Tableau2.1 : Paramètres optimisés de quelques microorganismes.

Microorganismes	Paramètres	Concentration de plumes	pH	Source de carbone	Source d'azote	Température d'incubation	Temps d'incubation	Références
<i>Bacillus Cereus</i>		10-20g/L	8-10	Lactose	Caséine	37°C	5 Jours	[93]
<i>Trichoderma HZN12 Harzianum</i>		15g/l	8.5	Glucose	Extrait de levure	37°C	4 Jours	[94]
<i>Streptomyces sp.2M21</i>		5g/L	9	Amidon	Extrait de levure	28°C	5 Jours	[95]
<i>Streptomyces sp Strain 16</i>		20g/L	8	Amidon	Extrait de levure	30°C	4Jours	[96]
<i>Streptomyces Gulbargensis</i>		10-15g/L	9	Amidon	Caséine	45°C	5 Jours	[97]
<i>A keratinilytica Cpt 29</i>		20g/L	9	Galactose	Extrait de levure	45°C	7 Jours	[98]

4. Conclusion

Les kératinases sont des enzymes a pour le but de dégrader les kératines, leurs propriétés physicochimiques est importantes pour effectuer la dégradation, les kératinases ont des propriétés spécifiques pour cela il faut les caractériser et les contrôler. Ces enzymes sont utilisées pour l'élimination des déchets kératiniques et pour cela les recherches sont de lors de développement.

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE 3 : PARTIE EXPERIMENTALE

1. Présentation de travail

Notre travail de recherche a été réalisé entre le 21 février et le 12 mars 2020 au niveau du Laboratoire Pédagogique au pavillon 5 et au sein du Laboratoire de Recherche « Produits naturels » au pavillon 8 de la faculté des Sciences département de chimie, Université SAAD Dahlab BLIDA.

2. Matériel

2.1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans ce travail est le suivant :

- Autoclave ;
- Balance ;
- Etuve ;
- pH-mètre ;
- Agitateur ;
- Incubateur.

2.2. Matériel biologique

- ❖ Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont **les actinobactéries marines (Streptomyces)**.

3. Méthodologie

3.1. Préparation de la farine de plumes

Le substrat utilisé pour la mise en évidence de l'activité kératinolytique des souches sélectionnées est la farine de plumes issue de plumes des poulets.

Les plumes sont collectées au niveau d'une ferme avicole située à **Chaïba (Wilaya de Tipaza)**.

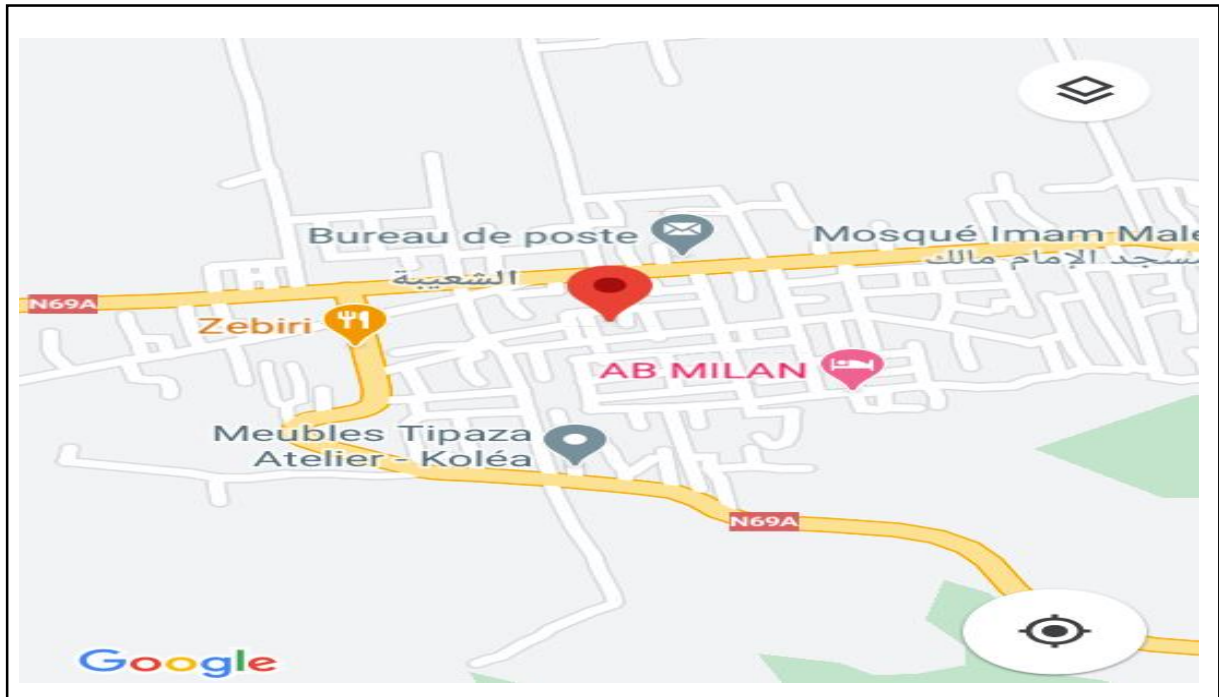


Figure3.1 : Site de la ferme avicole.

Les étapes de transformations des plumes de volaille en farine sont décrites ci-dessous :

- Les plumes subissent plusieurs lavages à l'eau du robinet et un dernier lavage à l'eau distillée.
- Séchage à 150 °C pendant 10 min à l'aide d'une étuve.
- Après séchage les plumes sont découpées en petits morceaux.
- Broyage à l'aide d'une broyeuse et tamisées pour éliminer les grosses particules et avoir une farine homogène.

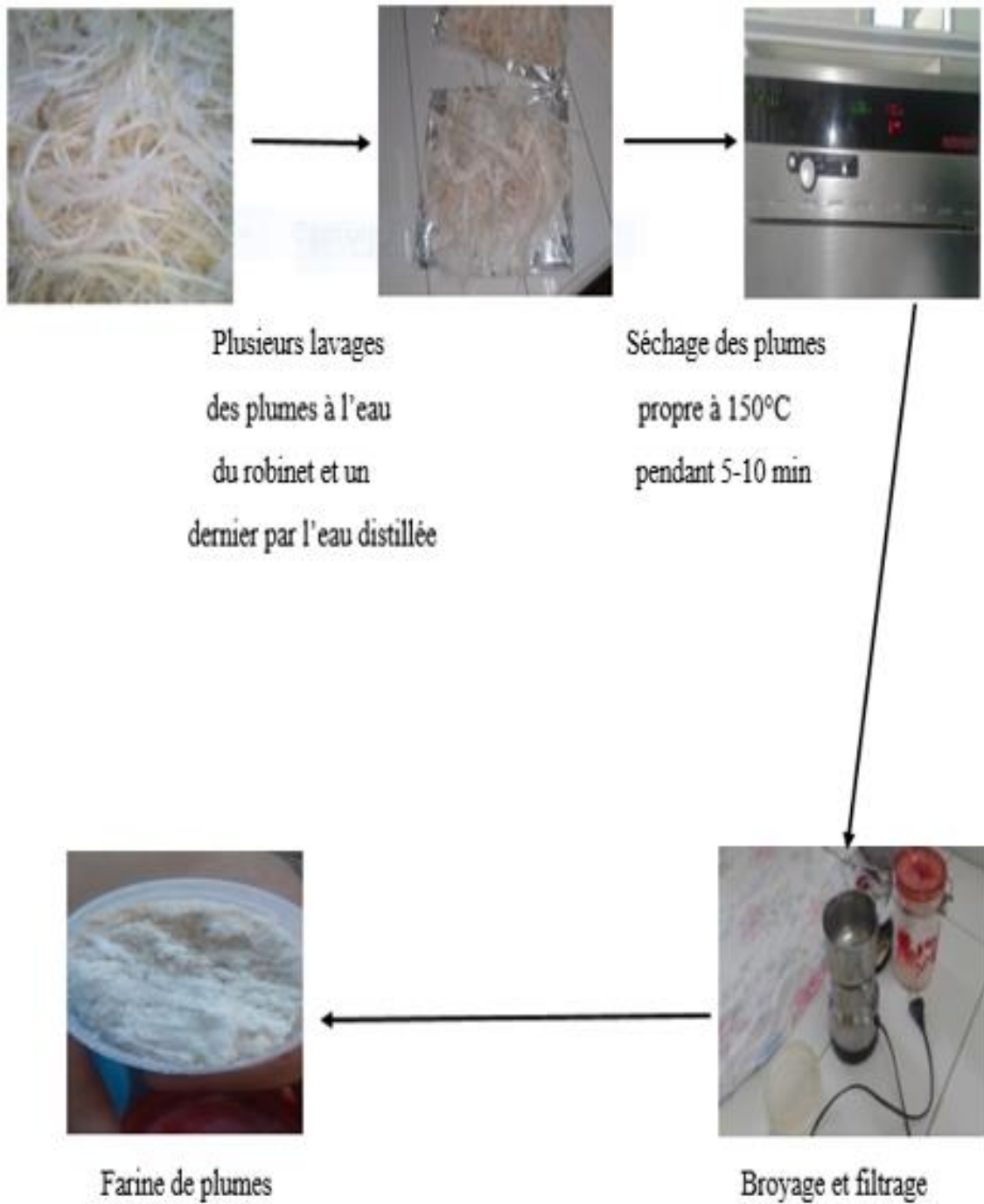


Figure3.2 : Schéma représentant les étapes de préparation de la farine de plumes.

3.2. Repiquage des actinobactéries (*Streptomyces*)

Les actinobactéries ont été isolés sur le milieu ISP2 solide (Information : *Le milieu* ISP2 est un milieu riche qui est couramment utilisé pour la culture de nombreux *Streptomyces* spp [99]).

Les principales étapes de repiquage sont appliquées successivement comme suit :

- ❖ Préparation milieu ISP2 : On dissout : 4 g Extrait de levure et 10 g Extrait de malte dans un litre de l'eau distille. On ajuster le pH de la solution à 7,2 avec HCl 0,1N et ajouter 20 g d'Agar bactériologie en agiter bien la solution. Enfin, on stériliser la solution préparée pendant 20 min à 120°C dans l'autoclave.
- ❖ Ensuite, on va diviser notre solution sur 6 flacons de 250 ml, et mettre les flacons dans un autoclave pendant 20 min à 120°C pour la stérilisation.
- ❖ Enfin, on va mettre notre milieu ISP2 dans des boites de pétri, et faire le repiquage sous la hotte, Le repiquage correspond à l'ensemencement des actinobactéries d'une boite à une autre, puis incubés dans un incubateur à 37 °C pendant 48 à 72h.

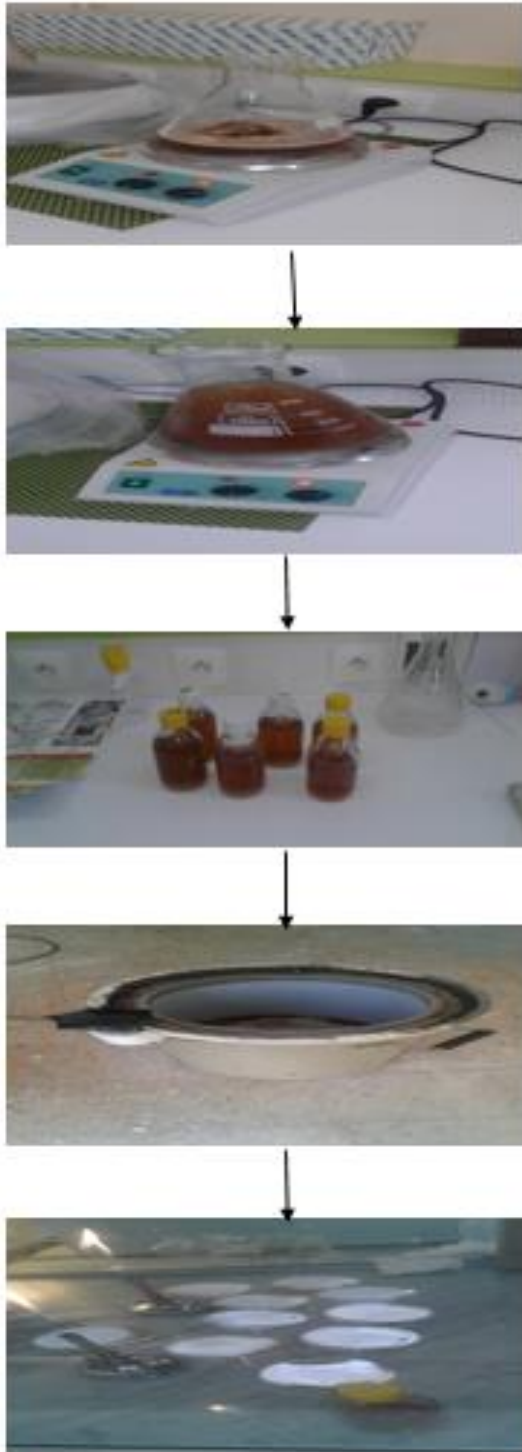


FIGURE3.3 : Représente les étapes de l'isolement et le repiquage.

DISCUSSION

DISCUSSION

D'après la littérature, l'effet des variables du processus sur la production extracellulaire de kératinase par les microorganismes (champignons, bactéries et actinobactéries d'origines marines) a été étudié en utilisant une approche à une variable à la fois. La concentration des plumes variait de 5 à 20g / L. Le pH de fermentation initial varie de 8 à 10. Les effets du dopage du milieu de fermentation avec des sources supplémentaires de carbone et d'azote ont été évalués. Les sources de carbone évaluées comprenaient le glucose, le fructose, l'amidon et le galactose. De même, les sources d'azote incluses étaient l'extrait de levure, l'extrait de malte, la caséine. La température d'incubation varie de 28° à 45°C et le temps d'incubation varie de 4 à 7 jours.

- Pour **Bacillus Cereus** on a trouvé les résultats suivants :

La concentration de plumes est de 10 à 20 g/L, le pH est 8, la source de carbone est le lactose, la source d'azote est la caséine, la température d'incubation est 37°C avec 5 Jours d'incubation [93].

- Pour **Trichoderma HZN12 harzianum** :

La concentration de plumes est 15 g/L, le pH est 8.5, la source d'azote est l'extrait de levure et le glucose comme une source de carbone, le temps d'incubation est 4 Jours avec 37°C température d'incubation [94].

- Pour **Streptomyces sp.2M21** :

La concentration de plumes est 5 g/L, le pH est 9, la source d'azote est l'extrait de levure et l'amidon comme une source de carbone, la température d'incubation est 28°C avec 5 Jours d'incubation [95].

- Pour **Streptomyces sp Strain 16** :

La température d'incubation est 30°C avec 4 Jours d'incubation, le pH est 9, la source d'azote est l'extrait de levure et l'amidon comme une source de carbone avec une concentration de 20 g/L pour la farine de plume [96].

- Pour *Streptomyces Gulbargensis* :

La concentration de plumes est de 10 à 15 g/L, le pH est 9, l'amidon comme une source de carbone, la caséine comme une source d'azote, la température d'incubation est 45°C avec 5 Jours d'incubation [97].

- Pour *A keratinolytica Cpt 29* :

On trouve que la concentration de plumes est de 20 g/L, le pH est 9, la source de carbone est le galactose, et l'extrait de levure comme une source d'azote, la température d'incubation est 45°C avec 7 Jours d'incubation [98].

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les kératinases sont des enzymes polyvalentes et précieuses qui dégradent les kératines et similaires protéines récalcitrantes. Sensibilisation accrue à leurs applications biotechnologiques et potentielles a donné une forte impulsion à l'étude de ce groupe de protéases alcalines. Diverses des groupes de micro-organismes comme les actinobactéries sont capables de produire des kératinases et d'autres sont découverts chaque année. La connaissance de leurs caractéristiques chimiques et biochimiques améliore la compréhension qui est nécessaire pour explorer pleinement leur valeur. Des plus établis applications biotechnologiques, les kératinases se sont avérées très efficaces dans la gestion et valorisation des déchets kératiniques et amélioration nutritionnelle de l'alimentation animale. L'utilisation de kératinases comme agents de lutte biologique est une perspective passionnante pour l'agro-industrie et la santé publique domaine. L'implication des kératinases et de leurs hydrolysats dans la production de bioénergie peut contribuer à atténuer une partie de la demande mondiale d'énergie provenant de sources non durables.

D'après les travaux précédents, on conclut que la concentration des plumes variait de 5 à 20g / L. Le pH de fermentation initial varie de 8 à 10. Les effets du dopage du milieu de fermentation avec des sources supplémentaires de carbone et d'azote ont été évalués. Les sources de carbone évaluées comprenaient le glucose, le fructose, l'amidon et le galactose. De même, les sources d'azote incluses étaient l'extrait de levure, l'extrait de malte, la caséine. La température d'incubation varie de 28° à 45°C est le temps d'incubation varie de 4 à 7 jours.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] Herzog B., Overy D., Haltli B., Kerr R., (2016). Discovery of keratinases using bacteria isolated from marine environments. *Systematic and Applied Microbiology*, 39: p.49-57.
- [2] Lin W., Yuting Q., Cao Y., Ying g., Zhizhou g., Hongying g., 2017. Production and Characterization of Keratinolytic Proteases by a Chicken Feather-Degrading Thermophilic Strain, *Thermoactinomyces* sp. YT06. *Microbiol. Biotechnol*, 27:p.2190-2198.
- [3] Bagewadi ZK., Mulla SI., Kinnear HZ., 2018. Surface methodology-based response optimization of keratinase production from the HZN12 isolate of *Trichoderma harzianum* using chicken feather waste and its application in the depilation of the skin. *Environmental Chemical Engineering*, 6: p. 4828-4839.
- [4] Sibi G., Kodak S., Gharge T., Chavan V., 2019. Microbial Degradation of Poultry Feather Wastes under the Influence of Temperature and pH. *Int J Environ Sci Nat Res*, Vol 21.
- [5] Yue XY., Zhang B., Jiang DD., Liu YJ., Niu TG., 2011. Separation and purification of a keratinase as a pesticide against root knot nematodes. *Microbiology Biotechnology*, 27: p. 2147-2153.
- [6] Lange L., Huang Y., Busk PK., 2016. Microbial breakdown of keratin in nature a new hypothesis of industrial relevance, *Applied Microbiology Biotechnology*, 100: p. 2083-2096.
- [7] Fang Z., Zhang J., Liu B., Du G., Chen J., 2013. Biodegradation of wool waste and keratinase production in a large-scale fermenter with different strategies by *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1, *Bioresource Technology*, 140: p. 286-291.
- [8] Sharma., Devi S., 2018. Versatility and commercial status of microbial keratinases, environmental science. *Technology and Biotechnology*, 17: p. 19-45.
- [9] Gupta R., Ramnani P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 70: 21-33.
- [10] Bhangre K., Chaturvedi V., Bhatt R., 2016. Simultaneous production of stable keratinolytic detergent protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 from agro-industrial waste. *Biotechnological*, 10: p. 94-104.
- [11] Sharma R., Devi S., 2018. Versatility and commercial status of keratinases microbial: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*. 17 : p19-45.
- [12] Lewin GR., Carlos C., Chevrette MG., Horn HA., McDonald BR., Stankey RJ., Currie CR., 2016. Évolution et écologie des actinobactéries et de leurs applications bioénergétiques *Annu. Rev. Microbiol*, 70: p.235-254.
- [13] Baldacci E., 1962. Current trends in the classification of actinomycetes. *Ann Soc Belgian Med Trop*, 4: p.633–646.
- [14] Donadio S., Sosio M., Lancini G., 2002. Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 60: p.377-380.

[15] Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F., van Sinderen D., 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol.Mol.Bio.Rev*, 71 : p .495-548.

[16] Lamary L., Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*, Thèse de Doctorat d'Etat Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 186P.

[17] Barka EA., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk HP., Clement CY., Ouhdouch GP., Wezel V., 2016. Taxonomy, physiology and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, 80: p.1-43.

[18] Larpent. J.P., Wild boar. J.J., 1989. Biotechnologies of antibiotics. Masson. Paris, p. 481.

[19] Grigorova, R., Norris, J.R., 1990. Techniques in microbial ecology. Methods in Microbiology. *Academic Press*, London, 22: p. 627.

[20] Goodfellow M. Williams S. T., 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:p. 189-216.

[21] Peltola J. S.P., Anderson M. A., Kampfer P., Auling G., Kropensstedt R. M., Busse H. J., Salkinoja-Salonen M. S., Rainey F. A., 2001. Isolation of toxigenic *Nocardiosis* strains from indoor environments and description of two new *Nocardiosis* species, *N. exhalans* sp.nov. and *N. umidischholae* sp. nov. *Appl. Env. Microbiol.* 67 : p. 4293-4304.

[22]

A :https://www.google.com/search?q=Photographie+au+microscope+%C3%A9lectronique+%C3%A0+balayage+illustrant+les+chaines+de+spores+du+genre+Streptomyces&sxsrf=ALeKk01iQK1B8CCDXbck2IonlKzT6qi7Ww:1599588476491&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiO77W3k9rrAhULyoUKHQc5Cy0Q_AUoAXoECAwQAaw&biw=1366&bih=608#imgrc=StUWA5AmVX6YjM

B

:
https://www.google.com/search?q=Aspect+macroscopique+d%E2%80%99une+souche+de+Streptomyces&sxsrf=ALeKk01brr1In4jCHXyyj4z3uCiQBoDqQQ:1599588601559&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwinuIfzk9rrAhXLzYUKHXsMBgAQ_AUoAXoECAwQAaw&biw=1366&bih=608#imgrc=fsr3H3K85J4e9M

[23] Bergey's Manuel, 2007. Garrity. G.M.; Lilburn. T.G; Cole. J.R; Harrison. S.H., Euzéby. J and Tindall. B.J. In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae. Copyright, Michigan State University Board of Trustees.

[24] Shirling E B., Gotlieb D, 1966 Methods for characterization of *streptomyces* species, *Int Journal of Systimatic Bacteriology*, 16: p.313-340.

[25] Lechevalier M.P., Lechevalier H. A., 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20 : p. 435-443.

[26] Becker B., Lechevalier MP., Gordon RE. Lechevalier HA., 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl Microbiol.*, 12: p.421-423.

- [27] Collins MD., Pirouz T., Goodfellow M., Minnikin DE., 1977. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J.Gen.Microbiol.* 100: p. 221-230.
- [28] Mayfield CI., Williams ST., Ruddick SM., Hatfield HL., 1972. Studies of the ecology of Actinomycetes in soil. IV, Observation on the form and growth of *Streptomyces* in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 4: 79-89.
- [29] Djaballah C., 2010. Biodiversity of halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from the sebkhia of Ain M'Lila. Magister's thesis in Microbiology. Mentouri University-Constantine: 102p.
- [30] Lamari L., Boudjella H., Bouras N., Sabaou N., 2015. Comparative study of actinobacteria from the rhizosphere of two susceptible date palm cultivars resistant to bayoud. Algerian. *Journal of Arid Environment*, 3: P: 3-17.
- [31] Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G. F., Chater K. F., van Sinderen D., 2007. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: P.495-548.
- [32] Lam S., 2006. Discovery of new metabolites from marine actinomycetes *Curr. Opin. Microbiol.*, 9: p. 245-251.
- [33] Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakuma Kr., Kim S.-K., 2014. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res.*, 169: p.262-278.
- [34] Fenical W., Jensen P.R., 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria *Nat. Chem Biol.*, 2: p.666-673.
- [35] Mincer TJ., Fenical W., Jensen PR., 2005. Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: p.7019-7028.
- [36] Goodfellow M. 2012. Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. Nov. In: Goodfellow Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria, second edition, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. p. 1-28.
- [37] Loucif K., 2011. Recherche des substances antibactériennes à partir d'une collection des souches d'actinomycètes. caractérisation préliminaires de molécules bioactives. Mémoire de magister de microbiologie, Université Mentouri – Constantine, 21p.
- [38] Newman D.J., Cragg M.G., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat Prod.*, 70: P.461-477.
- [39] Anandan R., Dharumadurai D., Manogaran G P., 2016. An Introduction to Actinobacteria Department of Microbiology, School of Life Science, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India, p. 13.
- [40] Liu C., Yang C., Zeng Y., Shi J., Li L., Li W., Jiao R., Tan R., Ge H., 2019. Chartrenoline, a novel alkaloid isolated from a marine *Streptomyces chartreusis* NA02069. *Chinese Chemical Letters*, 30: p.44-46.

- [41] Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S., 2011. Biological Activities and Potential Health Benefits of Sulphated Polysaccharides Derived from Marine Algae Carbohydrates, *Polym*, 84: p. 14-21.
- [42] Guaratini T., Barros MP., Falcão VR., Tonon AP., Lopes NP., Campos S., Torres MA., Souza AO., Colepicolo P., Pinto E., 2007. Metabolites of algae with economic impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Toxicol. Pharmacol*, 146: p. 60-78.
- [43] Garon-Ladiere S, 2004, Structural study of the wall polysaccharides of the red alga *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales), University of Western Brittany, p 332.
- [44] AINANE T., 2011. Valorisation of the algal biomass of Morocco: Pharmacological Potential and environmental applications, case of the brown algae *Cystoseira tamariscifolia* and *Bifurcaria bifurcata*. Hassan II Casablanca University.
- [45] Sudhakar K., Mamat R., Samykano M., Azmi W H., Ishak W F W., Yusaf T., 2018. An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91: p.165-179.
- [46] Leclerc V., Floc'h J.Y., 2010. The secrets of algae. *Carnets de Sciences.*, Ed Quae, p 167.
- [47] Belghit I., Rasinger J.D., Heesch S., Biancarosa I., Liland N., Torstensen B., Waagbø R., Lock E.J., Bruckner C.G., 2017. In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae. *Algal Research*, 26: p.240-249.
- [48] Deng Y., Wang Q., Cao T.J., Zheng H., Ge ZH., Yang LE., Lu S., 2020. Cloning and functional characterization of the bona fide geranylgeranyl diphosphate synthase from the red algal seaweed *Bangia fuscopurpurea*. *Algal Research*, 48: p.101935.
- [49] El Achaby M., Kassab Z., Aboulkas A., Gaillard C., Barakat A., 2018. Reuse of red algae waste for the production of cellulose nanocrystals and its application in polymer nanocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules.*, 106: p.681-691.
- [50] <https://sites.google.com/site/goutteagout/home/passeport-recherche/algues/gelidium-Sesquipedale>.
- [51] Fellous S., 2019. Etude biologique et biochimique de l'algue brune *Cystoseira amantacea stricta* de la baie d'Oran. Thèse de doctorat.
- [52] https://www.researchgate.net/figure/Sargassum-spSeaweed_fig2_311515006.
- [53] Zheng L.X., Chen X.Q., Cheong K.L. 2020. Current trends in marine algae polysaccharides: The digestive tract, microbial catabolism, and prebiotic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151: p.344-354.
- [54] Rushdi MI., Abdel-Rahman I.A.M., Attia EZ., Abdelraheem WM., Saber H., Madkour HA., Amin E., Hassan HM., Abdelmohsen UR., 2020. A review on the diversity,

chemical and pharmacological potential of the green algae genus *Caulerpa*. *South African Journal of Botany*, 132: p.226-241.

[55] <https://www.fishfish.fr/plante/caulerpa-prolifera> .

[56] Ariede M.B., Candido T.M., Jacome A.L.M., Velasco M.V.R., João Carlos M., Carvalho D., Baby A.R., 2017. Cosmetic attributes of algae-A review. *Algal Research*, 25: p.438-487.

[57] Adeniyi O.M., Azimov U., Burluka A., 2018. Algae biofuel: status and future applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90: p.316-335.

[58] Feroz S., Muhammad N., Ratnayake J., Dias G., 2020. Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive Materials*, 5: p.496-509.

[59] Tinoco A., Rodrigues R.M., Machado R., Pereira R.N., Cavaco-Paulo A., Ribeiro A., 2020. Ohmic heating as an innovative approach for the production of keratin films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150: p.671-680.

[60] Teresa K.K., Justyna B., 2011. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. *Waste Management*, 31: p.1689-1701.

[61] Hill P., Brantley H., Van Dyke M., 2010. Some properties of keratin biomaterials: keratines. *Biomaterials*, 31: p.585-593.

[62] Meyers M. A., Chen P.-Y., Lin A. Y.-M., Seki Y., 2008. Biological materials: structure and mechanical properties. *Prog. Mater. Sci.* 53: p.1-206.

[63] Bodde SG., Meyers MA. McKittrick J., 2011. Correlation of the mechanical and structural properties of cortical rachis keratin of rectrices of the Toco Toucan (*Ramphastos toco*). *J. Mechan. Behav. Biomed. Mater.* 4: p. 723-732.

[64] Fraser R. D. B., Parry D. A. D. 2011. The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard β -keratins. *J. Struct. Biol.* 173: p. 391-405.

[65] https://www.google.com/search?q=la+structure+des+k%C3%A9ratines+alpha+et+b%C3%A9ta&sxsrf=ALeKk01pOi0gSyy8p8trsiXgp37WYLkfrQ:1599575202284&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwip1uT94dnrAhWP4IUKHd6AC5YQ_AUoAXoECBAQAw&biw=1366&bih=608#imgrc=tanAAa4rb7i1OM

[66] Wang B., Yang W., McKittrick J., Marc André Meyers. 2016. Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76: p6.

[67] Agarwal V., al., 2019. Comparative study of the extraction of keratin from human hair. *Int. J. Biol. Macromol*, 133: p.382-390.

[68] Eslahi N., Dadashian F., Nejad NH., 2013. An investigation of the extraction of keratin from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis preparation. *Biochem. Biotechnol*, 43: p. 624 -648.

- [69] Chen S., Hori N., Kajiyama M., Takemura A., 2020. Thermal responsive poly (N-isopropylacrylamide) grafted chicken feather keratin prepared via surface initiated aqueous Cu(0)-mediated RDRP: Synthesis and properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153: p.364-372.
- [70] Freeman S.R., Poore M.H., Middleton T.F., Ferket P.R. 2009. Alternative methods for disposal of spent laying hens: evaluation of the efficacy of grinding, mechanical deboning and of keratinase in the rendering process. *Bioresour Technol.* 100: p.4515-4520.
- [71] https://www.google.com/search?q=image+d%27une+plume+d%27C3%A9taille+C3%A9&tbm=isch&ved=2ahUKEwjvupTJ7uHrAhUCMRoKHQGSBLMQ2cCegQIABAA&oi=image+d%27une+plume+d%27C3%A9taille+C3%A9&gs_lcp=CgNpbWcQAzoCCAA6BAgAEB5Q6R9YvDhgkUBoAHAAeACAAeUCiAGdD5IBBzAuNC4zLjKYAQCgAQGqAQtd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&scient=img&ei=k9NbX6lHYLiaIGkpgL&bih=657&biw=1366#imgrc=-WaxTsT5wkxPnM
- [72] Burhan A., Nisa U., Golman C., Omer C., Ashabil A., Osman G., 2003. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38: p.1397-1403.
- [73] Schomburg I., Jeske L., Ulbrich M., Placzek S., Chang A., Schomburg D., 2017. The Brenda Enzyme Information System-From a Database to an Expert System. *Journal of Biotechnology*, 261: p. 194-206.
- [74] Kumar D., Savitri. Thakur N., Verma R., Bhalla T.C., 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 3: p.661-672.
- [75] Selvam, K., vishnupriya, 2012. B. Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. *International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives*, 3: p. 267-275.
- [76] George S., Raju. Krishnan.M.R.V, Subramanian.T.V, Kunthala.J.1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Process Biochemistry*. 30: 457-462.
- [77] Protease Research. (Page consultée 15 septembre 2012). [en ligne] Adresse URL: <http://proteases.org/structure.php?start=240>.
- [78] Sahoo D.K., Das A., Thatoi H., Mondal K.C., Mohapatra P.K. 2012. Keratinase Production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 167 :p.1040-1051.
- [79] Université d'Angers. Biochimie (Position des ponts disulfures dans un peptide). France (page consultée 19 Juin 2011) [en ligne] Adresse URL : <http://biochimej.univangers.fr/Page2/TexteTD/7ModuleS6BG3/ZSuite/7PositionPontDiul/1PosPontDisul.htm>
- [80] Kowalska K., Bohacz J., 2011. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste Manag*, 31: p.1689-1701.

- [81] Bressollier P., Letourneau F., Urdaci M., Verneuil B., 1999. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus* *Appl. Environ. Microbiol*, 65: p.2570-2576.
- [82] Syed DG., Lee JC., Li W.J., Kim C.J., Agasar D., 2009. Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresour Technol*, 100: p.1868-1871.
- [83] Kaul S., Sumbali G., 1997. Keratinolysis by poultry farm soil fungi, *Mycopathologia*, 139: p.137–140.
- [84] Kunert J., 1976. Keratin decomposition by dermatophytes. II. Presence of s-sulfocysteine and cysteic acid in soluble decomposition products *Z. Allg. Microbiol*. 16:p.97-105.
- [85] Sangali S., Brandelli A. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. Strain kr2. *J. Appl. Microb*, 89: p.735-743.
- [86] Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Yokoyama K., Tamiya E., 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294: p.1138-1143.
- [87] Kang D., Herschend J., W.A. Al-Soud., M.S. Mortensen., Gonzalo M., Jacquioid S., S.J. Sørensen., 2018. Enrichment and characterization of an environmental microbial consortium displaying efficient keratinolytic activity. *Bioresour. Technol*, 270: p.303-310.
- [88] Lange L., Huang Y., P.K., 2016. Bus Microbial decomposition of keratin in nature a new hypothesis of industrial relevance. *Appl. Microb. Biotechnol*, 100: p. 2083-2096.
- [89] Gupta R., Ramnani P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview *Appl. Microbiol Biotechnol*, p.70.
- [90] Onifade AA., Al-Sane NA., Musallam AA., Al-Zarban S., 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for the nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technology*, 66: p.1-11.
- [91] Reddy M., Reddy KS., Chouhan YR., Bee H., Reddy G., 2017. Efficient degradation of feathers and production of keratinase by *Bacillus pumilus* GRK for its application as a bio-detergent additive. *Bioresour. Technol*, 243: p. 254-263.
- [92] Letourneau F., Soussotte V., Bressollier P., Branland P., Verneuil B., 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. SK1-02: a new strain isolated *Lett. Appl. Microbiol*, 26: p.77-80.
- [93] Arokiyaraj S., Varghese R., Ali Ahmed B., Duraipandiyar V., Al-Dhabi N.A., (2019). Optimizing the fermentation conditions and enhanced production of keratinase from *Bacillus cereus* isolated from halophilic environment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26: p.378-381.

- [94] Bagewadia Z.K., Mullab S.I., Ninnekar H.Z., (2018) .Response surface methodology based optimization of keratinase production from *Trichoderma harzianum* isolate HZN12 using chicken feather waste and its application in dehairing of hide .*Journal of Environmental Chemical Engineering* , 6: p.4828-4839.
- [95] Demir T., Hames E.E., Oncel S.S., Vardar-Sukan F., (2015).An optimization approach to scale up keratinase production by *Streptomyces* sp. 2M21 by utilizing chicken feather. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 103: p.134-140.
- [96] Xie F., Chao Y., Yang X., YangJ., Xue Z., Luo Y., Qian S., 2010.Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium .*Bioresource Technology* , 101: p.344–350.
- [97] Syed D.G., Lee J.C., Li W.J., Kim C.J., Agasar D., (2009). Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis* .*Bioresource Technology*, 100: p.1868-1871.
- [98] Habbeche A., (2014). Purification et caractérisation d'une kératinase thermostable KERAK-29 chez une nouvelle souche d'Actinomycète .Thèse de doctorat : en Biochimie Appliquée. 167p.
- [99] Shirling EB., Gottlieb D., 1966. *Int. Syst.Bacteriol*, 16: p.313-340.