

UNIVERSITE SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté Des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE DE MASTER

Spécialité : Chimie Des Produits Naturels

EXTRACTION ET CARACTERISATION DE LA KÉRATINE ET OPTIMISATION DE LA PRODUCTION DE KÉRATINASE

Par :

Aicha BOUCHAMA ET Amel BOUDJETTOU

Devant le jury composé de :

K. Eddouaouda	MCB	USDB-1	Président
Z. Zeffouni	MCB	USDB-1	Examinatrice
A. Badis	Pr	USDB-1	Promoteur

Blida, 15 septembre 2021

REMERCIEMENT

*Nous Tenons à remercier **Allah** le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la Nous patience pour achever ce travail, et tous eux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier à : Notre encadreur Mr. **BADIS ABDELMALEK**, professeur à l'université **SAAD DAHLAB BLIDA 1**, pour avoir accepté de nous encadré, et qui a proposé le thème de ce mémoire, et pour ses conseils qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions également messieurs les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tout particulièrement : Mr. **EDOUAOUA K**, pour accepter de présider ce jury, Mme. **ZEFFOUNI Z**, maître de conférences qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.*

On désire aussi remercier tous les enseignants qui ont contribué à nos former durant le cycle d'étude.

MERCI.



DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, source de vie, d'amour et d'affection

A mes chers frères, source de joie et de bonheur

A toute ma famille, source d'espoir et de motivation

A tous mes amis, tout particulièrement Nadia, wissam,

Imane, Saloua, faiza, houda, soumia.

A tous ceux qui me sont chers

"Le succès c'est d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme "

"Le succès a beaucoup d'amis "



Amel Boudjettou

DEDICACES

Ce travail est terminé avec l'aide du dieu, Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents qui m'ont menée pas à pas à la réussite et à la concrétisation de mes objectifs, Je vous dois tout ce que je suis et tout ce que je serai, j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances.

A ceux qui sont proches de mon cœur, mes très chers frères :

Amine et Abderrahmane

A mes adorables sœurs :

Sarah et Imane

Et à toute ma famille maternelle et paternelle.

Ainsi que tous mes amis et tous ceux qui me sont très chers

Aïcha Bouchama



ملخص

يهدف العمل الحالي إلى استخلاص الكيراتين من ريش الدواجن ثم توصيف الكيراتين وتعظيم إنتاج الكيراتين بواسطة سلالة بكتيرية من خلال تثمين ريش الدواجن المستخدم كركيزة. هذا الإنزيم له اهتمامات صناعية وهي: الأعلاف الحيوانية ، صناعة الأدوية ومستحضرات التجميل.

النتائج التي تم الحصول عليها بخصوص استخلاص الكيراتين مع DMSO أعطت عائد 14% لـ 10 غ من الريش ، وهي قيمة منخفضة مقارنة بطرق الاستخلاص الأخرى.

تم تحسين إنتاج الكيراتين باختيار عوامل مختلفة: درجة الحموضة ودرجة الحرارة ، المصادر المختلفة للنيتروجين العضوي وغير العضوي ، حجم اللقاح ، مسحوق الريش ، من أجل تحديد أنسب العوامل وأكثرها تأثيراً وكذلك تفاعلاتها. أتاحت النتائج التي تم الحصول عليها تحديد القيم المثلى لهذه العوامل: بالتفصيل: مسحوق ريش بنسبة 1% ، حجم اللقاح 6% ، درجة حرارة الحضانة 37 درجة مئوية ودرجة الحموضة: 8 ، تصل إلى الحد الأقصى لنشاط الكيراتين.

الكلمات المفتاح : التثمين ، ريش الدواجن ، الكيراتين ، الكيراتيناز ، التحسين ، تحليل الكيراتين ، نشاط تحلل الكيراتين.

RESUME

Le présent travail a pour objectif l'extraction de kératine de plumes de volailles ensuite et la caractérisation de la kératine et l'optimisation de la production de kératinases par une souche bactérienne à travers la valorisation des plumes de volailles utilisées comme substrat. Cet enzyme a des intérêts industriels, à savoir : alimentation animale, industrie pharmaceutique et cosmétique.

Les résultats obtenus concernant l'extraction de la kératine avec le DMSO ont donné un rendement de 14% pour 10 g de plumes, ce qui est une valeur faible par rapport aux autres méthodes d'extraction.

L'optimisation de la production de kératinases a été effectuée en sélectionnant différents facteurs opératoires : le pH et la température, différentes sources d'azote organique et inorganique, le volume de l'inoculum, la farine de plumes, afin de déterminer les paramètres les plus influents ainsi que leurs interactions. Les résultats obtenus ont permis de déterminer les valeurs optimales de ces facteurs : poudre de plumes de (1%, g), volume d'inoculum de (6%, ml), une température de 37 °C et un pH = 8.

Mots clés : Valorisation, Plumes de volailles, Kératine, Kératinases, Optimisation, activité kératinolytique, Hydrolyse de kératine.

ABSTRACT

The main objective of this work is the extraction of keratin from poultry feathers, the characterization of keratin and the optimization of the production of keratinases by the microbial strain through the valorization of poultry feathers used as a substrate. This enzyme of industrial interest, namely: animal feed, pharmaceutical industry and cosmetics.

The results obtained for the extraction of keratin with DMSO gave a yield of 14% for 10 g of feathers, which is a low value compared to other extraction methods.

The optimization of the production of keratinases was carried out by selecting different operating factors: pH and temperature, different sources of organic and inorganic nitrogen, the volume of the inoculum, the feather meal, in order to determine the most suitable parameters. more influential as well as their interactions. The results obtained made it possible to determine the optimal values of these factors: in detail: feather powder of (1%, g), volume of inoculum of (6%, ml), a temperature 37 ° C and a pH: 8, reaching maximum keratinolytic activity.

Keywords: Valorisation, Poultry feathers, Keratin, Keratinases, Optimization, keratinolytic activity, Hydrolysis of keratin.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

g/L	: gramme/litre
mol/L	: mol/litre
ml	: millilitre
(N)	: Concentration équivalente
(M)	: Concentration molaire
pH	: Potentiel hydrogène
Na₂S	: sulfure de sodium
FI	: Filaments intermédiaires
nm	: Nanomètre
KDa	: Kilodalton
°C	: Degré celsius
mm	: Millimètre
µm	: micromètre
SO₃²⁻	: sulfite
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
Na₂SO₃	: sulfite de sodium
HSO₃⁻	: bisulfite
S₂O₅²⁻	: disulfite
SDS	: Dodécylsulfate de sodium
NaOH	: hydroxyde de sodium
Tyr	: Tyrosine
Ser	: Sérine
Thr	: Thréonine
α	: Alpha

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

β	: Bêta
S	: Soufre
cm	: Centimètre
Tr/min	: tour par minute
(p/p)	: Poids/ poids
V/V	: volume /volume
MEB	: Microscopie électronique à balayage
IRTF	: Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
DRX	: Diffractométrie de rayons X
(v/p)	: Volumes / poids
UV	: Ultraviolet
λ	: Lambda
θ	: Thêta
Cu_2SO_4	: Sulfate de cuivre.
DO	: Densité optique
TCA	: Acide trichloracétique
UI	: Unité Internationale
NH_4NO_3	: Nitrate d'ammonium
KNO_3	: Nitrate de potassium
$(\text{NH}_4)\text{Cl}$: Chlorure d'ammonium
NH_4SO_4	: Sulfate d'ammoniaque
$\text{CO}(\text{NH}_4)_2$: Cobalt d'ammonium
FBM	: Milieu à base de farine de plumes
FBMS	: Milieu à base de farine de plumes solide.
FBML	: Milieu à base de farine de plumes liquide

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1	Structures d'une plume de poulet.....	05
Figure 2	Structures morphologiques des plumes de poulet (barbes de poulet, barbules de poulet, rachis de poulet).....	06
Figure 3	Schéma de la structure de la kératine et les diverses liaisons inter et intra moléculaires (liaisons hydrogènes, ioniques,disulfures).....	07
Figure 4	La formation des ponts disulfures.....	08
Figure 5	Liens dans les structures kératiniques. Liaisons intrachain, La formation de liaisons disulfure (cystéine-cystéine), de liaisons hydrogène (par exemple glutamine-sérine) et de liaisons ioniques (par exemple acide aspartique-lysine) dans les protéines	08
Figure 6	La structure des FI de la kératine α : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, (b) : dessin schématique de la formation des filaments intermédiaires.....	11
Figure 7	Structure des filaments β -kératine : (a) : un modèle boule et bâton de la Chaîne polypeptidique, et illustration du feuille plissée β . (b) : dessin schématique de la formation des filaments β - kératines.....	12
Figure 8	Structure 3D en rubon des kératinase complexe.....	19
Figure 9	Schéma représentant le mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures.....	20
Figure 10	Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.....	20
Figure 11	Diagramme montrant les étapes d'extraction et purification de kératine	27
Figure 12	Les plumes de volaille.....	28
Figure 13	Farine des plumes.....	28
Figure 14	Caractérisation de la kératine.....	30
Figure 15	La poudre de kératine.....	38

LISTE DES ILLUSTRATIONS ,GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 16	Les traces de taux des cires sur ballon.....	38
Figure 17	La forme de la plume de poulet avant et après la combustion à l'intérieur du four à moufle.....	39
Figure 18	Sulfate de cuivre.....	40
Figure 19	Sulfate de cuivre + hydroxyde de potassium à 1% + 6ml de la solution de kératine.....	40
Figure 20	Images SEM de la kératine.....	41
Figure 21	Les spectres FTIR de la kératine.....	42
Figure 22	Diffraction des rayons X de la kératine en poudre.....	44
Figure 23	La XRD de la kératine.....	44
Figure 24	Effet du pH du milieu sur la production de kératinase par la souche S14.....	45
Figure 25	Effet de la température d'incubation sur la production de kératinase.....	46
Figure 26	Effet des différents volumes d'inoculum sur la production de kératinase.....	47
Figure 27	Effet de concentration croissante en farine de plumes sur la production de kératinase par la souche S14.....	48
Figure 28	Effet des différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche S14.....	50
Figure 29	Effet des différentes sources d'azote inorganique sur la production de kératinase par la souche S14.....	51
Tableau 1	Production mondiale de volaille (x1000).....	03
Tableau 2	Composition en acides aminés des matières kératiniques représentatives d' α et β - kératine.....	14
Tableau 3	Propriétés biochimiques de certaines kératinases microbiennes sélectionnées.....	23
Tableau 4	(principe, sensibilité,sélectivité, facilité) la méthode de Biuret.....	33
Tableau 5	Résultats finaux de l'extraction de la kératine.....	38

LISTE DES ILLUSTRATIONS ,GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Tableau 6	Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases par la souche S14.....	45
Tableau 7	Effets de la variation de température sur la production de kératinases	46
Tableau 8	Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases par la souche S14.....	47
Tableau 9	Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de Kératinases par la souche S14.....	48
Tableau 10	Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche S14.....	49
Tableau 11	Effets des différentes sources inorganiques d'azotes sur la production de kératinases par la souche S14.....	50

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

DEDICAES

ملخص

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE.....01

PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

ETUDE DE LA KERATINE

I .1.Production mondiale de la volaille	03
I .2.La production de volaille en Algérie	04
I .3.Déchets de volailles	04
I .4.Valorisation des plumes de volaille.....	04
I .5.Les plumes	04
I .5.1.Morphologie de la plume	05
I .5.2.Composition de plumes de volaille	06
I .6.Définition de la kératine.....	06
I .6.1.Structure de la kératine.....	07
I .6.2.Type de kératine	08
I .6.3.Caractéristiques structurelles.....	09

I .6.4.Quelque ressources en déchets kératiniques.....	12
I .7.Biochimie des α - et β -kératines	14
I .8.Propriétés de la kératine.....	15
I .9.Les méthodes Extraction de la kératine.....	15
I .10.Applications industrielles de la kératine.....	17

CHAPITRE II :

LES ENZYMES KÉRATINOLYTIQUES

II . L'enzyme de kératinase.....	19
II .1.Définition des kératinases.....	19
II .2.Mode d'action de kératinase	19
II .3. Le mécanisme de la dégradation de kératine par le kératinase	20
II .4.Source microbiennes de kératinase.....	21
II . 4.1.Bactéries kératinolytiques.....	21
II .4.2.Moisissures kératinolytiques.....	21
II .5.Conditions physicochimique optimales des kératinases.....	21
II .5.1.PH et température.....	22
II .5.2.Poids moléculaire.....	22
II .5.3.Substrats spécifiques.....	22
II .6.Propriété physicochimiques des kératinases	22
II .7.Applications de kératinase en biotechnologie.....	23

PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE

III. MATERIELS ET METHODES

III.1.Préparation de la matière kératinique	28
III.1.1.Les plumes de poulets.....	28

III.1.2.Extraction et purification de la kératine.....	29
III.1.3.Solubilisation de la kératine	29
III.1.4.Précipitation de substrat	29
III.1.5.Dissolution de la kératine	29
III.1.6.Dissolution de la kératine.....	29
III.2.Caractérisation de la kératine.....	30
III.3.Matériel biologique	34
III.3.1.Origine de la souche bactérienne	34
III.3.2.Criblage de la souche productrice de kératinase.....	34
III.3.3.Evaluation de l'activité kératinolytique.....	35
III.3.4.Optimisation des conditions de culture pour de la production de kératinases par la souche S14.....	36

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1.Résultats finaux de l'extraction de la kératine.....	38
IV.2.Taux des cires.....	38
IV.3.Taux des minéraux	39
IV.4.Dosage colorimétrique (méthode de Biuret)	40
IV.5.Analyse de la kératine par microscope électronique à balayage (SEM)	40
IV.6.Analyse de la kératine par Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	41
IV.7.L'analyse par diffractométrie de rayons X (DRX).....	43
IV.8. Optimisation des conditions de culture pour la production des kératinases par la souche S14.....	45
CONCLUSION GENERALE	52
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54

ANNEXES

INTRODUCTION GENERALE

Dans le monde, les plumes sont produites en grandes quantités par les usines de transformation de la volaille, atteignant des millions de tonnes par an en tant que déchets [1]. Elles contiennent une teneur très élevée d'environ 90% de protéines kératiniques [2], ces kératines sont biologiquement insolubles, fibreuses, molécules récalcitrantes et biochimiquement rigides et résistantes à la dégradation par les protéolytiques les plus courants enzymes [3], En outre, elles contiennent des résidus de cystéine d'environ 7 à 10% [4], Leur structure est maintenue grâce à une variété d'interactions, telles que les interactions hydrophobes, les liaisons disulfure et les liaisons hydrogène [2].

Le recyclage des plumes est un sujet d'intérêt car il est un complément protéique potentiellement bon marché et alternatif à utiliser chez l'animal. En revanche, le développement des méthodes de traitement enzymatique simples améliore la valeur nutritionnelle des déchets de kératine [1].

Actuellement, les plumes sont dégradées par des traitements physico-chimiques. Ces méthodes sont dangereuses pour l'environnement et détruisent certains acides aminés essentiels comme la méthionine, la lysine et le tryptophane [2]. D'où une approche microbienne et biotechnologique pourrait être une alternative prometteuse et meilleure à la récupération de la kératine et le recyclage des déchets kératiniques par action enzymatique en utilisant une enzyme spécifique produite par un microorganisme, à savoir la kératinase [3].

En utilisant cette enzyme, nous pouvons économiser de l'énergie, d'éviter la pollution de l'environnement et utiliser les déchets de kératine en générant des produits à valeur ajoutée tels que les protéines solubles et les acides aminés. Par conséquent, les microorganismes kératinolytiques sont explorés pour la biodégradation des déchets de kératine, pour sa conversion en produits de valeur tels que les aliments pour animaux, les engrais organiques riches en azote, les acides aminés, peptides, ions ammonium, etc [5].

La kératinase est une enzyme protéolytique spéciale qui peut dégrader la kératine insoluble telle que la laine, les plumes, les cheveux et les ongles [2]. Ces enzymes kératinolytiques sont sécrétées par différents types de microorganismes tels que les bactéries, champignons, levures et actinomycètes, Ils sont majoritairement actifs en présence de kératine substrat, qui attaque les liaisons peptidiques (acides aminés hydrophobes) dans la structure de la kératine pour la convertir en formes simplifiées ainsi libérant des acides aminés libres. Les kératinases microbiennes en raison de leur faible coût, de leur disponibilité facile, et la nature non contaminant ont été utilisées pour diverses applications industrielles [6], telle que les industries des détergents, des cosmétiques, des produits pharmaceutiques, du cuir et des denrées alimentaires et des aliments pour animaux [7].

Dans ce contexte que se situe le présent travail de recherche qui a pour objectifs :

- Une étude théorique par une recherche bibliographique qui cadre le sujet de travail

Le premier chapitre : s'intéresse à l'étude des plumes de volailles comme source de kératine et valorisation ces plumes, et l'étude de la kératine, ainsi que leurs applications.

Le second chapitre : les propriétés des kératinases et leurs applications industrielles.

- Une étude expérimentale se présentant comme suite
- La 1ère étape présente la méthodologie adoptée pour l'extraction et la caractérisation de la kératine des plumes par des analyses physiques, chimiques et biochimique.
- La 2ème étape porte sur le dosage de l'activité kératinolytique de la souche bactérienne S14 productrice de l'enzyme kératinase.
- La 3ème étape est l'optimisation des conditions de culture pour la production de l'enzyme kératinases par la souche bactérienne.

Le mémoire se termine par une conclusion générale qui portera sur une synthèse des différents résultats obtenus et leurs mises en valeur.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

ETUDE DE LA KERATIN

I .1. Production mondiale de la volaille

La volaille contient des protéines animales relativement bon marché, la production de viande de volaille et d'œufs a connu une croissance importante dans le monde. Environ 96 millions de tonnes de volaille sont produites dans le monde chaque année.

Les États-Unis sont actuellement le plus grand producteur mondial de viande de volaille avec 18 % de la production mondiale, suivis par la Chine (15 %), Brésil (11%) et la Fédération de Russie (4%). La Chine est le plus grand pays producteur d'œufs à l'heure actuelle, avec 40 % de la mondiale, en comparaison avec les deuxième et troisième plus grands producteurs, les États-Unis (7 %) et l'Inde (6 %). La production mondiale annuelle de viande de volaille est passée de 9 à 120 millions de tonnes, tandis que la production d'œufs est passée de 15 à 81 millions de tonnes entre 1961 et 2016 [8-9-10].

Tableau 1: Production mondiale de volaille (x1000) tonnes [11-12-13].

Pays/années	2016	2017	2018	2019	2020
États-Unis	21 527	22 001	22298	22 967	22 921
Chine	17 214	15 483	20117	23 516	26 414
Brésil	13 223	13 765	15498	15885	15 980
Russie	4 299	4 334	4543	4529	4 545
Turquie	1 885	1 939	2229	2209	2 145
Union européenne	14 651	14 753	14492	14723	14 900 (y compris l'Angleterre)
Afrique du sud	1 825	1 893	1762	1822	1 891
Inde	3 111	3 329	3616	3873	3 563
Mexique	3173	3 269	3377	3 488	3 564
Le monde	117 217	117 717	127256	133575	136 815

I .2. La production de volaille en Algérie

De toutes les productions animales en Algérie, l'aviculture est la plus intensive, qu'elle soit pour l'œuf de consommation ou pour la viande [14].

En termes de nombre de têtes, l'Algérie compte près de 140 millions de poules et une production de 350.000 tonnes à 400.000 tonnes de viandes blanches et de 6 à 7 milliards d'œufs par an (en 2020) [15].

I .3. Déchets de volailles

Ces plumes sont considérées comme des déchets, par suite différentes approches ont été utilisées pour l'élimination des déchets de plumes, y compris l'enfouissement et l'incinération. Cependant, l'élimination inappropriée de ces déchets biologiques par la mise en décharge contribue à la dégradation de l'environnement et à la transmission de maladies.

Brûler les déchets de volaille, peut en fait produire autant, voire plus d'émissions toxiques dans l'air que les usines de charbon tels que le monoxyde de carbone, d'oxydes d'azote, et de dioxyde de carbone par unité d'énergie produite [16].

I .4. Valorisation des plumes de volaille

Comme les plumes sont inévitablement générées, elles sont des sources renouvelables et durables ne nécessitent pas de ressources supplémentaires. Malgré ces avantages caractéristiques, la plupart des plumes générées sont éliminées comme des déchets, ou dans certains pays, elles sont utilisées pour l'alimentation animale. Cependant, l'utilisation des plumes comme aliments pourrait entraîner des maladies telles que la grippe aviaire. Par conséquent, il est besoin de trouver ou de développer des technologies de valorisation de ces déchets [10-16-17].

I .5. Les plumes

Les plumes sont une substance régulière, renouvelable et naturelle produite en quantité [18]. Elles sont la caractéristique des oiseaux, et d'autres vertébrés et jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et

fonctionnels. Aussi sont riches en azote et en soufre et elles contiennent environ 15 à 18% et 2 à 5% de plumes de poids sec, respectivement [19].

Les plumes ne confèrent pas seulement la capacité de vol, mais ils sont essentiels pour la régulation de la température, la protection, l'isolation, etc... [20].

Contrairement aux kératines de l'épiderme et des cheveux qui naturellement formés des α -kératines. Les kératines de plumes sont formées de la structure β -kératine [21].

I .5.1. Morphologie de la plume

Les plumes appartiennent au groupe des structures kératiniques complexes que l'on trouve chez les vertébrés. La morphologie des plumes qui se caractérisent court de la base (calamus) et l'arbre principal (rachis). Les barbes s'étendent à un angle suivies par des barbules [20].

Le rachis est l'axe solide et focal de la plume auquel sont rattachées les structures auxiliaires, les barbes et les barbules .Bien que ces parties soient différentes, elles contiennent toutes de la kératine [22].

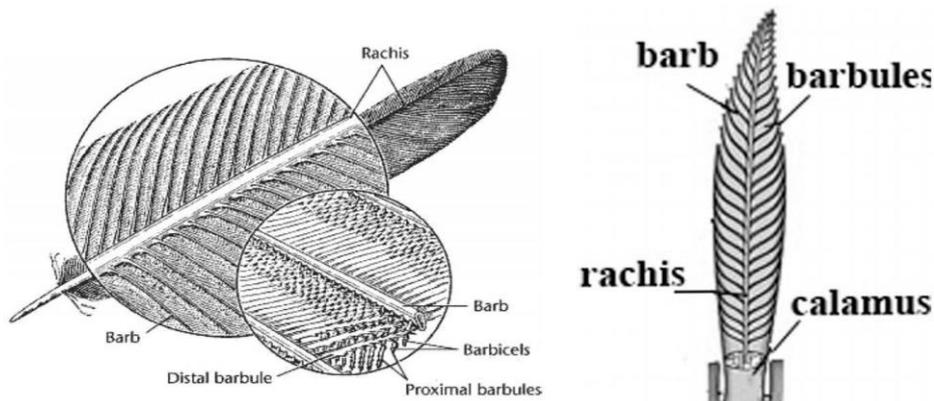
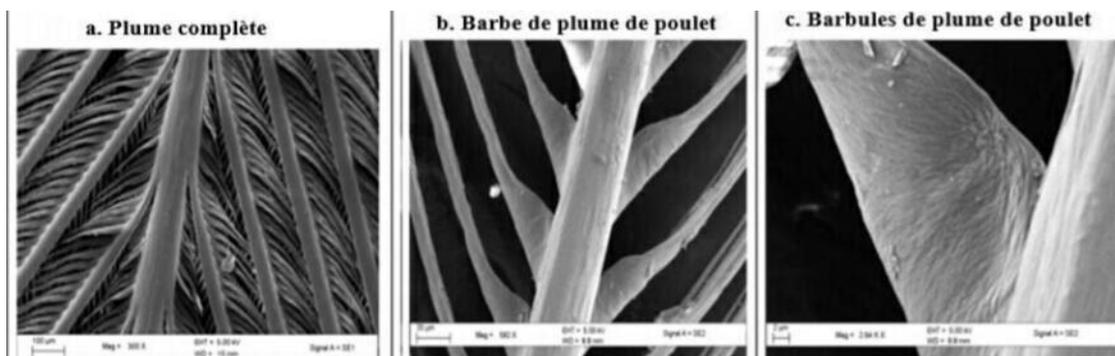


Figure 1 : Structures d'une plume de poulet [16][23].



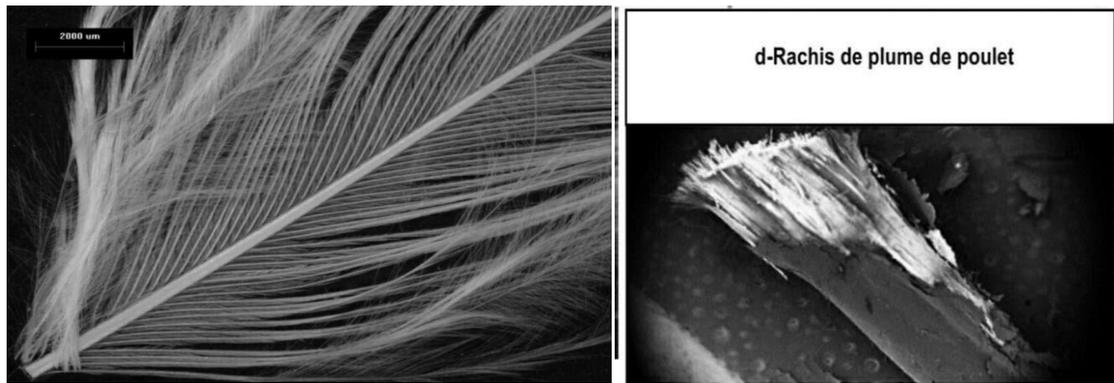


Figure 2: Structures morphologiques des plumes de poulet (barbes de poulet, barbules de poulet, rachis de poulet) [16].

I .5.2.Composition de plumes de volailles

Les plumes de poulet contiennent environ 91% de protéines (kératine), 1% de lipides et 8% d'eau. La succession d'acides aminés d'une plume de poulet est précisément la même que celle des kératines. La séquence d'acides aminés est principalement composée de cystéine, glutamine, proline et sérine, Cependant l'histidine, la lysine, tryptophane, acide glutamique et glycine sont absents. La sérine (16%) est l'acide aminé le plus abondant dans les plumes de poulet [22]. Parmi les éléments traces qu'on trouve dans les plumes, on note : le soufre (2,57%) ; le chlore (0,53%) ; le phosphore (0,34%), le silicium (0,22%) et le calcium (0,10%). Quelques légères différences peuvent exister dans la composition des plumes de divers genres de volaille [20].

I .6.Définition de la kératine

La kératine est une protéine structurelle majeure à haute teneur en soufre [24]. C'est une matière épidermique insoluble, C'est pourquoi elle montre une grande résistance aux attaques chimiques et enzymatiques. Cette résistance est due à sa forte teneur en cystéine, un acide aminé soufré qui est à l'origine de la formation de ponts disulfures (cystéine) qui créent une grande stabilité [25].

Le rôle de la kératine est d'assurer une protection de l'animal (ou de l'homme) contre son environnement naturel [26].

I .6.1. Structure de la kératine

La kératine est un biopolymère complexe d'une structure fibreuse construite à partir d'hélices α (α -kératine) ou des feuilles β plissées (β -kératines) maintenues ensemble par des liaisons hydrogène (H) et des ponts disulfures (S-S) [27].

La présence des liaisons disulfures et hydrogène dans la kératine lui confère une stabilité mécanique, rigidité extraordinaire et résistance à la dégradation par les enzymes protéolytiques [28].

La kératine des plumes de poulet contient plus de certains amino-acides tels que l'alanine, la glycine, la sérine, la valine et la cystéine mais moins pourcentage de lysine, tryptophane et méthionine, et aussi contient de nombreux groupes fonctionnels comme COOH, SH, NH₂ et OH qui sont disponibles sur les chaînes polypeptidiques [29].

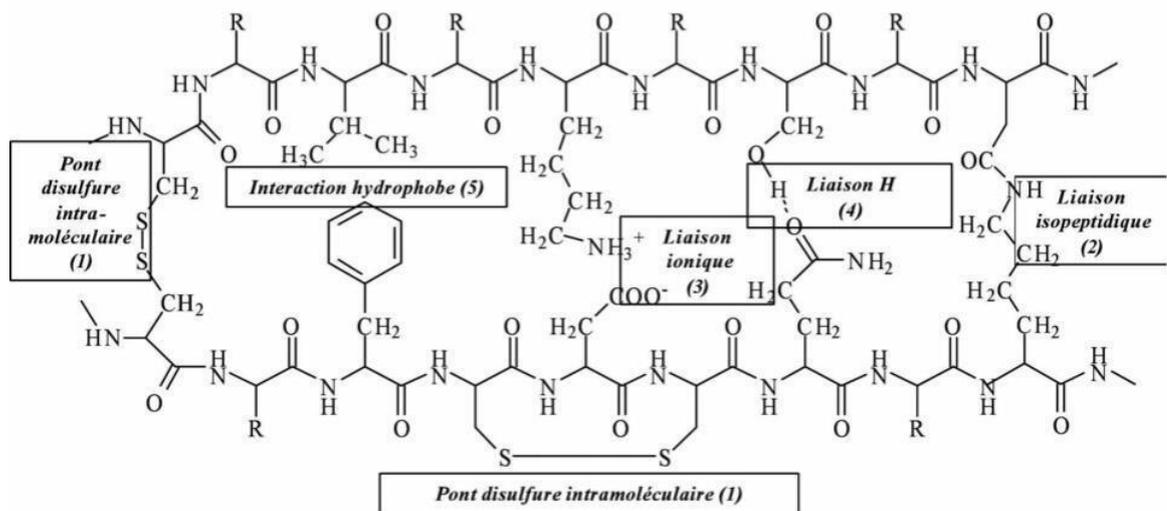


Figure 3: Schéma de la structure de la kératine et les diverses liaisons inter et intramoléculaires (liaisons hydrogènes, ioniques, disulfures) [30].

Les ponts disulfures peuvent se former entre deux groupements cystéine. Il se forme alors le motif dipeptidique appelé cystine.

C'est la forte teneur en cystine dans les fibres kératiniques, impliquant une grande quantité de liaisons covalentes entre les chaînes peptidiques, qui est à l'origine de

la stabilité dimensionnelle de la kératine et donc de son insolubilité dans les solvants. La quantité de cystéine change selon la source de kératine [31-32].

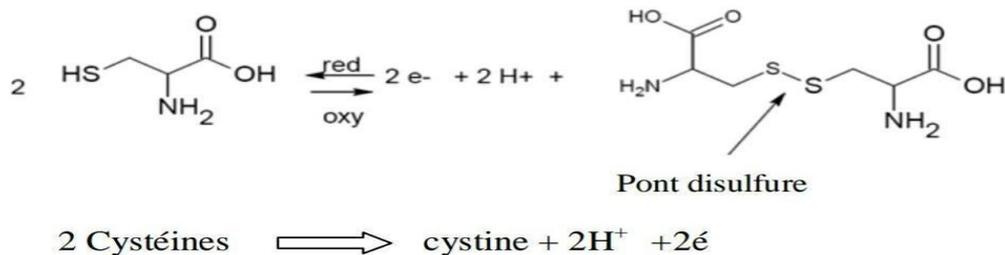


Figure 4: La formation des ponts disulfures [33].

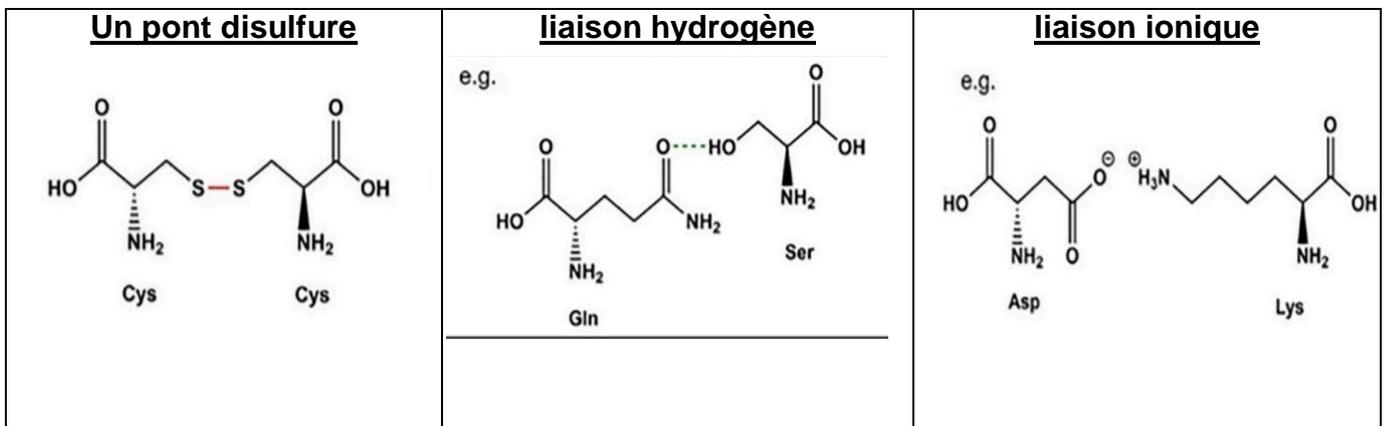


Figure 5: Liens dans les structures kératiniques. Liaisons intrachain, la formation de liaisons disulfure (cystéine-cystéine), de liaisons hydrogène (par exemple glutamine-sérine) et de liaisons ioniques (par exemple acide aspartique-lysine) dans les protéines [25].

I .6.2.Type de kératine

Pour la kératine il y a deux formes structurales différentes, à savoir les alpha (α)-kératines (hélice- α) et les bêta (β)-kératines (structures en feuillets β).

La différence entre la α -kératines et β -kératines est :

- La kératine alpha est présente dans l'épithélium de tous les vertébrés, et dans les parties du corps des animaux et des tissus comme la corne, les sabots, les cheveux, les ongles et la laine. Les kératines alpha ont une grande force, durabilité, résilience et insolubilité.

- La bêta-kératine est une protéine fonctionnelle présente dans les ongles, les griffes, les coquilles et les becs des oiseaux. bêta-kératine a une concentration intense de cystéine qui construit facilement des liens disulfure qui lui confèrent rigidité et résistance à l'oxydation.

I .6.3. Caractéristiques structurelles

I .6.3.1. Structure filament-matrice à l'échelle nanométrique

Les matériaux kératiniques α et β présentent tous les deux une fine structure filamentaire et matricielle à l'échelle nanométrique.

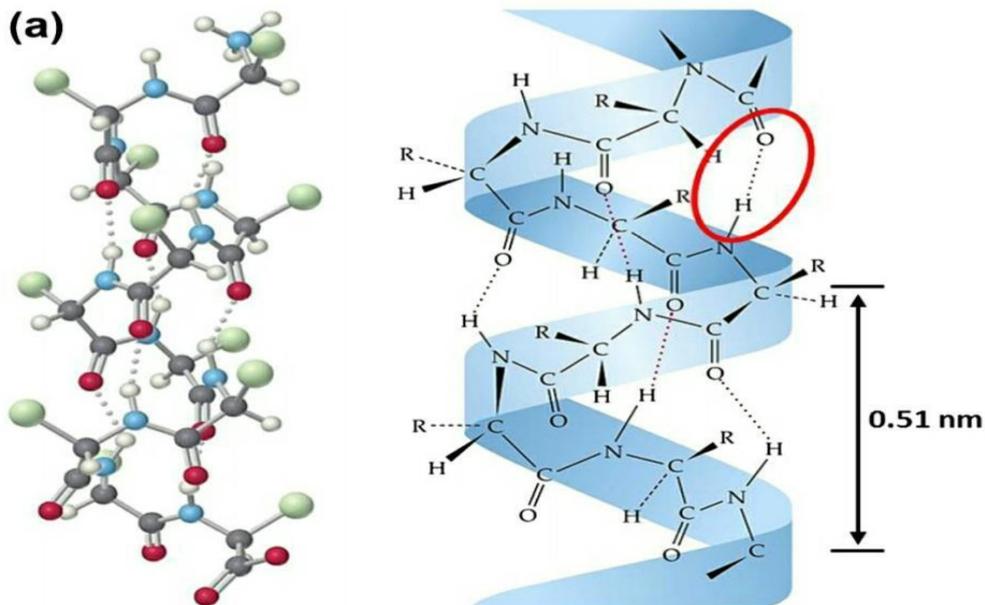
- Les filaments sont des composants ordonnés composés de chaînes polypeptidiques étroitement liées, et sont considérés comme des parties cristallines. Le FI de l' α -kératine et le filament de la bêta-kératine présentent des tailles différentes.
- L' α -kératine possède des protéines constitutives spécialisées : plusieurs types de protéines à faible teneur en soufre composent les FI, tandis que la matrice est constituée de protéines à haute teneur en soufre et en glycine-tyrosine.
- Pour β -kératine, il n'y a pas de types différents de protéines, le filament et la matrice sont incorporés dans une seule protéine, la masse moléculaire de l' α -kératine varie entre 40 et 68 kDa, ce qui est beaucoup plus grande que celle de la β -kératine, 10-22 kDa.
- Le filament pour les kératines α , désigne le "filament intermédiaire (FI)" qui représente la caractéristique structurelle observée par microscopie électronique à transmission et présente une taille intermédiaire (7-10 nm de diamètre). Pour les β -kératines, le "filament" est appelé "filament de bêta-kératine" et a un diamètre de 3-4 nm.

I .6.3.2. Structure moléculaire et formation des filaments

Les différences de structure moléculaire et de formation des filaments sont les caractéristiques les plus importantes qui distinguent les kératines α et β :

➤ La kératine alpha(α)

- Les protéines de l' α -kératine sont organisées comme des bobines enroulées. la structure comme étant constituée de deux chaînes de polypeptides enroulées en hélice.
- Les hélices que l'on trouve dans les protéines sont toutes droites.
- La structure hélicoïdale est stabilisée par les liens d'hydrogène (ligne encadrée en rouge sur la figure 6) à l'intérieur de la chaîne d'hélice, ce qui fait que la chaîne se tord et présente une forme hélicoïdale.
- deux chaînes d'hélices α droites isolées forment une bobine hélicoïdale gauche, le dimère (45 nm de long).
- Les dimères sont associés de bout en bout et rangés côte à côte par des liaisons disulfures afin de former un protofilament (environ 2 nm de diamètre).
- Deux protofilaments s'associent latéralement en une protofibrille ; quatre protofibrilles se combinent en un FI (Filaments intermédiaires) circulaire ou hélicoïdal d'un diamètre de 7 nm avec des liaisons disulfure [24-26].



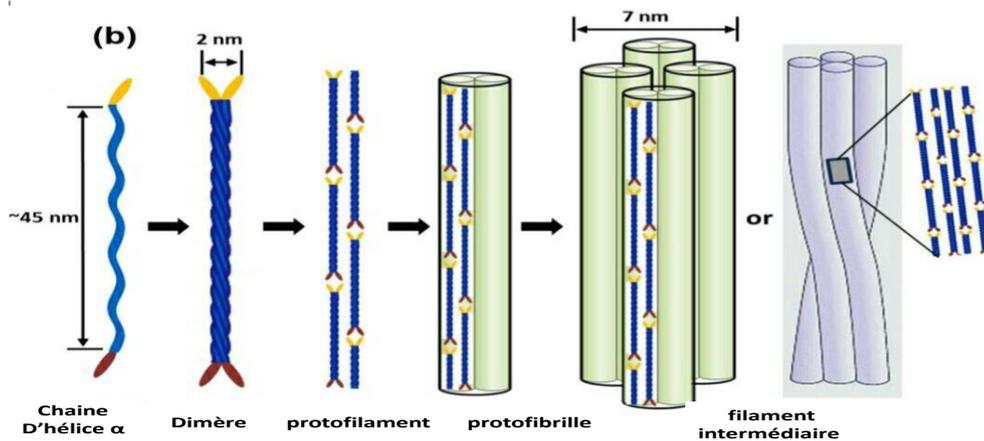


Figure 6 : La structure des FI de la kératine α

(a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique,
 (b) : dessin schématique de la formation des filaments intermédiaires [26]

➤ **La β -kératine**

La feuille plissée se compose de β -brins emballés latéralement qui peuvent être parallèles ou antiparallèles (plus stables), et les chaînes sont maintenues ensemble par des liaisons hydrogènes intermoléculaires (ligne encerclée en rouge dans la figure 7).

- structure en feuille plissée est stabilisée par deux facteurs : les liaisons hydrogènes entre les brins bêta contribuent à former un feuillet et la planéité de la liaison peptidique force un feuillet β à être plissé.
- région centrale d'une chaîne polypeptidique se plie pour former quatre brins bêta latéraux qui se lient ensuite par liaison hydrogène, ce qui donne une feuille plissée.
- Deux feuilles plissées sont reliées par un diadème horizontal, se superposent et prennent deux sens opposés, formant le filament d'un diamètre de 4 nm (une longueur de pas de 9,5 nm et quatre tours par unité).
- Les parties terminales des chaînes peptidiques s'enroulent autour des filaments de β -kératine et forment la matrice.
- Les kératines peuvent être considérées comme un composite polymère de filaments cristallins noyés dans une matrice amorphe [24-26].

I .6.4. Quelque ressources en déchets kératiniques

Les kératines sont divisées en deux catégories de kératines épithéliales et les kératines trichocytaires :

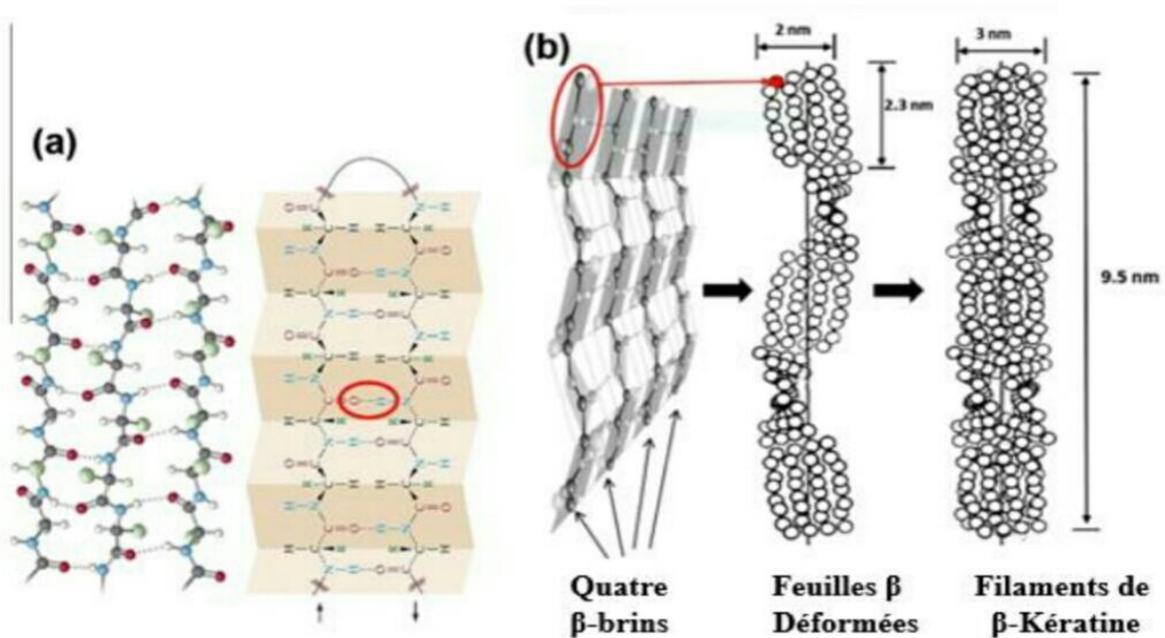


Figure 7: Structure des filaments β -kératine : (a) : un modèle boule et bâton de la chaîne polypeptidique, et illustration du feuillage plissé β . (b) : dessin schématique de la formation des filaments β -kératines [26].

➤ **Kératine épithéliale**

Egalement appelée kératine molle (une faible teneur en soufre ~1%). Elle se trouve dans la couche cornée de la peau et a une faible teneur en cystéine (<3%). La kératine molle stabilise les cellules de l'épithélium.

➤ **Kératine trichocytaire**

Egalement appelée kératine dure (une teneur élevée en soufre ~ 5%). Elle se trouve dans les structures liées à l'épiderme telles que la laine, les poils, les plumes, et les ongles ainsi que les cornes et les sabots des mammifères, des

reptiles et des oiseaux. Elle contient une teneur élevée en cystéine (4–17%) et faible en glycine. Contrairement à la kératine molle, la kératine dure possède une durabilité et une résistance structurelles et agisse comme échafaudage structurel [34].

I .6.4.1. La kératine des plumes

Les plumes contiennent plus de 90% de protéines kératiniques et sont probablement les protéines les plus abondantes et les moins coûteuses disponibles, et les moins chères du marché. Les plumes sont composées de trois parties : l'axe central (rachis), le calame et les barbes/barbules, qui contiennent principalement de la bêta-kératine (10-30 kDa) et quelques structures en hélice alpha.

La kératine des plumes sont polypeptides d'approximativement 100 acides aminés, avec un poids moléculaire 10.4 kDa, les α -kératines sont comparativement beaucoup plus lourdes (56.5 à 60 kDa).

La kératine des plumes diffère également de la kératine de la laine par sa teneur en cystéine, Plumes contiennent ~7% et la laine 11-17% de cystéine [35-21].

I .6.4.2. La kératine de la laine

La structure de la fibre de laine est extrêmement complexe et contient environ 82 % de protéines kératiniques riches en cystéine, environ 17% de protéines non kératiniques à faible teneur en cystéine situées dans la membrane cellulaire, et environ 1% de composés de lipides cireux et d'une petite quantité de polysaccharides [34-36].

En général, la laine et les cheveux humains présentent de nombreuses caractéristiques similaires. Néanmoins, la laine a un diamètre remarquablement plus petit que les cheveux humains (20 μm contre 80 μm) et d'une longueur pouvant aller jusqu'à 20 cm [36].

I . 7. Biochimie des α - et β -kératines

I .7.1. Composition en acides aminés

La kératine des plumes de po ulet contient plus de certains amino-acides tels que l'alanine, la glycine, la sérine, la valine et la cystéine mais moins pourcentage de lysine, tryptophane et méthionine (Tableau 2) [37].

I .7.2. La Solubilité

Les kératines sont naturellement insolubles en raison des liaisons disulfures intermoléculaires et insolubles dans tous les solvants comme l'eau, les acides et bases faibles, ainsi que dans les solvants polaires. La kératine reste cependant réactive, car les unités de cystéine peuvent être réduit, oxydé et hydrolysé [34]. est possible de protéine de la kératine est soluble dans des solutions contenant des agents dénaturants, comme l'urée [38].

Tableau 2: Composition en acides aminés des matières kératiniques, représentatives d' α et β - kératine [26]

acides aminés	Laine (représentant- α kératine)	rachis de plumes (représentant la β -kératine)
Alanine	5.5	8.7
Arginine	6.6	3.8
Acide aspartique (l'asparagine)	6.5	5.6
Cystéine	11.4	7.8
Acide glutamique (glutamine)	11.3	6.9
Glycine	8.8	13.7
Histidine	0.8	0.2
Isoleucine	3.4	3.2
Leucine	7.8	8.3
Lysine	3.0	0.6
Méthionine	0.5	0.1
Phénylalanine	2.5	3.1
Proline	6.0	9.8
Sérine	9.6	14.1
Thréonine	6.1	4.1
Tyrosine	4.1	1.4
Valine	5.9	7.8
Tryptophane		0.7

I .8. Propriétés de la kératine

I .8.1. Le comportement vis-à-vis à l'humidité

Les fibres de la kératine sont hygroscopiques, néanmoins elles présentent un caractère hydrophobe prononcé en surface. Ce comportement est important pour l'utilisation de la laine au niveau de l'habillement, due au fait que l'intérieur de la fibre adsorbe la vapeur d'eau, alors que l'eau liquide est repoussée par la surface extérieure hydrophobe de la cuticule [21]. Les fibres de plumes peuvent être utilisées comme renforts dans les résines hydrophiles et hydrophobes. En effet, environ 40 % des 95 acides aminés de la kératine sont hydrophiles et les 60% restants sont hydrophobes [37].

I .8.2 .Propriété diélectrique

Les matières textiles telles que les tissus et les fils sont essentiellement des assemblages de fibres, Les fibres sont généralement fait de polymères. La conductivité électrique de la plupart de ces polymères est si faible qu'ils sont généralement considérés comme des isolants.

Les polymères forment un segment important de tous diélectriques, Par exemple, les polymères sont largement utilisés comme isolants dans les fils et les câbles [39]. La kératine est un matériau isolant qui piège facilement l'électricité statique. Des propriétés diélectriques du ce biopolymère ont été reliées avec ces propriétés mécaniques et thermiques. Elle a une tendance à développer de la charge statique une fois frottée avec différent matériaux, la peau humaine, le plastique, etc...[21].

I .9. Les méthodes Extraction de la kératine

Les méthodes couramment utilisées pour l'extraction de la kératine à partir de matériaux riches en kératine sont les suivantes sont la réduction, l'extraction par les alcalis, et l'utilisation de liquides ioniques... [40].

I .9.1. Méthode de réduction

Les procédés de réduction sont généralement utilisés pour l'extraction de la kératine en raison de leur grande efficacité. La fonction des agents réducteurs est

de diminuer la stabilité des fibres de kératine en dissociant les liaisons disulfures, les liaisons hydrogènes [41]. Plusieurs agents réducteurs dans diverses conditions de traitement, c'est-à-dire en présence d'agents de dénaturation des protéines ont permis d'obtenir des résultats positifs [42].

La kératine a été extraite de différents segments de plumes de poulet jetables, y compris les plumes entières plumes, calamus/rachis (feuille β) et barbes/barbules (hélice α), en utilisant du sulfure de sodium et de la L-cystéine. Le rendement de la kératine extraite du sulfure de sodium et de la L-cystéine était de $\sim 88\%$ et $\sim 66\%$ respectivement. Le rapport de masse entre plumes à l'agent réducteur était de 1:20 et la température de réaction était de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 6 h [41].

Dans une autre approche d'extraction de la kératine, les plumes ont été immergées dans une solution de 150 mL contenant de l'urée (0,33 mol/L), SDS (0,05 mol/L), 2-mercaptoethanol (0,085 mol/L), et un tampon tris. Le mélange a été chauffé à 70°C pendant 2 h sous atmosphère d'azote. Un rendement considérablement élevé de 93% de kératine a été obtenu en utilisant cette approche. La kératine extraite contenait de l'alanine (29,5 %), cystéine (14,4 %), proline (10,1 %) et sérine (7,0 %) comme composants principaux. Une analyse plus approfondie de l'analyse a montré que les acides aminés hydrophobes représentaient environ 61 % et les acides aminés hydrophiles 39 % [43].

I .9.2. L'hydrolyse alcaline

Une quantité élevée réactifs alcalins utilisés pendant le processus et l'endommagement de la structure de la chaîne polypeptidique de la kératine sont deux inconvénients majeurs associés à cette méthode. Pour l'extraction de la kératine, la quantité requise de NaOH peut être réduite.

Pendant tout le processus d'extraction, il est très important de préserver les principaux acides aminés tels que la cystéine car ils peuvent être facilement décomposés en présence d'alcalis forts. Les plumes avec une solution de NaOH 0,1 N pendant 15 minutes à 90°C et a constaté que la composition en acides aminés du produit final était différente de la composition standard des plumes non traitées [40].

I .9.3. Sulfitolyse

La sulfitolyse est une méthode d'addition de SO_3 à des groupes soufrés sur des protéines telles que les kératines de façon à couper et empêcher la formation de liaisons disulfure. C'est à dire clivage des liaisons disulfures par les ions sulfites (sulfite : SO_3^{2-} ; bisulfite : HSO_3^- et disulfite : $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$), peuvent tous être impliqués dans la réaction de sulfitolyse.

La sulfitolyse n'est généralement pas complète. Cependant, en présence d'urée et de SDS, toutes les liaisons disulfures peuvent être coupées ce qui améliore le rendement de l'extraction. Les ions sulfites (SO_3^{2-}) réagissent avec la cystine plus rapidement que les bisulfites (HSO_3^-), et leur concentration augmente avec l'augmentation le pH, donc des taux plus élevés de sulfitolyse sont atteints en augmentant le pH [44][35].

Un rendement de 62 % a été obtenu en utilisant la méthode de sulfitolyse pour extraire la kératine des plumes dans les conditions suivantes : les plumes ont été mélangées avec du sulfate de sodium (10g/L) en présence du gaz N_2 , puis incubées pendant 24h à 30 °C dans un agitateur-incubateur réglé à une vitesse de 130 tr/min [40].

I .10. Applications industrielles de la kératine

La kératine est une protéine fibreuse résistante et peut être modifié et développé sous diverses formes telles que des gels, des films, et des nano – microparticules, il représente une source importante de matière première renouvelable et durable pour de nombreuses applications.

On utilise la kératine à de nombreuses applications dans la chimie verte, agroalimentaire, biomédicale et cosmétique, ainsi que dans le domaine de la santé, pharmaceutique, et les matériaux composites [41].

I .10.1. La kératine en films

Les couches minces d'un composant présentant une grande flexibilité et une couverture massive sont appelées films. La solution de kératine peut s'auto-

assembler pour former un film mince et être utile pour l'administration de médicaments.

Bien que les films de kératine pure soient trop fragiles pour une utilisation pratique, l'ajout de glycérol permet d'obtenir un film transparent, relativement solide, flexible et biodégradable.

Le chitosane est une molécule qui possède une biocompatibilité et une fonction biologique supérieures dans la cicatrisation des plaies et présente une activité antibactérienne. L'ajoute de chitosane dans les films de kératine a permis d'améliorer la résistance mécanique. En outre, les films de chitosane et de kératine ont également démontré des propriétés antibactériennes [24][45].

I .10.2. L'industrie cosmétique

Les composés de kératine peuvent être utilisés pour la peau et les cheveux humains comme cosmétique. Elle est ajoutée sous forme de mélange cosmétique avec d'autres polymères naturels comme le chitosane, le collagène...

- La kératine hydrolysée est utilisée comme un ingrédient cosmétique qui améliore l'hydratation et la souplesse de la peau.
- La kératine est un ingrédient essentiel des shampooings et des après-shampooings, des produits de et d'autres produits utilisés comme accessoires capillaires.
- La kératine est également utilisée comme tonique pour une rétention uniforme de la couleur des cheveux. Les protéines sont ajoutées dans les produits de soins capillaires pour réparer les cheveux endommagés [24].

I .10.3. La kératine comme biofertilisant

Des engrais organiques ont été préparés par la solution d'acides aminés liés au soufre comme stimulateurs de croissance pour les plantes. La laine de mouton représente un matériau biodégradable 100 % naturel qui ne produit pas de substances toxiques ou de polluants dans le sol ou dans les environs. Elle est donc considérée comme un engrais naturel [24].

La kératine est une bonne source d'azote utilisée pour préparer les engrais. Les bactéries et les champignons produisent des enzymes kératinolytiques qui aident à dégrader la biomasse résiduelle de la kératine [46].

CHAPITRE II

LES ENZYMES KERATINOLYTIQUES

II . L'enzyme de kératinase

II . 1. Définition des kératinases

Les protéases kératinolytiques, nommées aussi les kératinases, représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et des applications dans différents secteurs, Les kératinases (EC 3.4.21/24/99,11) sont un groupe des sérines ou Métalloprotéases ayant la capacité d'hydrolyser la kératine par réduction des liaisons disulfures et la protéolyse [47]. Il s'agit généralement d'une enzyme extracellulaire sécrétée par divers micro-organismes dans un milieu contenant de la kératine [48].

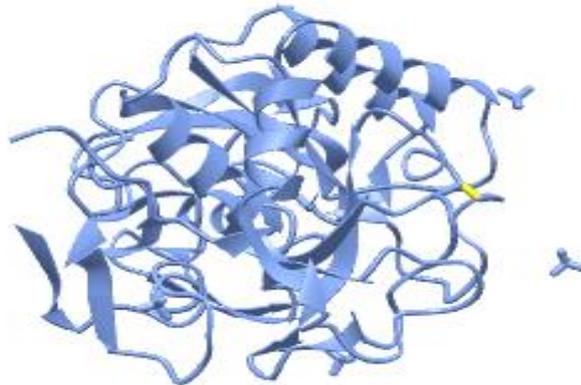


Figure 8: Structure 3D en rubon des kératinase complexe [49].

II .2. Mode d'action de kératinase

Les kératinases attaquent principalement les liaisons disulfures du substrat kératinique par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne en définitive une accumulation de sulfocystéine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (**Figure 9**) [50]. Un schéma de la division de la cystéine par les sulfites (sulfitolyse) peut être présenté comme suit :

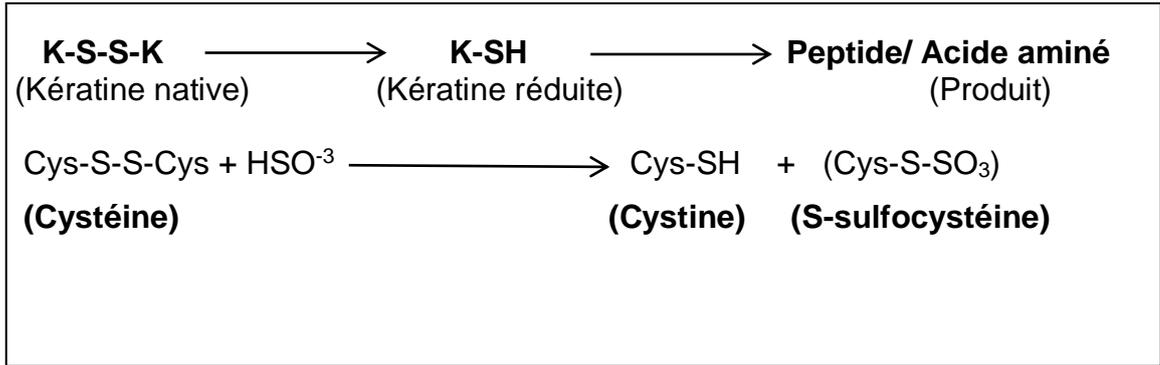


Figure 9: Schéma représentant le mode d'action des kératinase sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures [51].

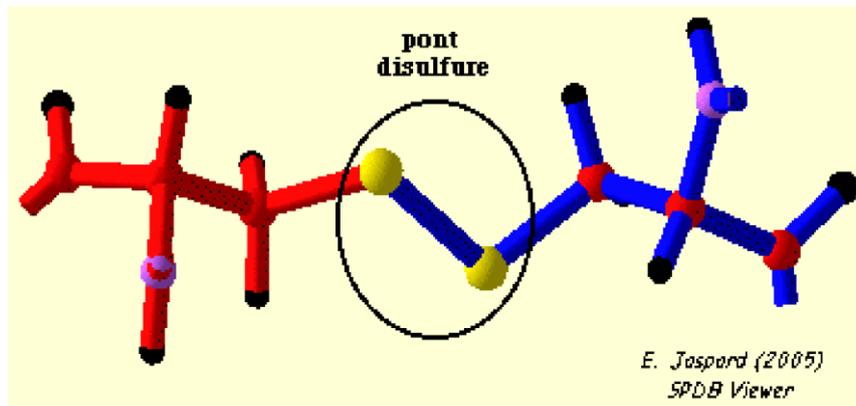


Figure 10: Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de Cystéines [52].

II .3. Le mécanisme de la dégradation de kératine par le kératinase

Les kératinases microbiennes, sont largement produites sur milieu contenant un substrat kératinique comme seule source de carbone et d'azote, Le processus de dégradation de la kératine comprend deux processus majeurs: la sulfitolysse ou réduction des liaisons disulfure suivi d'une protéolyse.

La Sulfitolysse se fait en présence de composés réducteurs comme le sulfure de sodium, le dithiothréitol (DTT), le mercaptoéthanol, glutathion, cystéine, acide thioglycolique ou disulfure réductases, qui agissent en coopération avec les kératinases dans la dégradation de molécules de kératine [47].

II .4.Source microbiennes de kératinase

Un groupe de micro-organismes a été trouvé dans différents environnements écologiques, tels que les bactéries, les actinomycètes, les champignons saprophytes et les dermatophytes. Ces micro-organismes peuvent produire de la kératinase et décomposer les déchets de kératine [53].

II .4.1. Bactéries kératinolytiques

La dégradation de la kératine chez les bactéries Gram-positives est plus abondante des genres *Bacillus*, *Kocuria*, *Lysobacter*, et diverses souches de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, et *Bacillus subtilis*, elles sont considérées comme kératinolytiques. Il y a aussi certains genres de Gram-négatifs à savoir: *Vibrio*, *Xanthomonas*, *Thermoanaerobacter*, *Stenotrophomonas* et *Chryseobacterium*, qui ont été décrites comme des producteurs de kératinase. Par ailleurs les thermophiles et les extrémophiles des représentants des genres *Fervidobacterium*, *Thermoanaerobacter* et *Bacillus* sont aussi disponibles [47].

II .4.2.Moisissures kératinolytiques

Il a été rapporté que les champignons kératinolytiques sont des décanteurs naturels des substrats kératiniques et jouent un rôle majeur dans l'hydrolyse des tissus kératinisés à savoir : *Paecilomyces*, *Doratomyces*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Onygena*, *Microsporum*, *Lichtheimia*, *Chrysosporium*, *Aphanoascus*, *Trichophyton*, et *Scopulariopsis* parmi les champignons kératinolytiques signalés.

Par ailleurs, Parmi les souches fongiques, l'activité kératinolytique a été largement rapportée dans la gamme des dermatophytes. Les propriétés kératinolytiques de ce groupe peuvent représenter une tendance pathogène et sont liées aux maladies fongiques cutanées des humains et des animaux [51].

II .5.Conditions physico-chimique optimales des kératinases

Les enzymes produites par les micro-organismes sont considérées comme des biocatalyseurs potentiels pour un grand nombre de réactions. Ces enzymes dérivées de micro-organismes sont généralement considérées comme sûres et

peuvent fonctionner dans une large gamme de températures, de valeurs de pH ou d'autres conditions extrêmes.

II .5.1. PH et température

Les kératinases fonctionnent généralement à des pH neutres à alcalins, avec des valeurs optimales entre pH (7,0 à 9,0). En effet, la plus faible valeur de pH 4 a été observée dans le cas de *Streptomyces pactum* DSM40530, et la plus élevée pH 13 chez *Bacillus halodurans* AH-101. La température optimale d'activité des kératinases microbiennes varie de 37 à 65°C [54], de plus les kératinases de *Chysosporium keratinophilum* et *Fervidobacterium islandicum* A W-1 présentent respectivement des températures optimales exceptionnelles qui a atteint 90 et 100°C avec une demi-vie de 30 à 90min respectivement [47].

II .5.2. Poids moléculaire

Les kératinases sont regroupées en sérine et métallopeptidases ou protéases Ce sont principalement extracellulaire avec un poids moléculaire varie de 18 à 200 kDa. La kératinase la plus petite de taille 18 kDa est produite par SK1-02 de *Streptomyces albidoflavus*, et la plus grande de taille 200 kDa est produite par de *Kocuria rosea* et *Fervidobacterium islandicum*, cependant le poids moléculaire peut atteindre 440 kDa dans le cas des champignons pathogènes [55].

II .5.3.Substrats spécifiques

Les Kératinases ont une large gamme de spécificité du substrat telle qu'elle peut se dégrader complète les protéines complexes et solubles comme la caséine, l'albumine sérique bovine (BSA), la gélatine, tandis que se lier aux substrats complexes et insolubles comme plumes, laine, soie, collagène, élastine, cornes, cornée stratique, cheveux, azokeratin et ongles [47].

II .6. Propriété physico-chimiques des kératinases

Les propriétés physicochimiques des kératinases dépendent de certaines de ces propriétés, y compris le pH optimal de température, poids moléculaire, spécificité du substrat des kératinases (**tableau 3**).

Tableau 3: propriétés biochimiques de certaines kératinases microbiennes Sélectionnées [54].

microorganisme	Poids moléculaire(KDa)	PH optimale	Température optimale (C°)
Bacillus licheniformis ER-15	58	11	70
Streptomyces sp.AB1	29	11,5	75
Doratomyces microspores	33	8-9	50
Microbacterium sp. kr10	42	7,5	50
Meiothermus taiwanensis WR-220	65	10	30
Bacillus sp. AD-W	39	10	50
Brevibacillus parabrevis	28	8	60
Bacillus subtilis SCK6	60	10	30.95
Bacillus amyloliquefaciens S13	28	6.5	50
Actinomadura keratinolytica Cpt29	29.23	10	70
Aspergillus fumigatus TKF1	24.3	6	50

II .7. Applications de kératinase en biotechnologie

Les kératinases fonctionnent comme de nouveaux biocatalyseurs qui ont de nombreuses applications dans plusieurs secteurs industrielles telles que dans les industries alimentaires animales, industrie des engrais, détergents, de la tannerie et l'industrie pharmaceutique [47].

II .7.1. Industrie du cuir

Une série d'opérations sont impliquées dans le traitement conventionnel du cuir, telles que le durcissement, le trempage, l'épilation, le bating et le bronzage qui implique des produits chimiques dangereux comme le chrome, oxyde de calcium et sulfure de sodium [56].

Afin d'améliorer la qualité du cuir et de réduire sa toxicité pour l'environnement, des méthodes enzymatiques doivent être utilisées pour remplacer les méthodes conventionnelles de traitement du cuir afin de fournir des alternatives meilleures, plus sûres et plus respectueuses de l'environnement, évitant ainsi l'utilisation de produits chimiques nocifs [56].

II .7.2. Détergent

Les enzymes protéolytiques avec des utilisations biotechnologiques intéressantes. En effet, elles peuvent être développées dans divers domaines, dans ce cas, détergent. Environ 89% des enzymes protéolytiques détergents sont des protéases alcalines [47]. De plus, les kératinases sont utilisées dans les détergents comme additif pour le nettoyage des canalisations bouchées par des déchets kératiniques [57].

Les kératinases peuvent également contribuer à l'élimination des cols kératiniques qui sont souvent rencontrés, tels que les colliers des chemises, sur lesquels la plupart des protéases n'agissent pas [47].

II .7.3. Dégradation des prions avec des kératinases

Les prions sont des particules de protéines qui sont responsables de maladies neurodégénératives, appelées encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) [58]. Ces matières biologiques transférables évoluent en polluants environnementaux, qui sont rejetés dans l'environnement de nombreuses manières, telles que l'élimination des décès, des fluides corporels et des eaux usées polluées par des hôpitaux, les abattoirs et les installations de recherche. Il s'accumule par l'ingestion de viande et le retraitement des déchets (par exemple, farine d'os d'animaux infectés) [59].

II .7.4. Traitement des déchets kératiniques

II .7.4.1. Elimination des déchets kératiniques

Des millions de tonnes de plumes produites chaque année par l'industrie de volaille, qui conduit à la pollution de l'environnement et le gaspillage d'une réserve riche en protéines. En raison de la structure fibreuse et insoluble et fortement réticulée par des liaisons disulfure, de l'hydrogène et des liaisons hydrophobes de la β -kératine, les plumes sont résistants à la dégradation par les protéases microbiennes communes, à savoir : la trypsine, la pepsine et la papaïne. De plus, l'utilisation des kératinases dans l'élimination de la pollution causée par les déchets des plumes est remarquable [60-61].

II 7.4.2. Farine de plume pour alimentation animale

Le traitement hydrothermal des plumes à haute température et pression et utilisée comme additif alimentaire pour les animaux sous forme de farine de plumes. Sont des coûteux élevés et conduit à la destruction de certains acides aminés essentiels, à savoir : la méthionine, la lysine et le tryptophane, ce qui donne un produit de faible digestibilité avec une valeur nutritionnelle variable [62]. En raison des multiples du traitement des plumes à haute température, l'utilisation des kératinases microbiennes comme alternatives intéressantes pour l'hydrolyse des déchets de plumes et la production de farine de plumes très riche en nutriments (riche en cystéine, la valine, thréonine) est relativement peu coûteuse [60].

II .7.4.3. Farine de plume comme fertilisant

L'agriculture biologique repose sur l'utilisation de l'azote organique riche qui sert à améliorer la croissance des plantes et augmenter l'activité microbienne dans le sol. Parmi les engrais azotés traditionnels, le guano qui a été largement utilisé. La farine de plumes, riche en azote (15 % de N), présente une source peu coûteuse et facilement disponible, Non seulement elle fournit de l'azote aux plantes et favorise l'activité microbienne, mais structure aussi le sol et augmente la capacité de sol de rétention d'eau [63].

II .7.5. D'autres applications

Autres applications potentielles de kératinases c'est l'utilisation dans la digestion anaérobie des déchets de volailles pour produire du gaz naturel utilisé comme carburant [64], aussi pour les Modification de la structure de base des fibres de la soie et de la laine [57]. En médecine et en pharmacie elles sont employées pour éliminer des acnés ou le psoriasis, éliminer les cals humaines pour la préparation des vaccins contre les dermatophytoses et des additifs dans les agents pour éclaircir la peau car ils stimulent la dégradation de la kératine [65].

ETUDE EXPERIMENTALE

L'objectif de cette partie est de savoir comment extraire et purifier la kératine et de connaître les méthodes permettant de caractériser cette protéine chimiquement et physiquement.

Procédé d'extraction de la kératine :

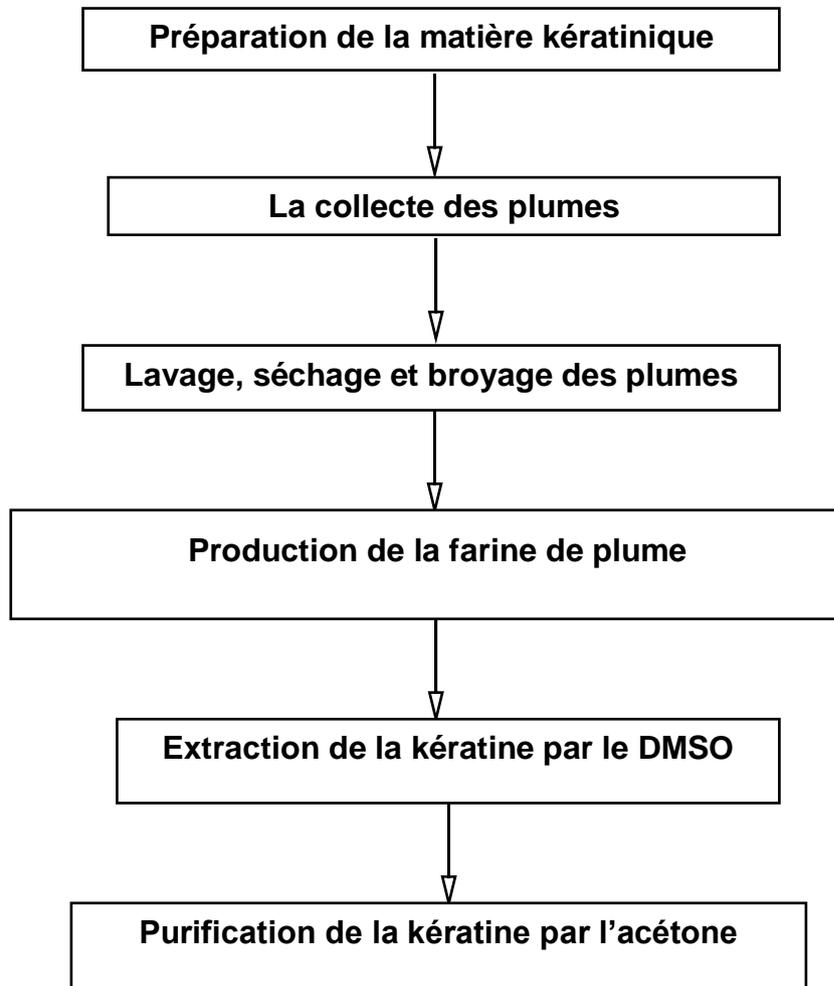


Figure 11 : Diagramme montrant les étapes d'extraction et de purification de kératine.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Préparation de la matière kératinique

III.1.1. Les plumes de poulets

Les plumes sont collectées à partir d'abattoir situé dans la région de Blida.



Figure 12: Plumes de volaille

- Les plumes ont été lavées au détergent, rincées à l'eau en abondance et séchées à l'air libre.
- Les plumes séchées subissent un deuxième séchage dans une étuve chauffée à 170 °C pendant 2h.
- Ensuite nous avons séparé les fibres du rachis à l'aide d'une paire de ciseaux. Ces fibres ont été coupées plusieurs fois à une longueur moyenne de 5 mm.
- Broyer à l'aide d'un broyeur et tamiser pour éliminer les grosses particules et avoir une farine homogène de diamètre 200 micro mètre.



Figure 13: Farine des plumes

III.1.2. Extraction et purification de la kératine

L'obtention des extraits de kératine contenant de la kératine native est difficile dans la pratique en raison de l'insolubilité de la protéine dans des solutions qui ne provoquent pas d'effets indésirables. Une méthode de solubilisation de la kératine a été développée en utilisant des solvants organiques, par exemple: diméthylsulfoxyde (DMSO).

Pour le DMSO, il faut précipiter les protéines dissoutes avec de l'acétone. Cette procédure ne modifie pas la structure des protéines et est souvent utilisée par de nombreux chercheurs à l'échelle du laboratoire pour obtenir un substrat permettant de déterminer de l'activité kératinolytique [66].

III.1.3.Solubilisation de la kératine

Dans un ballon de 1L on met 5 g de la farine de plumes (ou les plumes de poulet) dissoute dans 250 mL de DMSO. Ensuite le mélange est chauffé dans un rota vapeur à 80 °C pendant 4h après filtration sous vide pendant 20 min jusqu'à 30 min (**Annexe VIII**).

III.1.4.Précipitation de substrat

Pour notre essai, l'azote liquide n'était pas disponible au laboratoire, c'est pourquoi on a utilisé autre méthode pour précipiter le kératine qui s'agit d'ajouter à ce dernier l'acétone (500 mL) déjà refroidi à 4°C et mettre la solution dans un réfrigérateur à 4°C pendant 72 heures (3 jours) (**Annexe VIII**).

III.1.5. Concentration et récupération du substrat

Le précipité est récupéré par filtration sous vide pendant 20 min, puis lavé deux fois avec l'eau distillée et séché à 50°C jusqu'à l'obtention d'une poudre et ensuite conservée à une température ambiante jusqu'à l'analyse (**Annexe VIII**).

III.1.6. Dissolution de la kératine

Un (1g) de la poudre est dissoute dans 20 mL de NaOH (0,05 M). Le pH est ajusté à 8 par une solution de HCl (1N), puis la solution est diluée à 200 mL avec du tampon Tris-HCl (0,05 M), puis le pH est ajusté à 8 (**Annexe VI**).

III.2. Caractérisation de la kératine

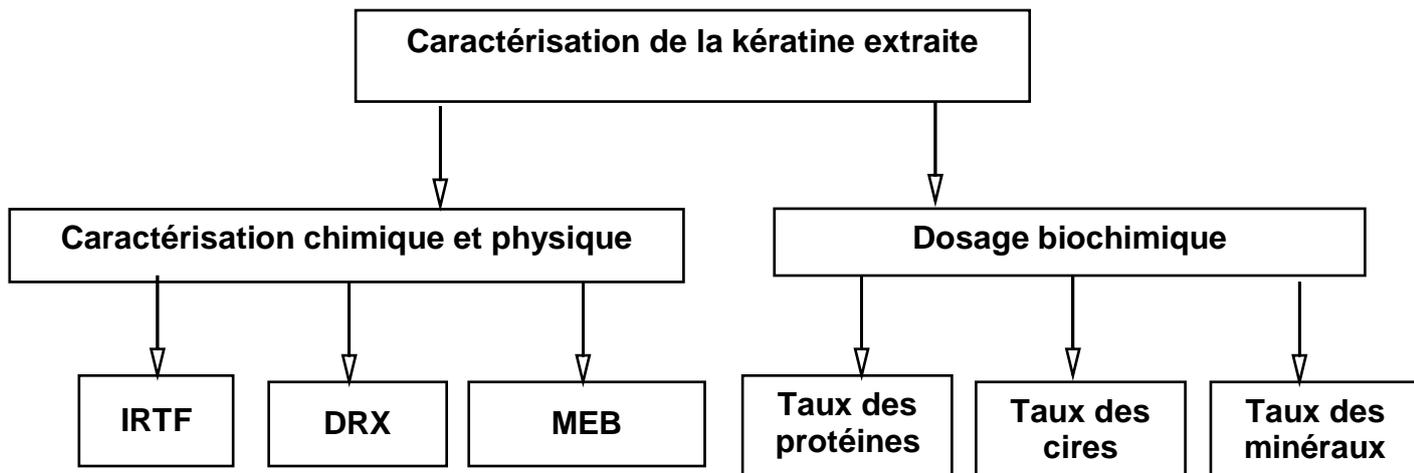


Figure 14 : Caractérisation de la kératine

III.2.1. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

SEM (Scanning Electron Microscope) ou microscope électronique à balayage est une technique d'imagerie de surface à haute résolution et à fort grossissement d'un échantillon en balayant sa surface avec un faisceau d'électrons focalisé. Le MEB peut mesurer jusqu'à 1nm et peut grossir jusqu'à 400 000. Lorsque la source d'excitation frappe l'échantillon, elle produit divers signaux, appelés signaux diffusés, que le microscope électronique à balayage tente de capter et de traduire en une image.

Le faisceau d'électrons chargé négativement interagit avec le matériau et produit différents signaux qui reflètent les détails topographiques et la structure atomique de la surface de l'échantillon [67].

III.2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

L'IRTF est une technique non destructive capable d'identifier des groupes fonctionnels organiques et souvent des composés organiques spécifiques disponibles pour l'identification des composés.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) fournit des informations spécifiques sur les liaisons chimiques et les structures moléculaires des composés organiques et de certains matériaux inorganiques, elle est

particulièrement utile pour l'identification de composés inconnus lorsque des spectres IR de référence sont disponibles.

Lorsqu'elles sont exposées à un rayonnement infrarouge les liaisons chimiques vibrent à des fréquences caractéristiques dans le régime IR et elles absorbent le rayonnement à des fréquences qui correspondent à leurs modes de vibration. En mesurant le rayonnement absorbé en fonction de la fréquence, On obtient un spectre qui peut être utilisé pour identifier les groupes fonctionnels et les composés [68].

III.2.3. Diffraction des rayons X

Est une technique analytique pour d'identifier les phases cristallines en présence dans le matériau et de déterminer leurs caractéristiques cristallographiques [69].

Les méthodes de XRD sont les plus efficaces pour déterminer la structure cristalline de matériaux d'origines diverses, les rayons X ne peuvent être diffractés que par des structures de dimensions atomiques Dans les structures cristallines, les centres de dispersion (atomes ou groupes d'atomes) sont espacés périodiquement à des distances fixes et sont considérés comme des réseaux de diffraction tridimensionnels pour les rayons X.

Lorsque le rayonnement frappe la structure cristalline, il est réfléchi par chacun des plans d'atomes parallèles [70].

III. 2.4. Dosage biochimique (taux des protéines, des cires et des minéraux)

III.2.4.1. Taux des cires

Dans une ampoule à décanter de 1L contenant 20 g ou 20 mL d'échantillon de la kératine extraite, 80 mL de méthanol et 40 mL de chloroforme ont été ajoutés et le mélange a été agité à l'aide d'un vortex ou par la main pendant 2 min, puis 40 mL de chloroforme a été ajouté et le mélange a été agité vigoureusement pendant 2 min. Ensuite, 72 mL d'eau distillée ont été ajoutés et le mélange a été de nouveau agité à l'aide d'un vortex ou par la main pendant 2 min, Chloroforme non miscible avec solution de kératine extraite, donc se former deux couches dans une ampoule à décanter et la couche inférieure a été transférée dans un ballon en forme de poire col rodé.

La deuxième extraction a été fait avec 80 mL de méthanol à 10% (v/v) dans le chloroforme 40 mL sous agitation pendant 2 min, la phase de chloroforme a été ajoutée au premier extrait. Après l'évaporation, le résidu a encore été séché à 104°C pendant 1h.

III. 2.4.2. Taux des minéraux

La cendre est un résidu inorganique obtenu après combustion de la biomasse et est une mesure approximative des sels minéraux et des matières inorganiques dans les plumes. La teneur en cendres a été calculée par rapport au poids sec de l'échantillon d'origine après une nuit d'inflammation de l'échantillon à 575 ± 25 °C dans un four a moufle [71]. La teneur en cendres pour les plumes de poulet était de 1,5 %, quelle que soit la méthode utilisée [72].

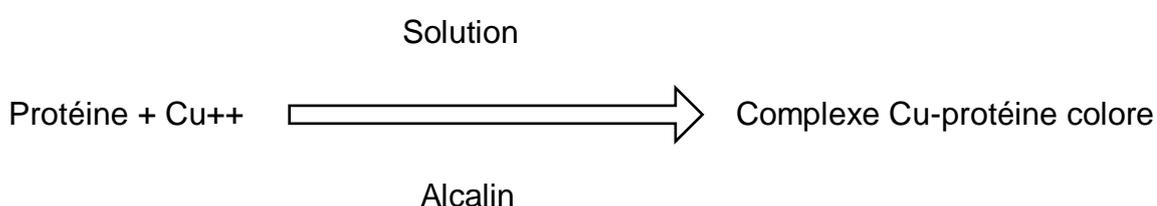
III.2.4.3. Taux de protéines

Les protéines sont des molécules complexes et de grande taille qui jouent de nombreux dans l'organisme. Elles effectuent la majeure partie du travail dans les cellules et sont nécessaires à la structure, au fonctionnement et à la régulation des tissus et des organes du corps, et chaque protéine a un rôle spécifique dans l'organisme. La détermination de la teneur absolue en protéines peut être réalisée au mieux en mesurant la teneur en acides aminés des protéines dans les échantillons étudiés.

Les méthodes les plus couramment utilisées pour la détermination du taux de protéines dans la kératine extraite à partir des plumes comme la méthode de Bradford et la méthode de Biuret [73].

III.2.4.4. Méthode de Biuret

La méthode de Biuret permet d'obtenir un dosage rapide des protéines. En milieu alcalin, les ions de cuivre (Cu^{++}) réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe pourpre caractéristique avec coloration violette.



Des solutions de sulfate de cuivre et d'hydroxyde de potassium à 1% ont été préparées, et 6 mL de la solution de kératine pure a été recueillie et mélangée avec une solution d'hydroxyde de potassium avec un rapport de 1 :1. Puis, ajouter des gouttes d'une solution de sulfate de cuivre jusqu'à observation la couleur violette. Par ailleurs, un échantillon de protéine de kératine extraite après purification a été préparé et dilué. Un changement de couleur a été obtenu à partir du test de Biuret (apparition de la couleur violet) [73-74-75].

Tableau 4: (principe, sensibilité, sélectivité, facilité) la méthode de Biuret [73-74-75]

Protéine estimation test	Principe	Sensibilité	Sélectivité	Temps	Facilité
Test De Biuret	Une couleur violette-violacée est produite lorsque les ions cuivriques (Cu^{2+}) interagissent avec les liaisons en milieu alcalines.	1 mg/mL	Liaisons peptidiques détection à λ 540nm,	20-30min	Facile

Partie 2

III.3. Matériel biologique

III.3.1. Origine de la souche bactérienne

La souche bactérienne codée S14 a été nouvellement isolées à partir de l'algue *Zonaria tournefortii* en février 2016 sur les côtes méditerranéennes algériennes, au niveau du complexe touristique « Corne d'Or » à Tipaza. Via les activités de recherche du laboratoire de Chimie des Substances Naturels et de Biomolécules (LCSN-BIOM) de l'université de Blida 1.

III.3.2. Criblage de la souche productrice de kératinase

III.3.2.1. Repiquage de la souche sur les boîte de Pétri

Les boîtes de Pétri sont remplis près de la zone stérile (bec Bunsen) avec un milieu solide LB, puis refroidit. Avec une anse de pasteur, une quantité mince d'une souche S14 estensemencée sur la surface des boîtes colées. Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h. La composition de milieux de culture LB est donnée en **(Annexe II)**.

III.3.2.2. Préparation de la Préculture

Cette étape consiste à préparer une suspension bactérienne, à l'aide d'une anse de platine en prélevant 2 à 3 colonies bien isolées et identiques de la souche S14 d'une culture bactérienne et les introduire dans des flacons contenant 50 mL de milieu LB liquide stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 min, puis incuber à 24 h dans Bain marie à agitation **(Annexe IV)**.

III.3.2.3. Production de la kératinase sur milieu liquide

Afin de mettre en évidence la production de kératinase par la souche S14, 03 mL des suspensions bactériens ont été ajoutés dans un milieu liquide où 05 erlenmeyers stériles de 250 mL contenant 50 mL de milieu FBML. La composition du milieu était (g / L): poudre de farine de plumes (20 g), CaCl₂ (1 g), NaCl (5 g), K₂HPO₄ (0,5 g), KH₂PO₄ (0,5 g), gélatine (15 g) et soja peptone (5 g) à pH 7,4 **(Annexe II)**. Les cultures sont par la suite mises à incuber dans un shaker sous agitation permanente (150 tours/min) à 37 °C pendant 7 jours. L'appréciation de la

production de kératinase est représentée par la capacité des isolats à se développer sur ce milieu.

III. 3.3. Evaluation de l'activité kératinolytique

III. 3.3.1. Dosage de l'activité kératinolytique

Après 7 jours d'incubation à 37°C sur milieu à base de farine de plumes (FBM) liquide, l'activité kératinolytique est mesurée dans les surnageants de culture obtenus après centrifugation à 4500×g pendant 30min à 4°C.

III.3.3.1.1. Incubation enzymatique

1mL de surnageant contenant l'enzyme à été dilué avec 9 mL de Tris-HCl, ensuite Le test d'activité a été réalisée par le mélange de 1 mL de surnageant de culture dilué avec 1mL d'une solution de kératine utilisée comme substrat.

Les surnageants centrifugés et filtrés sont utilisés comme solution enzymatique

- Solution de kératine (substrat préparé)..... 1mL
- Solution enzymatique 1mL

L'incubation du milieu réactionnel se fait au bain marie à 50°C pendant 10 min, le témoin préparer parallèlement dans les mêmes conditions sans de l'ajout du surnageant. Les réactions sont arrêtées par l'addition de 2mL d'acide trichloroacétique TCA (0.4M) (**Annexe III**) permettant la précipitation de la kératine non hydrolysée. Le milieu réactionnel a été incubé dans un bain de glace pendant 5 min, suivi d'une centrifugation à 4500× g pendant 30 min à 4°C pour éliminer les protéines précipitées [76].

L'activité enzymatique est détectée par mesure de l'absorbance à 280 nm en utilisant un spectrophotomètre.

Une unité (U/mL) de L'activité kératinolytique est correspondante à l'augmentation de la DO280 avec le blanc, de 0,01 par minute dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus [76]. L'activité est calculée selon la formule ci-après :

$$U = \frac{(4 \times n \times A_{280})}{(0.01 \times 10)}$$

n : Taux de dilution

4 : Volume réactionnel final (mL)

10 : temps d'incubation (min)

III.3.4. Optimisation des conditions de culture pour de la production de kératinases par la souche S14

III.3.4.1. Recherche des conditions optimales de culture pour la production de kératinases

La production des kératinases par la souche S14 a été optimisée en utilisant la méthodologie classique qui consiste à faire varier à chaque fois un seul paramètre impliqué dans l'optimisation de la production de kératinases.

➤ PH optimum de culture

Le pH optimum pour la culture de la souche S14 a été étudié en variant le pH du milieu de culture FBM liquide d'une gamme de pH allant de 5 à 10, Le pH a été ajusté en utilisant 0,1 N HCl ou NaOH 0,1 N. Après incubation à 37°C pendant 72h sous agitation, la culture est arrêtée par centrifugation et l'activité kératinolytique est détectée dans les surnageants de culture.

➤ Température optimale d'incubation

Afin de rechercher la température optimale d'incubation La souche codée S14 estensemencée stérilement sur milieu FBM liquide et incubée sous agitation à différentes températures de 30 à 52°C pendant 72h et après centrifugation à 4500xg pendant 30min, les surnageants sont utilisés comme solution enzymatique et l'activité kératinolytique est détectée.

➤ Effet des différentes sources d'azote organique et inorganique sur la production de kératinases

La production de kératinases par la souche S14 a été étudiée par culture sur milieu FBM additionné de différentes sources d'azote organiques et inorganiques: NH_4Cl , KNO_3 , NH_4NO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$, NH_4SO_4 , extrait de soja, extrait de levure, extrait de viande et peptone. Après incubation dans les conditions optimales l'activité kératinolytique est mesurée dans les surnageants de culture.

➤ Effet des différents volumes d'inoculum sur la production de kératinase

Afin d'avoir une meilleure production de kératinases par la souche S14, cette dernière a été cultivée sur milieu FBM additionné de différents volumes

d'inoculums (1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 %) L'activité kératinolytique est mesurée dans les surnageants de culture.

➤ **Effet des concentrations croissantes de la farine de plume source de kératine sur la production de kératinases**

La culture de la souche S14 a été réalisée sur le milieu FBM additionné de différentes concentrations de meilleur substrat kératinique (0.2, 0.6, 1, 1.4, 2%) l'activité kératinolytique est mesurée dans les surnageants de culture.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Résultats finaux de l'extraction de la kératine



Figure 15: La poudre de kératine

Tableau 5 : Résultats finaux de l'extraction de la kératine

Masse du plume de poulet	DMSO, acétone	Rendement R%	Masse de la kératine poudre
5 g	,250ml de DMSO, 500ml acétone.	8%	0,4g
10g	500ml de DMSO 1L acétone	14%	1,4 g

- Le rendement de l'extraction par DMSO est très faible en comparaison avec celle de d'autres méthodes qui dépasse le 60 %.

IV.2.Taux des cires



Figure 16: les traces de taux des cires sur ballon

- En fin de l'expérience, quelques traces des cires sur les parois du ballon sont récupérées : à partir de 0,1 g de poudre de kératine (20 mL solution de kératine extraite), 0,0018 g de cire est récupéré, et à partir de 1g de poudre de kératine, 0,018 g de cire est récupérée (1,8 %).

IV.3. Taux des minéraux



Figure 17 : La forme de la plume de poulet avant et après la combustion à l'intérieur du four à moufle.

- Après le processus de combustion de 1 g de plumes de poulet à l'intérieur du four à moufle pendant 24 heures à 575 ± 25 °C, une masse de 0,01g qu'est récupéré, correspond à les résidus de matières inorganique.

La teneur en cendres a été calculée par rapport au poids sec de l'échantillon original, et qu'est égale à 1%. cette valeur est très faible, ce qui signifie que ces déchets utiles pour la production de combustible.

IV.4. Dosage colorimétrique (méthode de Biuret)



Figure 18: Sulfate de cuivre



Figure 19: (sulfate de cuivre + hydroxyde de potassium à 1% + 6mL de la solution de kératine).

- l'apparition du couleur violet est due à la formation d'un complexe par une réaction chimique dans milieu alcalin entre les ions de cuivre (Cu^{++}) et les liaisons peptidiques des protéines .cette résultat signifie que l'extrait de kératine contient des protéines (absorbance dans l'UV de 0,1869 à 540nm).

IV.5. Analyse de la kératine par microscope électronique à balayage (MEB)

La morphologie de la kératine extraite à partir des plumes a été observée par analyse MEB. Les images MEB ont montré que la poudre de kératine se compose de particules microporeuses spongieuses qui sont des microstructures poreuses disposées de manière aléatoire avec de petites microsphères forme asphérique à surface lisse [77-78].

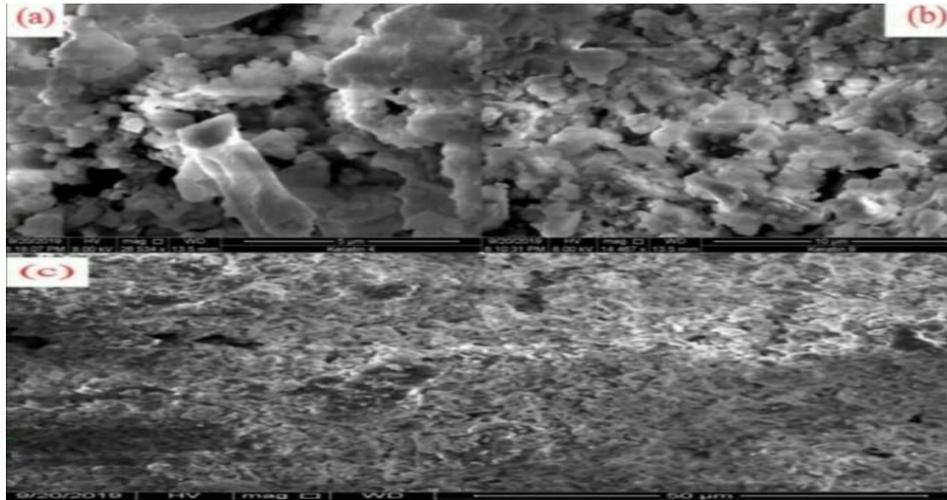


Figure 20: Images MEB de la kératine [79]

IV.6. Analyse de la kératine par Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les groupes fonctionnels chimiques de la poudre de kératine ont été analysés à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF), dans une gamme de nombres d'onde comprise entre 4000 cm^{-1} et 550 cm^{-1} [80].

- La comparaison entre notre travail et le travail précédent on a constaté que les deux sont très semblables.
- indique que la bande à $3274,15\text{ cm}^{-1}$ correspond aux liaisons peptidiques ($-\text{CO}-\text{NH}-$).
- Les nombres d'onde à 1633 , 1559 et 1392 cm^{-1} sont les ondes des liaisons peptidiques identifiées comme amides I, II et III qui fournir des informations importantes sur la structure de la protéine kératinique. ainsi, l'amide I, est la combinaison de l'hélice et de la feuille et l'amide III peut être attribué à la structure en feuillet β .
- Dans la région Amide I peut être déconvoluée pour fournir plus informations sur la structure présente.
- nombre d'onde 1126 cm^{-1} a été décrit ($-\text{OH}$) les groupes de acides carboxyliques et la bande de transmission (N-H) à 750 à 500 cm^{-1} .

C'est notre travail :

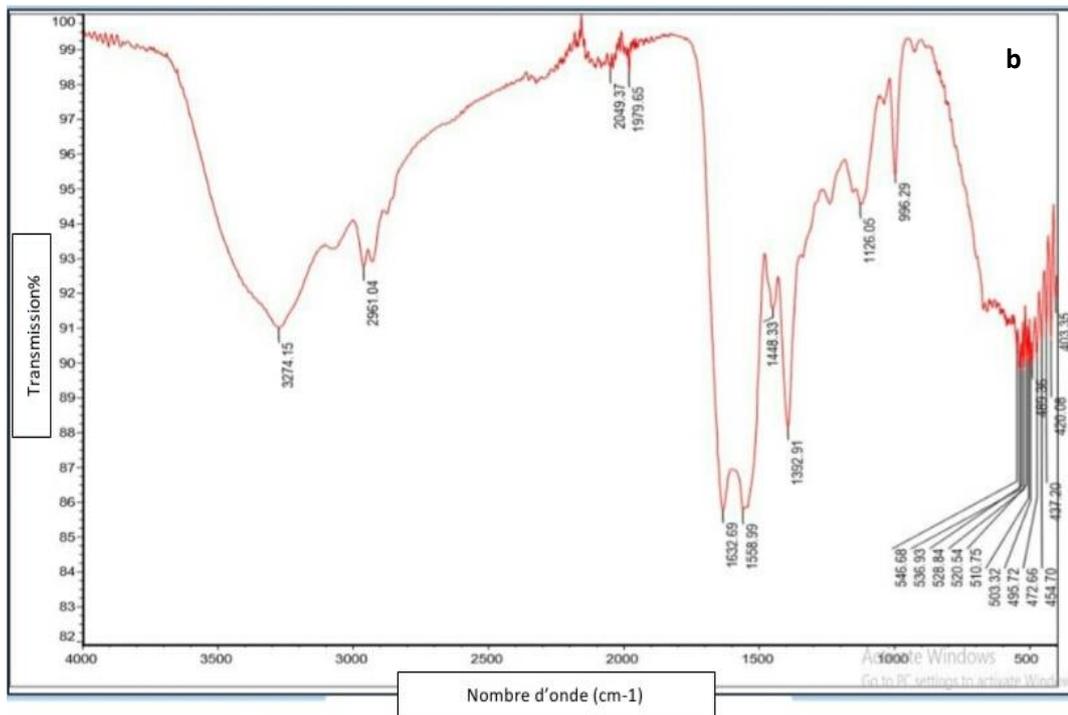
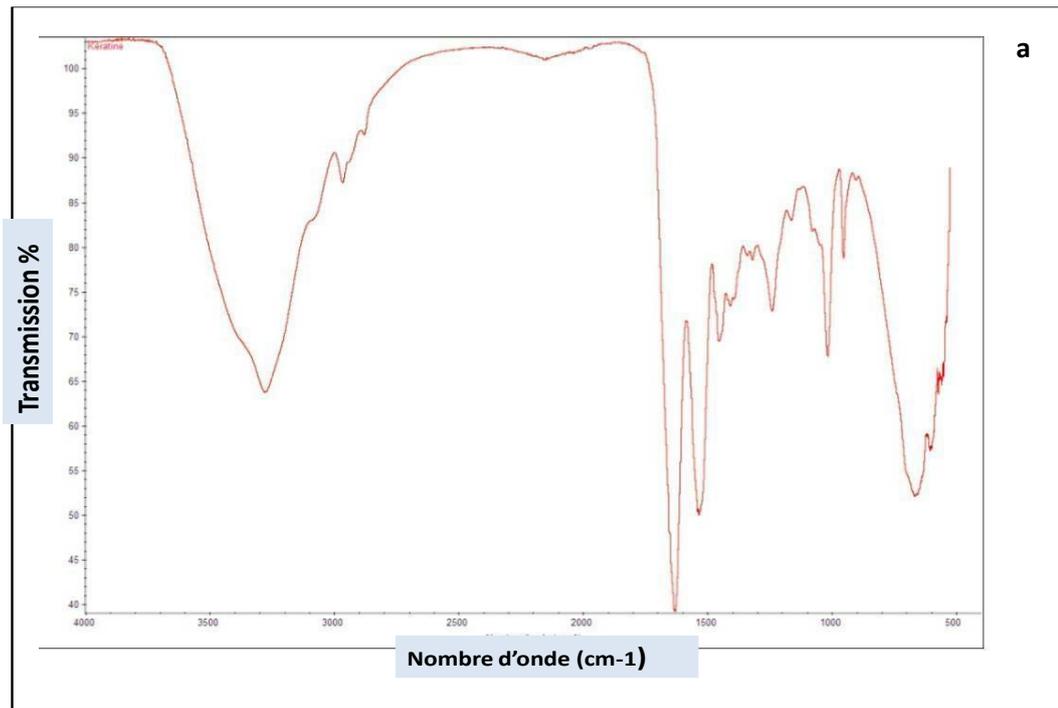


Figure 21: Les spectres IRTF de la kératine
a : notre travail , b : travail basé sur la référence [78].

- Le pic à 990 et 580 cm^{-1} a été associé aux liaisons C-S et S-S .
- Après comparaison entre notre travail et le travail précédent (b) les résultats IRTF montrent particulièrement la présence de pics caractéristiques tels que les fonctionnalités amide -N-H, -C=O, -C-N- et -CNH qui confirment que les acides aminés constitutifs forment les groupes peptidiques de la kératine [77-78-79]. Par conséquent, on peut conclure que la kératine extraite possède plus de structures de feuillets qu'aux hélices.

IV.7. L'analyse par diffractométrie de rayons X (DRX)

Une méthode importante pour spécifier la phase cristalline de l'échantillon est l'analyse DRX de l'échantillon [81].

Les résultats de la DRX ont révélé que la kératine extraite se présentait principalement sous une forme semi-cristalline.

- L'analyse DRX des molécules de kératine dans la figure 23 :
- Les pics à $2\theta = 9-10,76^\circ$ et à $19-32,75^\circ$ ont été attribués à l'hélice α et au feuillet β , respectivement.
 - un fort pic à $32,75$ degrés, qui a déterminé la présence de nanoparticules de kératine.
 - Les nanoparticules de kératine de présentent les propriétés de diffraction de l'hélice α qui apparaissent à $2\theta = 10,76^\circ$ et du feuillet β Le pic varie de 5 degrés à 46 degrés, avec la largeur d'une structure amorphe.

D'après les résultats, on peut conclure que la kératine possède deux types de structure cristalline α et β [78].



Figure 22: Diffraction des rayons X de la kératine en poudre [79]

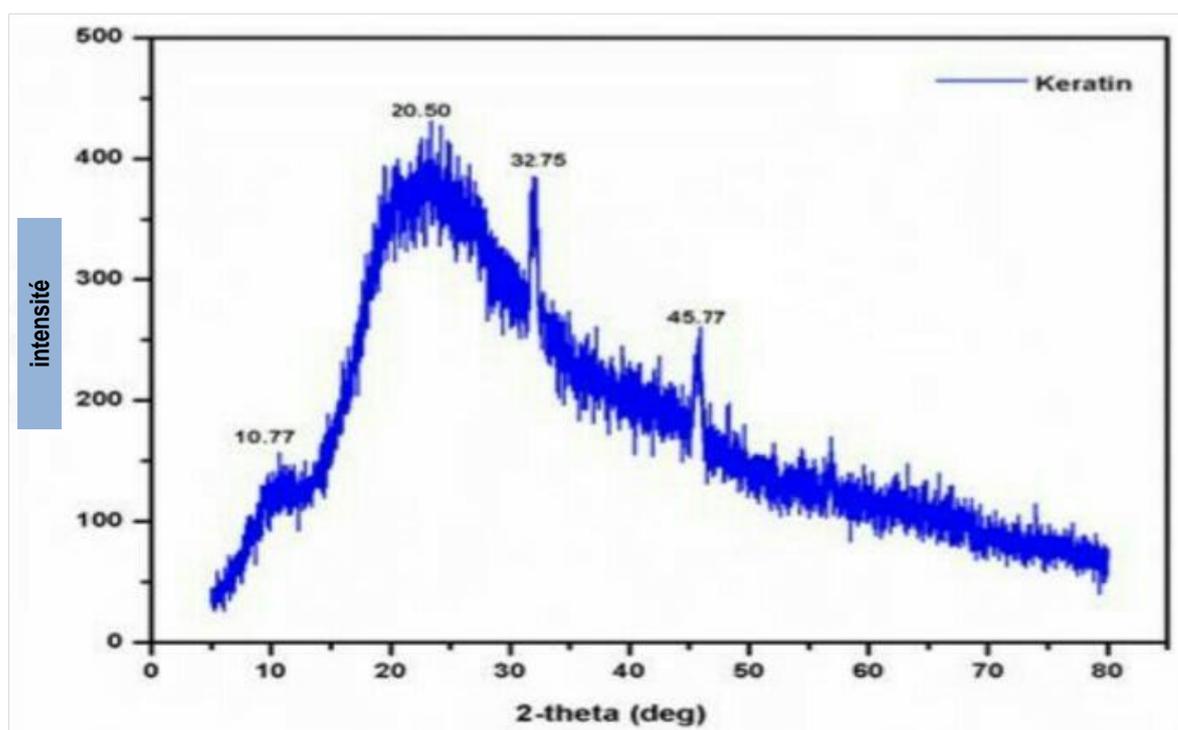


Figure 23: La XRD de la kératine [78].

IV.8. Optimisation des conditions de culture pour la production des kératinases par la souche S14

Dans cette partie de notre travail, nous nous sommes intéressés à optimiser les différentes conditions de production de kératinases par la souche S14 cultivée sur milieu liquide contenant la farine de plumes comme seule source de carbone et d'azote, et nous nous sommes proposée d'élaborer un milieu de culture à base de différents substrats complexes et bon marché en vue de réduire au maximum le coût de production d'enzyme.

IV.8.1. Le pH optimum de culture

La variation de l'activité enzymatique en fonction du pH du milieu de culture a été testée, le milieu de culture est ajusté à différents pH (allant de 5 jusqu'à 10). Après incubation pendant 72h et mesure de l'activité kératinolytique les résultats obtenus sont regroupés dans la figure 24.

Tableau 6: Effets de la variation du pH sur la production de Kératinases par la souche S14 avec T= 37°C, (6%, mL) de volume d'inoculum, (1%, g) de la farine de plumes.

pH initial	4	5	6	7	8	9	10
Activité (U/mL)	14.3	24.3	35.3	60.1	92.1	17.1	16.9
pH final	8.15	8.16	8.25	8.4	8.62	8.78	8.68

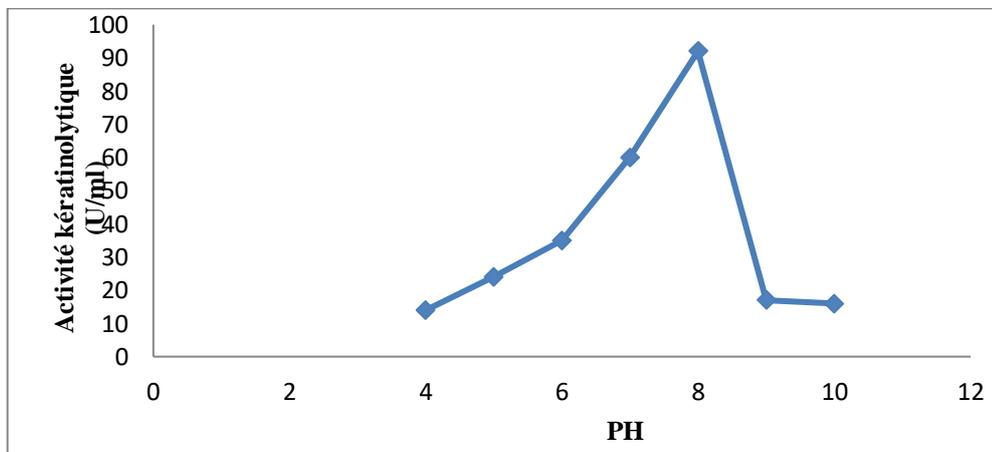


Figure 24 : Effet du pH du milieu sur la production de kératinase par la souche S14.

On constate que l'activité kératinolytique augmente avec le pH jusqu'à 8 où la souche présente un optimum d'activité 92.1 UI/mL. Au-delà de ce pH, l'activité enzymatique diminue. Le pH optimum de culture est donc de 8 pour cette souche. Ce résultat est conforme aux études réalisées auparavant par [56]. Il est noté que les kératinases sont généralement actives et stables sur une gamme de pH =7,0 à 9,0).

IV.8.2. la température optimale de culture

L'activité kératinolytique pour une gamme de températures allant de 30 à 52°C a été testée après incubation enzymatique durant 10 min à 50°C et mesure des absorbances à 280 mn. Les résultats représentés sur la figure 25, montrent que cette souche présente un maximum d'activité kératinolytique à 37°C, Par ailleurs, La température optimale d'activité des kératinases varie de 37 à 65°C [56].

Tableau 7: Effets de la variation de température sur la production de kératinases avec PH= 8, (6%, mL) de volume d'inoculum, (1%, g) de la farine de plumes

Température d'incubation	30	37	42	52
Activité (U/mL)	12	42.4	24	8
pH final	8.2	8.4	8.36	7.2

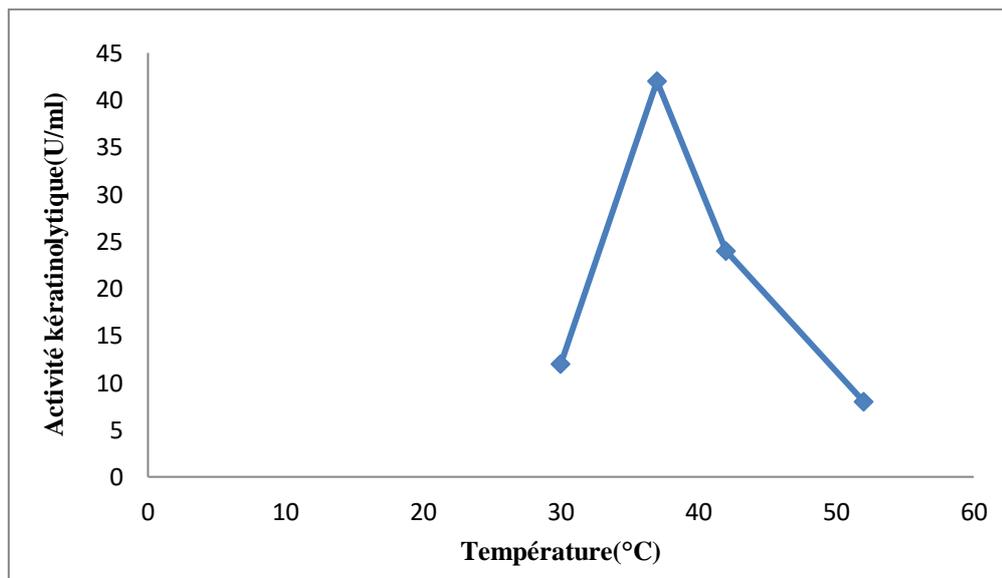


Figure 25: Effet de la température d'incubation sur la production de kératinase.

IV.8.3. Effet des différents volumes d'inoculum sur la production de kératinases

Dans cette étude, différents volumes d'inoculum ont été testés pour la production de kératinase. On a constaté que la production maximale d'enzyme a été enregistrée à (92,1U/mL) en utilisant 6%, ml de volume d'inoculum. Les résultats présentés sur la **figure 26**.

Tableau 8 : Effets de la variation du volume d'inoculum sur la production de Kératinases par la souche S14 avec T= 37°C, PH=8, (1%, g) de la farine de plumes

Volume d'inoculum (% , mL)	1	2	3	4	5	6	7
Activité (U/mL)	27.3	30.5	36.6	40	50.4	92.1	44.2
pH final	7.79	7.74	7.71	7.69	7.81	8.62	8.84

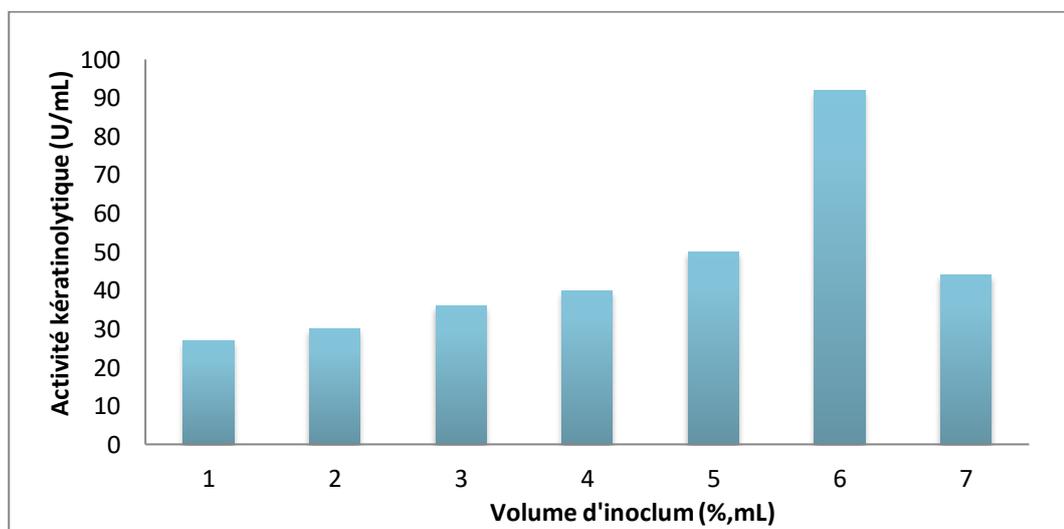


Figure 26: Effet de différents volumes d'inoculum sur la production de kératinase.

IV.8.4. Effet des différentes concentrations de farine de plumes sur la production de kératinases

L'effet de la concentration en farine de plumes a été étudié afin de déterminer la concentration optimale pour la production de kératinases par la souche S14. Après incubation de la souche sur milieu FBM additionné de différentes concentrations de farine de plumes de (0.2 jusqu'à 2%, g), l'activité kératinolytique est détectée.

Les résultats présentés sur la figure 27 montrent que le niveau de production des kératinases augmente avec la concentration jusqu'à (1%, g) où le maximum de production des kératinases est obtenu (92.1UI/mL). Au-delà de cette concentration l'augmentation de la production enzymatique n'est plus significative. La farine de plumes peut constituer un milieu complet pour la croissance et la production de kératinases par la souche S14, vu sa richesse en protéines (sources de carbone et d'azote).

Tableau 9: Effets de la variation de la quantité de la source de carbone sur la production de Kératinases par la souche S14 avec T= 37°C, PH= 8, (6%, mL) de volume d'inoculum

Farine de plumes (% g)	0.2	0.6	1	1.4	2
Activité (U/mL)	17	27.2	92.1	42	22.2
pH final	7.8	8.1	8.62	8.36	8.31

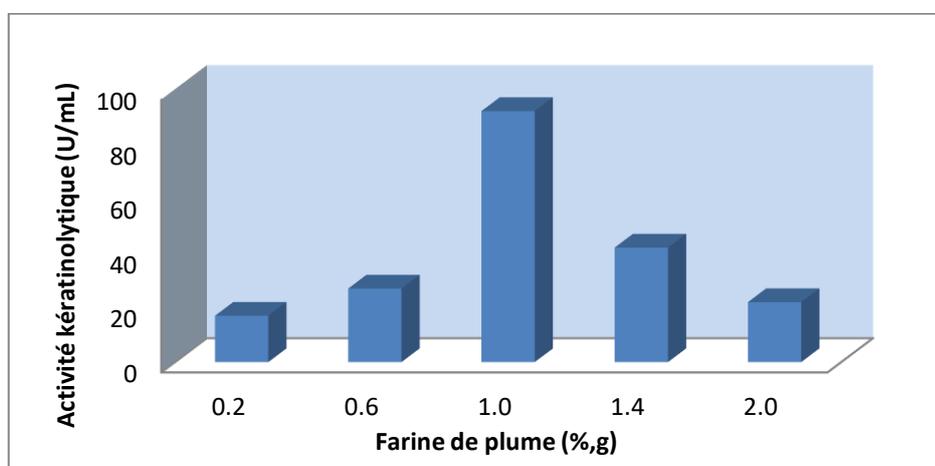


Figure 27: Effet de la concentration en farine de plumes sur la production de kératinase par la souche S14

IV.8.5. Effet de l'addition de différentes sources d'azote sur la production de kératinases

La production de protéases alcalines dépend considérablement de la disponibilité de la source de carbone et d'azote dans le milieu de culture. Les deux sources ont un effet régulateur sur la synthèse d'enzymes. L'azote organique ou inorganique est métabolisé pour produire essentiellement des acides aminés, des acides nucléiques, des protéines et certaines composantes des parois cellulaires. Ainsi, une série d'expériences a été réalisée sur milieu FBM additionné de différentes sources d'azotes organiques et inorganiques : (NH₄Cl, KNO₃, NH₄NO₃, CO(NH₄)₂, NH₄SO₄, extrait de soja, extrait de levure, extrait de viande et peptone) avec une concentration de 0,02% et de 0,01%.

Parmi les milieux supplémentés en azote organique, la production maximale de kératinases est obtenue sur milieu additionné (0,02%) d'extrait de soja (42.4UI/mL). Les résultats mentionnés sur la figure 28. L'extrait de soja est donc nécessaire pour la croissance et la production de kératinase puisqu'il constitue une source d'acides aminés et de facteurs de croissance pour la bactérie. L'extrait de soja contient aussi des vitamines et des cofacteurs qui sont indispensables, aussi bien pour le développement de la bactérie que pour la synthèse de métabolites. En effet, plusieurs travaux ont montré que les sources d'azote organique sont meilleures pour la production d'enzymes par les bactéries.

Tableau 10: Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche S14 T= 37°C, PH= 8, (6%, mL) de volume d'inoculum, (1%, g) de la farine de plumes

Sources d'azote organique (0,02%)	Extrait de soja	Extraite de levure	Extrait de viande	Peptone
Activité (U/mL)	42.4	23.2	26	28.4
pH final	8.4	8.37	8.42	8.35

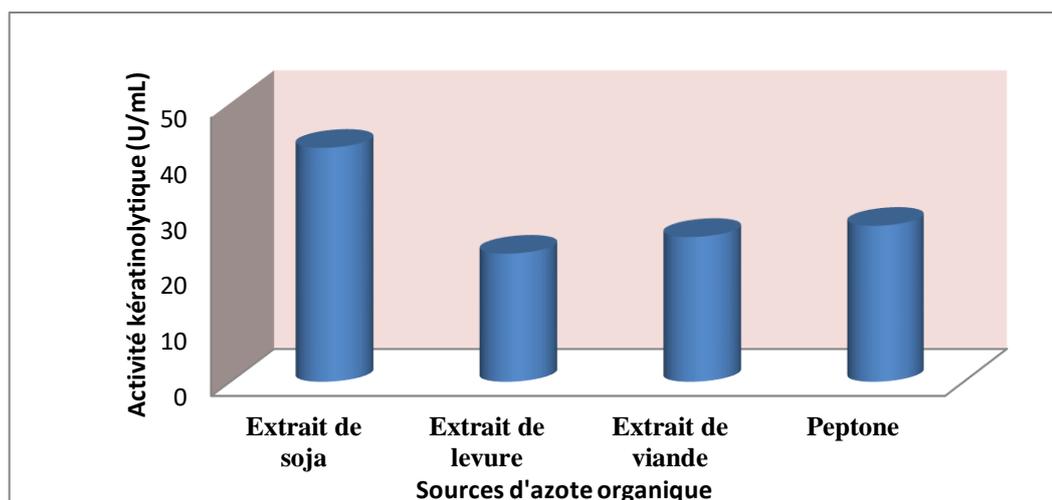


Figure 28: Effet de différentes sources d'azote organique sur la production de kératinase par la souche S14

Parmi les milieux supplémentés en azote inorganique, la production maximale de kératinases est obtenue sur milieu additionné (0,01%) en chlorure d'ammonium (42,4 U/mL) et la production de kératinase la plus faible (14 U/mL) a été trouvée dans un milieu supplémenté en cobalt d'ammonium. Les résultats mentionnés sur la figure 29.

Tableau 11 : Effets de différentes sources inorganiques d'azotes sur la production de kératinases par la souche S14 avec T= 37°C, PH= 8, (6%, mL) de volume d'inoculum, (1%, g) de la farine de plumes.

Azote inorganique (0,01%)	NH ₄ Cl	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	CO(NH ₄) ₂	NH ₄ SO ₄
Activité (U/mL)	42.4	16.4	31.2	14	16.8
pH final	8.4	8.58	8.4	8.26	8.06

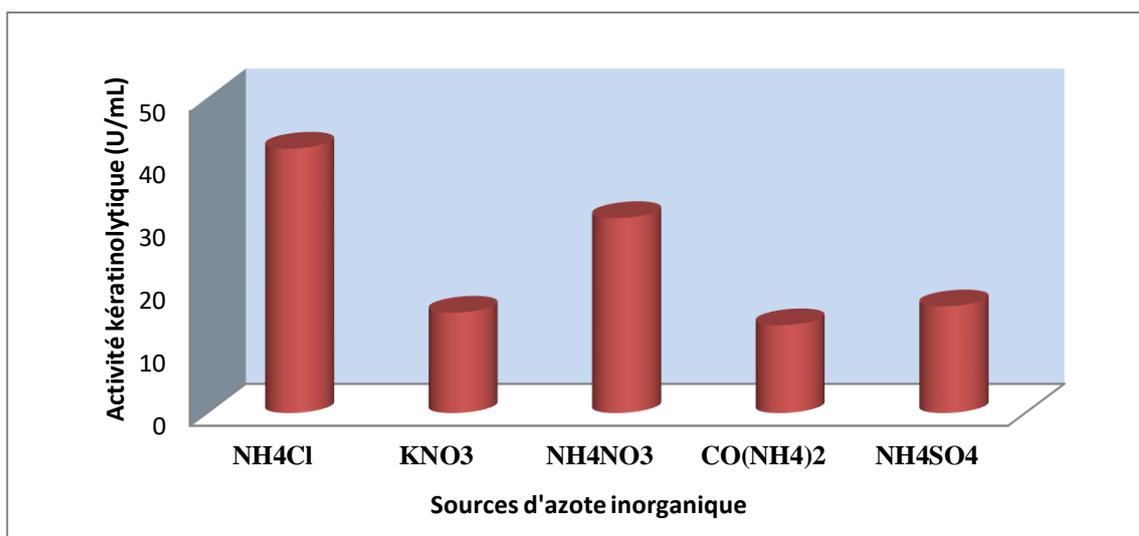


Figure 29 : Effet de différentes sources d'azote inorganique sur la production de kératinase par la souche S14.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Dans ce mémoire nous nous sommes intéressés aux plumes de volailles comme une source potentielle d'extraction de la kératine.

La viande de poulet est très riche de protéines animales principalement consommées dans le monde, qui crée un nombre important de sous-produits de plumes dans les abattoirs de volailles, donc la plupart des plumes générées sont éliminées comme des déchets, qui causent un problème de pollution et peuvent aussi causer des problèmes de santé humaine .

Les plumes sont une substance régulière, renouvelable et naturelle, utilisée comme l'une des principales sources d'extraction de la kératine car ils contiennent plus 90% de protéine de kératine brute, peuvent être transformées en composés ou en produits de haute valeur. Nous pouvons utiliser la kératine à de nombreuses applications en chimie verte, agroalimentaire, pharmaceutique, industries biomédicales et cosmétiques et matériaux composites.

Dans la partie expérimentale en utilisant le DMSO comme solvant d'extraction et l'acétone pour précipitation de la kératine, cette procédure ne modifie pas la structure des protéines.

La kératine obtenue est ensuite caractérisée par des analyses physiques, chimiques (IRTF, DRX, MEB) et biochimiques (Taux des protéines, Taux des cires, Taux des minéraux) Les techniques utilisées sont des techniques de laboratoires, facile à manipuler et effectives.

La gestion des déchets de kératine à l'aide de micro-organismes est une alternative biotechnologique pour le recyclage et la valorisation des plumes de volaille afin de réduire la pollution environnementale et générer des produits à valeur ajoutée tels que les protéines solubles et les acides aminés.

La souche bactériennes S14 a été mis en cultures sur milieu liquide à base de farine de plume (FBML) afin d'estimer la croissance bactérienne et de mesurer l'activité kératinolytique.

L'étude a porté sur l'optimisation de la production de kératinases par la souche identifiée selon la méthode classique afin de réduire le coût de la production des enzymes kératinases, ces dernières ils ont des applications polyvalentes dans les industries des détergents, des cosmétiques, des produits pharmaceutiques, du cuir et des denrées alimentaires et des aliments pour animaux.

Les différents résultats obtenus montrent que l'optimum de production de kératinases a été obtenu a un pH optimum 8, une température optimale 37°C, en présence de la farine de plumes comme substrat à 1%, g, 0,02% d'extrait de soja comme source d'azote organique et 0,01% de chlorure d'ammonium comme source d'azote inorganique et 6%, ml volume d'inoculum.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Tatineni, R., Doddapaneni, K. K., Potumarthi, R. C., & Mangamoori, L. N., "Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with *Streptomyces sp7*", *Applied biochemistry and biotechnology*, V.141, n°2, (2007), 187–201. <https://doi.org/10.1007/BF02729061>
- [2] Gong, J. S., Ye, J. P., Tao, L. Y., Su, C., Qin, J., Zhang, Y. Y., Li, H., Li, H., Xu, Z. H., et Shi, J. S., "Efficient keratinase expression via promoter engineering strategies for degradation of feather wastes", *Enzyme and microbial technology*, v.137, (2020), 109550. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109550>
- [3] Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M., Hashem, A., "Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter sp*", NFH5 isolated from soil samples, *AMB Express*, v.7,n°1, (2017),1-8.
- [4] Mi, X., Li, W., Xu, H., Mu, B., Chang, Y., & Yang, Y., "Transferring feather wastes to ductile keratin filaments towards a sustainable poultry industry", *Waste management (New York, N.Y.)*, v.115, (2020), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.07.022>
- [5] Sharma, I., et Kango, N., "Production and characterization of keratinase by *Ochrobactrum intermedium* for feather keratin utilization", *International journal of biological macromolecules*, v.166, (2021), 1046–1056. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.260>
- [6] Srivastava, B., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S., "Microbial keratinases: An overview of biochemical characterization and its eco-friendly approach for industrial applications", *Journal of Cleaner Production*, v.252, (2020), 119847.
- [7] Kshetri, P., Roy, S. S., Chanu, S. B., Singh, T. S., Tamreihao, K., Sharma, S. K., Ansari, M. A., et Prakash, N., "Valorization of chicken feather waste into bioactive keratin hydrolysate by a newly purified keratinase from *Bacillus sp*", RCM-SSR-102, *Journal of environmental management*, v.273, (2020), 111195. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111195>
- [8] Ren, G., Lin, T., Ying, Y., Chowdhary, G., Ting, K.C., "Agricultural robotics research applicable to poultry production: A review", *Computers and Electronics in Agriculture*, V.169, (February 2020), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105216>

- [9] Kanani, F ., Mohammad, D.H ., Brandon, H.G ., Pelletier, N ., “Waste valorization technology options for the egg and broiler industries: A review and recommendations ”,Journal of Cleaner Production, V.262, (July 2020) ,1-19.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121129>
- [10] Reddy, N .,Santosh, M.S .,“Recovery and Applications of Feather Proteins” ,Center for Emerging Technologies, Jain University, Jain Global Campus, Ramanagara District, Bengaluru, India,(August 2016),255-274.<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00014-8>
- [11] FAO. 2020. Meat Market Review, Overview of global meat market developments in 2019, April 2020.Rome, (2020). <http://www.fao.org/3/ca8819en/CA8819EN.pdf>.
- [12] “FAO. 2020 Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets: June 2020. Food Outlook, 1.Rome”, (June 2020) . <http://www.fao.org/3/ca9509en/ca9509en.pdf>
- [13] “FAO. 2017. Meat and meat product”, (2020).
http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Meat/Documents/Food_Outlook_June_2017_Meat_.pdf.
- [14] Bouras, C.,Ben Saifia ,K .,“Essai de formulation d’un aliment de poulet de chair en incorporant des ressources locales” , Université Mohamed Boudiaf – Msila,(2019) .
- [15] Boulenouar ,T.,“ Production et consommation de la viande blanche : L’Algérie loin des normes”,(2020) . <http://www.elmoudjahid.com/fr/actualites/147007>
- [16] Tesfaye, T ., Sithole ,B ., Ramjugernath, D ., Chunilall, V ., “Valorisation of chicken feathers: Characterization of physical properties and morphological structure” ,Journal of Cleaner Production ,V.149 , (April 2017), 349-365.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.02.112>
- [17] Tesfaye, T ., Sitholea, B ., Ramjugernatha, D ., Mokhothud, T .,“Valorisation of chicken feathers: Characterization of thermal, mechanical and electrical properties” ,Sustainable Chemistry and Pharmacy, V.9, (September 2018) , 27–34.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.05.003>
- [18] Sharma, S ., Gupta, A ., Syed Mohd S.T.Chik ., Geek Kee, C ., Bhupendra M.M., Doo H.K ., Sharma, G ., “Characterization of keratin microparticles from feather biomass with potent antioxidant and anticancer activities”, International Journal of Biological Macromolecules,V.104(Pt A), (November 2017),189-196.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.015>

- [19] Bohacz, J ., Kornilowicz-Kowalska, T .,“Fungal diversity and keratinolytic activity fungi from lignocellulosiccomposts with chicken feathers” ,Process Biochemistry ,V.80 , (May 2019) , 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.02.012>
- [20] Djebbar, S ., Yousfi, B ., “Contribution à la valorisation de plumes de volaille comme élément de milieu de fermentation fongique” , Université Constantine 1,(2014).
- [21] Khtaoui, L .,“Etude de la protection thermique et UV des cellules photovoltaïques par un dépôt des fibres kératiniques afin d’améliorer leurs rendements” ,Université mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, (2012) .
- [22] Tesfaye, T ., Sithole, B ., Ramjugernath, D ., “Valorisation of chicken feathers: a review on recycling and recovery route—current status and future prospects” ,Clean Techn Environ Policy ,V.19,n°10,(October 2017),1-16.[10.1007/s10098-017-1443-9](https://doi.org/10.1007/s10098-017-1443-9)
- [23] Rajabia, M ., Azam ,A ., McConnellb, M ., Cabrala, J ., “Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications” ,Materials Science & Engineering C ,V.110 , (May 2020),1-22. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110612>
- [24] Reddy,C.C .,Khilji,I. K ., Gupta, A ., Bhuyar, P ., Mahmood, S ., Saeed AL-Japairai ,K.A., Kee Chua, G .,“ Valorization of keratin waste biomass and its potential applications” ,Journal of Water Process Engineering, V.40 , (April 2021) .
<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101707>
- [25] Qiu, J ., Wilkens, C , Barrett, K , Anne, S. M ., “Microbial enzymes catalyzing keratin degradation: Classification, structure, function” ,Biotechnology Advances ,V.44 ,(November 2020) ,1-22.. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107607>
- [26] Wang, B .,Yang, W .,McKittrick, J ., Marc, A.M., “Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration” .,Progress in Materials Science, V.76 , (March 2016) ,229-318 .
<https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
- [27] Hyeon, S.J ., Seon, Y.P, Kim,K ., Lee, Y.J ., Nam, G.w ., Kang, N.J .,Lee,D.W., . “Development of a keratinase activity assay using recombinant chicken feather keratin substrates” ,Plos one,V.12, n°2, .(February 2017) ,1-18.
[10.1371/journal.pone.0172712](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172712)
- [28] Sharma, S ., Gupta, A .,Kumar, A .,“Keratin: an introduction” , S. Sharma and A. Kumar (eds.), Keratin as a Protein Biopolymer, Springer Series (2019) ,1-18.
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-21>

- [29] Alahyaribeik, S ., Ullah, A .,“Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin” , International Journal of Biological Macromolecules, V.148 , (April 2020) ,449–456.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.144>
- [30] Salpin, F ., “Laine et Colorants : fixation, quantification et vieillissement. Étude par spectrométrie Raman”,thèse de Doctorat, Université Pierre Et Marie Curie,(2008).
- [31] Christophe, J .,“Etude de la valorisation des déchets d’origines kératiniques par voie thermo-mécano-chimique en vue de l’obtention de filament continu : cas spécifique de la laine ”, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, (mai 2003).
- [32] Xiuling, F., “Value added products from chicken feather fibers and protein”, Thèse de Doctorat, université de Auburn,(May 2008).
- [33] Céline, P.,“ Méthodologies spectroscopiques pour l’étude de matériaux : objets du patrimoine de la fin du 19ème au début du 20ème siècle”,Thèse de Doctorat, Université de Paris 6, (décembre 2004).
- [34] Rajabia, M ., Azam, A ., McConnellb, M ., Cabrala, J., “Keratinous materials: Structures and functions in biomedical applications” ,Materials Science & Engineering C ,V.110 , (May 2020),1-22. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110612>
- [35] Chandrakant ,R.H ., Saransh S. J ., Ananda J. J ., Dipak ,V. P .,“Valorization of keratin-based waste” ,Process Safety and Environmental Protection, V.115, (April 2017) ,85-98. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.045>
- [36] Mathur, P ., Javed, N.S., Sen, K .,“Durable flame-retardant wool using sulphamic acid ”,Polymer Degradation and Stability ,V.174, (April 2020) ,1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109101>
- [37] Chioma, E.N ., Kenneth, K.A ., Joseph ,A.O ., Michael, O.D .,“ Natural Fibers as Viable Sources for the Development of Structural, Semi-Structural, and Technological Materials – A Review ”, Review Article ,V.10, n°10 , (September 2019) ,682-694.
[10.5185/amlett.2019.9907](https://doi.org/10.5185/amlett.2019.9907)
- [38] Hermann ,H.B ., Dominique G.H .,“Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia” ,Journal of Anatomy, V.214,n°4, (January 2009), 516-559. [10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x)
- [39] Bal, K., Kothari, V.K ., “measurement of dielectric properties of textile materials and their applications”, Indian Journal of fabre &textile research, Vol. 34, (September 2008), 191-199.

- [40] Feroz, S ., Muhammad, N ., Ratnayake, J ,Dias, G .,“Keratin - Based materials for biomedical applications” ,Bioactive Materials, V. 5,n°3, (September 2020) , 496-509.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.04.007>
- [41] Pourjavaheria, F ., Ostovar Pour, S .,Olive,A.H.Jones ., Peter, M. Smooker ., Brkljačaa, R ., Sherkata, F ., Ewan W. Blancha ., Gupta, A ., Robert, A. Shanksa ., “Extraction of keratin from waste chicken feathers using sodium sulfide and L-Cysteine” , Process Biochemistry,V.82 , (April 2019) , 205–214 .
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.010>
- [42] Shavandi, A ., Tiago ,H. S ., Bekhit, A.A ., Bekhit, A ., “Dissolution, Extraction and Biomedical Application of Keratin” , Biomaterials Science, V.5, n°9, (May 2017) ,1699-1735. [10.1039/c7bm00411g](https://doi.org/10.1039/c7bm00411g)
- [43] Reddy, N ., Santosh, M.S ., “Recovery and Applications of Feather Protein . Protein Byproducts Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products”, Gurpreet S, Dhillon (Eds) ,Academic press,(2016),255-274.
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802391-4.00014-8>
- [44] Vineis, C ., Varesano, A ., Varchi, G ., Aluigi, A .,“Extraction and Characterization of Keratin from Different Biomasses” , S. Sharma and A,Kumar (eds.), Keratin as a Protein Biopolymer, Springer Series, (2018) , 35-76. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-02901-23>
- [45] Jillian, G.R ., Mark ,E.V ., “A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications”, Materials,V.3, n°2 , (January 2010) ,999-1014.
[10.3390/ma3020999](https://doi.org/10.3390/ma3020999)
- [46] Sharma, S ., Gupta, A .,“Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives”, Brazilian Archives of biology and technology, V.59, (January-December 2016) ,1-14. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2016150684>
- [47] Gupta, R., et Ramnani, P., “Microbial keratinases and their prospective applications: an overview”, Applied microbiology and biotechnology, v. 70, n° 1, (2006), 21-33.
- [48] Selvam, K., et Vishnupriya, B., “Biochemical and molecular characterization of microbial keratinase and its remarkable applications”, Int J Pharm Biol Arch, v. 3, n°2, (2012), 267-275.
- [49] Madej ,T., Lanczycki ,C.J., Zhang ,D., Thiessen ,P.A., Geer, R.C., Marchler-Bauer A, Bryant ,S.H., " MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. Nucleic Acids Res. 2014 Jan; 42(Database issue):D297-303
- [50] Sahoo ,D.K., Das ,A., Thatoi, H., Mondal ,K.C., Mohapatra ,P.K., “Keratinase

Production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation”, *Appl Biochem Biotechnol*, v. 167, n°5, (2012), 1040-1051.

[51] Kornilowicz-Kowalska, T., et Bohacz, J., “Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects”, [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Waste Manag*, v. 31, n° 8, (2011), 1689-1701. [10.1016/j.wasman.2011.03.024](https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.03.024)

[52] Université d'Angers. Biochimie (Position des ponts disulfures dans un peptide). France Adresse URL :

<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/3Structure/1StructPrimQ/6PontDisulfure/1PontDisulfure.htm>

[53] Barman, N. C., Zohora, F. T., Das, K. C., Mowla, M. G., Banu, N. A., Salimullah, M. et Hashem, A., “Production, partial optimization and characterization of keratinase enzyme by *Arthrobacter* sp. NFH5 isolated from soil samples”, *AMB Express*, v. 7, n°1, (2017), 1-8.

[54] Nnolim, N. E., Udenigwe, C. C., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. “Microbial Keratinase: Next Generation Green Catalyst and Prospective Applications”, [Review], *Front Microbiol*, v.11, (2020), 3280. [10.3389/fmicb.2020.580164](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580164)

[55] Pandey, S. C., Pande, V., Sati, D., Gangola, S., Kumar, S., Pandey, A., et Samant, M., “Microbial keratinase: a tool for bioremediation of feather waste”, *Smart Bioremediation Technologies*, (2019), 217-253.

[56] Paul, T., Jana, A., Mandal, A.K., Mandal, A., Mohapatra, P.K.D., Mondal, K.C., “Bacterial keratinolytic protease, imminent starter for NextGen leather and detergent industries, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, V. 3, (2016), 8-22.

[57] Farag, A. M., et Hassan, M. A., “Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*”, *Enzyme and Microbial Technology*, v.34, n°2, (2004), 85-93.

[58] Gupta, R., Sharma, R. et Beg, Q. K., “Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology”, *Critical reviews in biotechnology*, v.33, n°2, (2013), 216–228. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.685051>

[59] Cortez, K.J., E. Roilides., F. Quiroz-telles., J. Meletiadis, C. Antachopoulos, T. Knudsen., W. Buchanan., J. Milanovich, D.A., Sutton, A., Fothergill, M.G. Rinaldi., “Infections Caused by *Scedosporium* spp”, *Clinical microbiology reviews*, v. 21, n° 1, (2008), 157-97.

[60] Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam., A.A, Al-Zarban S., “A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes

for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources”, *Bioresour Technol*, v. 66, n°1, (1998), 1–11.

[61] Gousterova ,A., Braikova, D., Goshev,I., Christov, P., Tishinov ,K., Tonkova ,V.E., Haertle ,T., Nedkov, P., ”Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis”, *Lett Appl Microbiol*, v .40,n°5,(2005), 335–340.

[62] Wang ,X., et Parsons, C.M .,“Effect of processing systems on protein quality of feather meal and hair meals”,*Poultry Sci* ,v.76,n°3 ,(1997), 491–496.

[63] Hadas, A., Kautsky, L.,” Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming”. ,*Fertil Res*, v. 38,n°2, (1994), 165–170.

[64] Brutt, E.H., Ichida, J.M., “Occurrence of feather-degrading bacilli in the plumage of birds”, *The Auk*,V. 116,n°2, (1999), 364-372.

[65] Vignardet ,C., Guillaume, Y.C., Michel ,L., Friedrich, J., Millet, J., “Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design”, *Int J Pharm*, V.224, n°1-2, (2001),115–122.

[66] Sinkiewicz, I., Staroszczy k,H., Sliwins k,A., “Solubilization of keratins and functional properties of their isolates and hydrolysates” , *Journal of Food Biochemistry*,V.42,n°2 , (January 2018) ,1-11. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12494>

[67] Kalitva, M ., Vamvakaki, M .,“Nanomaterials characterization”,Department of Materials Science and Technology, University of Crete, Heraklion, Greece; Institute of Electronic Structure and Laser, Foundation for Research and Technology-Hellas,Heraklion, Greece,(2020),401-433.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0>

[68] Kohli, R ., Mittal, K.L ., “Methods for Assessing Surface Cleanliness” , *Developments in Surface Contamination and Cleaning, Methods for Assessment and Verification of Cleanliness of Surfaces and Characterization of Surface Contaminants*. R.Kohli, K.L. Mittal (Eds). Elsevier, V.12, (July2019) ,23-105.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816081-7.000036>

[69] Bouchaala, N., “Etude des propriétés structurale et physico-chimique des systèmes Nd-Fe-Co”, thèse de Doctorat, (2017) .

[70] Botan, R., Bona Sartor, S.,“X-ray diffraction analysis of layered double hydroxide Polymer nanocomposites” ,*Unifacvest University*, Lages, SC, Brazil, (2020),205-229.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101903-0.00005-7>

- [71] Tesfay, T ., Sithol, B ., Ramjugernath, D ., Chunilall, V., “Valorisation of chicken feathers: Characterization of chemical properties” ,Waste Management, V.68 ,(October 2017) ,626-635.<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.050>
- [72] Zonglin, L ., Reimer, C ., Picard, M ., Mohanty, A ., Misra , M ., “Characterization of Chicken Feather Biocarbon for Use in Sustainable Biocomposites ”,Frontiers in Materials ,V.7, n° 3, (February 2020) ,1-12. [10.3389/fmats.2020.00003](https://doi.org/10.3389/fmats.2020.00003)
- [73] Abhishesh, K.M ., Dahari, D., “Bradford assay as a high-throughput bioanalytical screening method for conforming pathophysiological state of the animal”, Journal of Drug Delivery and Therapeutics, V.10(1-s) , (February 2020) ,105-110. [10.22270/jddt.v10i1-s.3921](https://doi.org/10.22270/jddt.v10i1-s.3921)
- [74] Gadissa, T.G., Samuel, G.F., Bulcha, B.E ., “Extraction and Characterization of Natural Protein (Keratin) From Waste Chicken Feather” , International Journal of Modern Science and Technology, V.4, n°7, (July 2019) ,174-179.
- [75] allioua, M ., “statut nutritionnel et désordres métaboliques chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien” ,université de tlemcen – abou-bekr belkaïd, (2011).
- [76] Cai, C., Lou, B., Zheng, X., “Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of Bacillus subtilis”, J Zhejiang Univ Sci, v. 9, n°1, (2008),60-67.
- [77] Sharma, S ., Gupta,A., Kumar, A., Gek Kee, C., Kamyab, H., Sauf, S., “An efcient conversion of waste feather keratin into ecofriendly bioplastic film ”,Clean Technologies and Environmental Policy,V.20,(January 2018),157–2167.
<https://doi.org/10.1007/s10098-018-1498-2>
- [78] Alashwal, B.Y., Gupta, A ., Husain, M.S ., “Characterization of dehydrated keratin protein extracted from chicken feather” , IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, V.702, (2019),1-8.
[10.1088/1757-899X/702/1/012033](https://doi.org/10.1088/1757-899X/702/1/012033)
- [79] Tekleab Welu, K ., Beyan, S.M ., Balakrishnan ,S ., Admassu, H ., “Chicken Feathers Based Keratin Extraction Process Data Analysis Using Response Surface-Box-Behnken Design Method and Characterization of Keratin Product ”,Current Applied Science and Technology ,V.20,n°2,(May-August 2020),1-15. [10.14456/cast.2020.6](https://doi.org/10.14456/cast.2020.6)
- [80] Olajumoke ,D.F ., Sithole, B ., Tesfaye,T ., “Optimization of keratin protein extraction from waste chicken feathers using hybrid pre-treatment techniques”,Sustainable Chemistry and Pharmacy, V.17,(September 2020),1-12.
<https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100267>

[81] Alahyaribeik, S ., Ullah, A .,“Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin” ,International Journal of Biological Macromolecules, V.148 ,(April 2020) ,449–456.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.144>

ANNEXES

Annexe I

Matériels utilisé

- Autoclave
- Balance analytique
- Barreaux magnétiques
- Bec Bunsen
- Béchers
- Boîtes de Pétri
- Bain Marie
- Centrifugeuse
- Erlenmeyers
- Etuve
- Flacons
- Rotavapor
- Micropipette de 1000 µl
- Pipettes Pasteurs
- Plaque chauffante agitatrices
- Spatule
- Spectrophotomètre UV
- PH-mètre
- Four à moufle.
- Bain marie à agitation
- Shaker sous agitation

Annexe II

Milieu de culture à base de farine de plumes (FBM)

✓ Milieu en culture FBM liquide

- Farine de plume 20 g
- K_2HPO_4 0.5 g
- KH_2PO_4 0.5 g
- $CaCl_2$ 1 g
- gélatine 15 g
- Soja peptone.....5 g

- NaCl 5 g
- Eau distillée200 ml
- PH 7, 4

✓ **Milieu Luria Bertani (LB)**

Luria Bertani (LB) est utilisé pour la préparation des précultures des souches bactériennes. Il est composé de :

- Peptone 10 g
- Extrait de levure..... 5 g
- NaCl..... 10 g
- pH..... 7.2
- Eau distillée 1 L
- Agar..... 20g

Annexe III

Solution et tampons préparés :

Solution hydroxyde de sodium NaOH à (0,05 M)

Pour la préparation de 300 mL d'hydroxyde de sodium qui présent une masse molaire de 40 g/mol, 0,6 g du NaOH sont dissouts dans 300 mL d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse. Le pH est ajusté à 12.

Solution tampon tris HCl (0,05 M)

Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol a servi pour la préparation de 200 mL du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,57 g du tris dans 200 mL d'eau distillé et ajusté avec l'acide chlorhydrique HCl jusqu'à l'obtention d'un pH 8.

Solution d'acide trichloracétique TCA (0,4 M)

L'acide trichloracétique (TCA) avec une mass molaire de 163,38 g/mol dont 0.13 g sont dissouts dans 2 mL d'eau distillé et mélangés vigoureusement.

Annexe IV



Autoclave



Centrifugeuse type SIGMA



Bain marie à agitation



Spectrophotomètre UV

Annexe V



Repiquage de la souche S14



Préculture de la souche S14

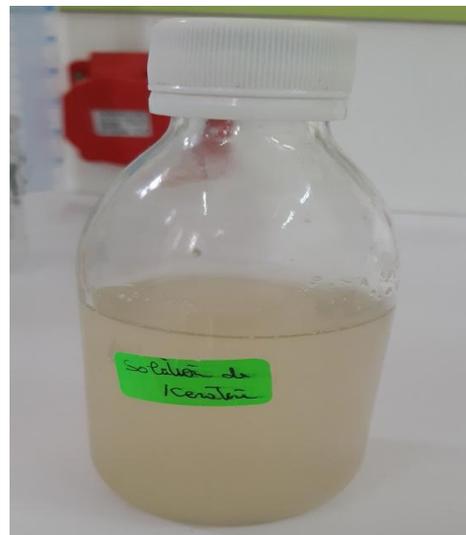


Des précultures de la souche S14

Annexe VI



La poudre de farine de plume



La solution de kératine



Evaporateur rotatif



Centrifugeuse

Annexe VII



Etuve



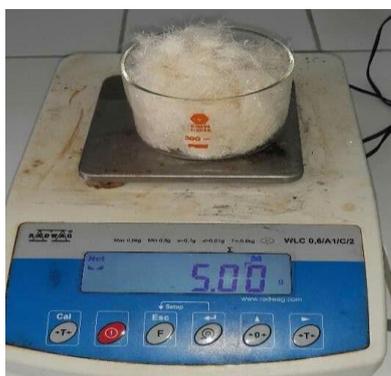
fourre à moufle type Naberthem



Filtration sous vide

Annexe VIII

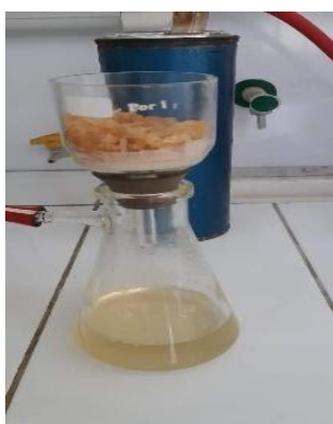
Extraction de la kératine



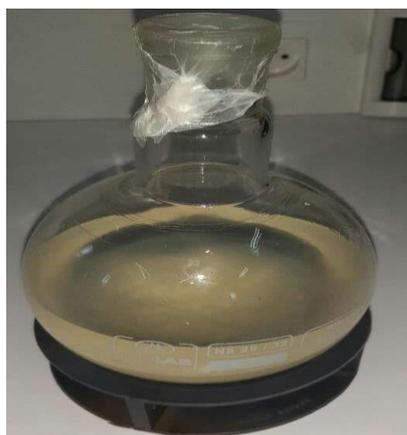
La masse des plumes utilisée



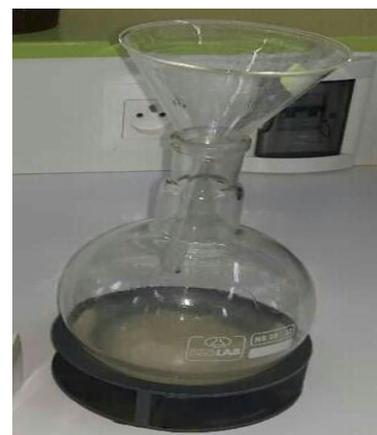
Chauffage à 80°C et agitation de mélange DMSO avec farine de plumes.



Filtration sous vide



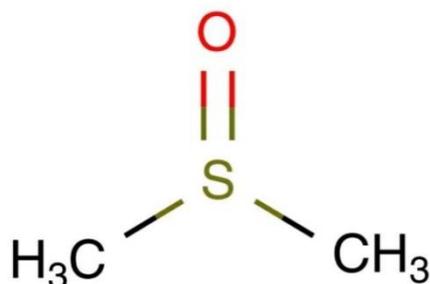
précipitation de la kératine après refroidissement



récupération de la kératine pure



La poudre de kératine

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) :

Est une molécule organique très polaire qui forme un liquide peu volatil. Fortement hygroscopique, il est soluble à la fois dans l'eau et dans la plupart des solvants. Il solubilise de nombreux composés organiques, le DMSO solubilise la plupart des composés insaturés et aromatiques, y compris certaines polymères, et certains composés inorganiques. Il possède un champ d'utilisation très large comme solvant réactionnel, de polymérisation, d'extraction, de nettoyage et de décapage. Cette substance est caractérisée par une pénétration facile et rapide de la peau, une distribution dans l'ensemble des compartiments biologiques.

Le DMSO peut être considéré comme une substance relativement non toxique en mode aigu. Chez l'humain l'exposition cutanée à du DMSO concentré peut provoquer une irritation locale et prurit. Le DMSO, grâce à sa forte polarité, peut interagir de façon importante avec les molécules organiques sans altérer leur structure ou leur formule moléculaire. Le DMSO pur forme à température ambiante des structures de nature polymérique par liaison dipolaire, ce qui explique son haut point d'ébullition (189 °C, 1 atm).

Effet des agents dénaturants : L'urée, en tant que déprotéines, a été généralement utilisée pour augmenter la solubilité de la kératine dans l'eau. L'urée, à une concentration élevée (8 M), provoque un gonflement de la structure de la kératine en affaiblissant les interactions hydrophobes au sein de la chaîne polypeptidique et facilite l'effet de l'agent réducteur sur le polypeptide.

Effet des agents tensioactifs : Par exemple l'utilisation du tensioactif SDS (dodécylsulfate de sodium) augmente le taux d'extraction et améliorer également la stabilité de la kératine extraite dans des solutions aqueuses.

Agents réducteurs: Les plumes ont été solubilisées en utilisant divers agents réducteurs (thioglycolate, ou sulfure de sodium) pour obtenir un rendement en kératine aussi élevé que 50% lorsque le sulfure de sodium a été utilisé comme agent réducteur. Il a été démontré que le sulfure de sodium est un agent réducteur très efficace pour extraire la kératine, avec l'avantage que l'agent réducteur s'oxyde et est éliminé, la kératine sans résidus chimiques.

Prétraitement des plumes

Les plumes sont donc des déchets dangereux qui sont contaminés par des bactéries, ce qui les rend odorantes. Ces contaminants doivent être éliminés avant une éventuelle valorisation, sinon les plumes ne seront pas adaptées à leur usage. Différents procédés sont disponibles pour éliminer les impuretés et les micro-organismes des plumes, et pour améliorer les propriétés physiques, chimiques et mécaniques des plumes de poulet.

Les agents de nettoyage chimiques couramment utilisés sont de nature oxydante et comprennent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hypochlorite de sodium ($NaOCl$), le chlorite de sodium ($NaClO_2$), les agents réducteurs comme le dithionite de sodium, ($Na_2S_2O_4$) et le thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$) peuvent également être utilisés.

Les résultats ont montré que les agents de blanchiment étaient efficaces dans la décontamination des plumes de poulet et l'ordre d'efficacité suivait l'ordre $H_2O_2 > NaOCl > Na_2S_2O_4$.