

Réf :.....

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

MASTER

Thème

**Mise en evidence de l'activité
kératinolytique des souches
d'actinomycètes**

Présenté par :
OU DJEHANI Sihem et FATMI Lynda

Soutenu le : **20Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme. BOUCHERBA Nawel

MCA

Présidente

Mme. BOUDRIES Samiha

MAA

Encadreur

Mme. MERDJANE Firdaousse

MCB

Examinatrice

Année universitaire : 2017 / 2018

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie

A mon cher frère Hicham et ma chère sœur Mélissa, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes très chers amis et a ma meilleure amie en particulier Thiziri. en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de succès et de bonheur.

A mon binôme lynda . Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Sihem .

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

A ceux qui sont mon exemple de réussite mes très chers parents, que ce travail soit le témoignage profond de mon amour.

A ma chère sœur Dallel, son mari et leurs adorables enfants

A mon cher frère Mehdi.

A mon binôme Siham en témoignage de l'amitié qui nous unit.

Lynda

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.

En second lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Mme Boudries Samiha pour ses précieux conseils et son aide durant toute la période du travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail Et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1

Revue bibliographiques

I. Generalité sur les actinomycètes.....	2
II. Les Enzymes des actinomycètes a intérêt biotechnologique	2
III. Les kératinases	4
III.1. Origine des kératinases.....	4
III.2 .Mode d' Action	5
III.3.Le substrat kératinique	6
III.3.1.Sources de kératine.....	8
III.3.1.1.Kératine de plumes.....	8
III.3.2.Valorisation des plumes de volaille.....	9
III.4.Application des kératinases	9
III.5.Les Enzymes des actinomycètes	11

Matériels et Méthodes

I. Matériel	12
I .1. Matériel analytique	12
I. 2. Matériel biologique.....	12
II. Méthodologie	12
II.1.Purification des souches d'actinomycètes	12
II.2.Sélection des souches protéolytiques.....	12
II.2.1.Test d'activité protéolytique	12
II .3.Sélections des souches kératinolytiques	13
II.3.1.Préparation du substrat	13
II.3.2.Culture en milieu solide.....	14
II.3.3.Culture en milieu liquide	14
II.4.Test d'activité kératinolytique	15
II. 4.1. Préparation du substrat kératinolytique	15
II. 4.2 .Dosage de l'activité kératinolytique	16
III. Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes	17
III.1.Test des cylindres d'agar	17

SOMMAIRE

III.2.Etude morphologique des souches d'actinomycètes	17
III.2.1.Caractères macromorphologiques	17

Résultats et discussion

I. Purification des souches d'actinomycètes.....	18
II. Sélection des souches protéolytiques.....	18
II.1.L'activité protéolytique	18
III. Sélection des souches kératinolytiques	20
IV. Test d'activité kératinolytique.....	20
V. Activité antibactérienne des souches étudiées ALB 20 et NOP 24.....	21
VI. Etude morphologique des souches d'actinomycètes.....	22
VI.1.Caractères morphologiques.....	22
Conclusion et perspectives	25
Références bibliographiques.	
Annexes.	

Tableau N °	Titre	Page
I	Les enzymes produites par les actinomycètes et leurs applications.	2
II	Diversité des microorganismes kératinolytiques et quelques propriétés biochimiques de leurs kératinases.	5
III	Diverses sources de kératine et leur utilisation.	8
IV	Application potentielle des kératinases microbiennes.	11
V	Le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm),	19
VI	Résultat de l'activité kératinolytiques des souches NOP 24 et ALB20.	21
VII	Résultats de caractéristiques culturales des isolats d'actinomycètes sur les milieux ISP.	23

Figure N °	Titre	Page
1	Structure 3D en ruban des kératinases complexes.	4
2	a) Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures. b) Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.	6
3	Structure du filament intermédiaire de l' α -kératine.	7
4	Structure des filaments de β -kératine.	8
5	Schéma illustrant une plume.	9
6	Schéma représentant les étapes de préparation de la farine des plumes.	13
7	Culture liquide sur milieu liquide à base de farine de plume (FMBL).	14
8	Culture liquide sous agitation.	14
9	Extraction de la kératine des plumes.	15
10	Precipitation du substrat.	15
11	La kératine de plumes.	15
12	Substrat de l'activité kératinolytique.	16
13	Evaluation de l'activité protéolytique des souches NOP 24 et ALB20.	18
14	Evaluation de l'activité kératinolytique des souches NOP 24 et ALB20	20
15	Activité antibactérienne des isolats ALB20 et NOP 24.	22
16	Macromorphologie des souches ALB20 et NOP24 sur les milieux ISP	24

DMSO	diméthyle sulfo oxyde.
DO	Densité optique.
EC	Enzyme commission.
FBML	Milieu liquide à base de farine de plumes.
FBMS	Milieu solide à base de farine de plumes.
Fig	Figure.
g	Gramme.
GC %	pourcentage Guanine-Cytosine.
GN	Gélose Nutritive.
GNL	Gélose nutritive au lait.
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project.
IUBMB	Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire.
KDa	Kilodalton
M	Molaire.
MA	Mycélium aérien.
MEM	Minceur eau de mer.
MM	Masse moléculaire
MS	Mycélium de substrat.
N	Normal.
nm	Nanomètre.
ph	Potentiel d'hydrogène.
PM	Pigment mélanioide.
PS	Pigment soluble.
SCA	Starch Casein Agar.

T°	Temperature
TCA	Acide trichloracétique.
Tris	Tris (hydroxy méthyl) amino méthane.
U.F.C	Unité Formant Colonie par Millilitre. .
UI	Unité international.
µm	Micromètre.

Introduction

Les enzymes protéolytiques constituent l'un des plus importants groupes d'enzymes commerciales. Ces enzymes ont ample utilisation dans des procédés industriels, tels que l'industrie des détergents, L'agroalimentaire et les industries du cuir (Kumar et Takagi , 1999 ; Gupta *et al.*, 2002).

Les kératines sont des protéines fibrillaires insolubles trouvées dans la peau des mammifères, des reptiles et des oiseaux. En raison de leurs caractéristiques structurales telles qu'une teneur élevée en liaisons disulfure et hydrogène, les kératines résistent aux agents de leurs dégradation chimiques et biologiques (Kublanov *et al.*, 2009).

Les kératinases sont une classe particulière d'enzymes protéolytiques caractérisées par une capacité de dégradation de substrats de kératine insoluble tels que les ongles, les cheveux, la laine et les plumes. En vue des diverses applications potentielles associées à l'hydrolyse des substrats kératiniques, ces enzymes gagnent en importance au cours des dernières années (Brandelli, 2010 ; Prasad *et al.*, 2010).

Les plumes sont des co-produit des usines de traitement de la volaille, atteignant des millions de tonnes par an avec un impact potentiel sur l'environnement (Azeredo *et al.*, 2006). En utilisant des traitements physiques et chimiques, les plumes sont actuellement transformées en farine de plumes. Ces méthodes peuvent détruire certains acides aminés et diminuer la qualité et la digestibilité des protéines (Riffel et Brandelli, 2006) ce qui entraîne des dépenses, et peut entraîner la contamination du sol, de l'air et de l'eau. Ainsi, une solution innovante à ces problèmes est urgemment nécessaire (Suzuki *et al.*, 2006).

L'utilisation de kératinases microbiennes pour la dégradation de la kératine des plumes en entités peptidiques plus petites, offre une approche alternative plus viable, plus respectueuse de l'environnement et moins coûteuse, ainsi que la mise à niveau de la valeur nutritive de la farine de plumes. (Gupta et Ramnani, 2006 ; Chhimpa *et al.*, 2016).

Un certain nombre de microorganismes ont été utilisés pour la production de kératinases, y compris les champignons mésophiles et les actinomycètes (Cedrola *et al.*, 2012 ; Laba *et al.*, 2013 ; Sivakumar et Raveendran, 2015), et dans la production d'antibiotique et d'autres métabolites secondaires bioactifs (Sudo *et al.*, 1995; Sanglier *et al.*, 1996 ; Takahashi et Omura, ,2003).

C'est dans cet objectif que s'inscrit ce travail qui consiste à étudier la capacité des souches d'actinomycètes à produire des kératinases dégradant la farine de plume et des antibiotiques.

Revue bibliographique

I. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif avec un GC supérieur à 55 % (Goodfellow et Williams, 1983) et une lente croissance, le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpent et Sanglier, 1989). Ils peuvent produire des filaments ramifiés de 0,5-1,0 µm de diamètre (Eunice, 1983), plus petit que celui des champignons.

Les actinomycètes sont généralement des chimioorganotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Cependant, plusieurs espèces sont chimioautotrophe, utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (Mariat et Sebald, 1990; Ensignet *al.*, 1993). Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, mais il existe des thermophiles ou ceux qui tolèrent des températures allant jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

C'est le groupe de microorganismes le plus largement distribué dans la nature (Narayana et *al.*, 2008), ils sont moins prédominants que les autres bactéries mais bien plus que les moisissures. Toutefois, les actinomycètes sont en général plus nombreux que presque tous les autres groupes bactériens considérés individuellement (Harvey, 1999). Ce sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larpent et Sanglier, 1989). La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc, et dans des zones géographiques variées: l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (Badji, 2006; Pataraya *etal.*, 2010; Boubetra *etal.*, 2013).

II. Les enzymes des actinomycètes à intérêt biotechnologique

Les Actinomycètes sont un groupe de micro-organismes produisant divers métabolites secondaires précieux comme les antibiotiques, largement utilisés dans le domaine pharmaceutique et vétérinaire; les vitamines, les acides organiques et les enzymes (Schmid et Verger, 1998; Pandey *et al.*, 2000 ; Oskay *et al.*, 2004) .dont les plus utilisées dans différentes industries sont présentées dans le tableau I ci-dessous.

Tableau I : les enzymes produites par les actinomycètes et leurs applications

Enzymes	Souche productrice	Application biotechnologiques	Références
Amylases	- <i>Streptomyces avermitilis</i> - <i>Streptomyces griseus</i> IMRU 3570 - <i>Streptomyces</i> sp. SLBA-08 - <i>Streptomyces</i> strain A3 - <i>Streptomyces rochei</i> BTSS 1001	l'industrie alimentaire, la fermentation, le textile et l'industrie du papier.	Rajagopalanet al.,2008 Vegalet al.,1991
Cellulases	- <i>Streptomyces drozdowiczii</i> - <i>S.lividans</i> - <i>S.longispororuber</i> - <i>Streptomyces</i> sp. B-PNG23	Les industries des pâtes et papier, les textiles, les bioraffineries, le traitement des peaux animales, le vin et le brassage.	Yassienet al., 2014 Bagewadiet al., 2011
Xylanases	- <i>Streptomyces</i> spp - <i>Actinomadura</i> sp . - <i>Actinomadura thermophile</i> sp	l'industrie des pâtes et du papier.	Bode et huber, 2005 Ninaweeet al., 2006 Sriyapalet al., 2011
Lipases	- <i>Pseudomonas fluorescens</i> NS2W - <i>Actinomadura</i> sp	industries de détergents, produits alimentaires, produits oléochimiques de diagnostique et également dans les domaines pharmaceutiques le traitement des graisses et des huiles, des additifs, des produits cosmétiques, de la fabrication de papier.	Kulkarni et gadre ,2002 Taibiet al.,2012
Protéases	- <i>Streptomyces</i> spp - <i>Streptomyces thermonitrificans</i> - <i>Nocardioopsis</i> sp. NCIM 5124	L'industrie des textiles, du cuir, des détergents, fabrication du fromage, synthèse organique, l'industrie du vin et le traitement des eaux usées.	Schmid et verger, 1998 Sharminetal., 2005 Boeckleet al.,1995 Mohamedin,1999
L-asparginases	- <i>Streptomyces griseus</i> - <i>S. karnatakensis</i> , - <i>S. albidoflavus</i> - <i>Nocardia</i> sp	Comme agent anti-cancéreux contre certains cancers humains, principalement dans la leucémie aiguë lymphoblastique.	Janaki, 2016 Narayana, 2007

Kératinases	<i>-Streptomyces sp</i>	Utilisées dans l'épilation Enzymatique du cuir, industrie des détergents et Le développement de films biodégradable.	Cai <i>et al.</i> , 2008 Williams <i>et al.</i> , 1990
--------------------	-------------------------	--	---

III. Les Kératinases

Les kératinases ou enzymes kératinolytiques représentent l'un des plus importants groupes d'enzymes protéolytiques qui ont un grand intérêt industriel et de larges applications dans différents secteurs. Ces enzymes ont la capacité d'hydrolyser les kératines plus efficacement que d'autres protéases. Elles ont été classées comme des protéinases de mécanisme inconnu tel que recommandé par l'IUBMB (Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire) (1978) avec le numéro [EC 3.4.21/24/99.11] (George *et al.*, 1995). Des recherches récentes ont indiqué que les kératinases sont comme les protéases à sérine en raison de leurs homologie élevée (97%) avec les protéases alcalines et leur inhibition par les mêmes inhibiteurs que les protéases à sérine (**Fig.01**) et peuvent être aussi des métallo-protéases (Ignatova *et al.*, 1999 ; Bernal *et al.*, 2006). Ce sont des enzymes qui dégradent facilement la kératine des plumes, de laine et des cheveux ainsi que d'autres protéines fibreuses (l'élastine et le collagène) et d'autre non fibreuses (la caséine, la gélatine et l'albumine) avec un haut degré de spécificité.

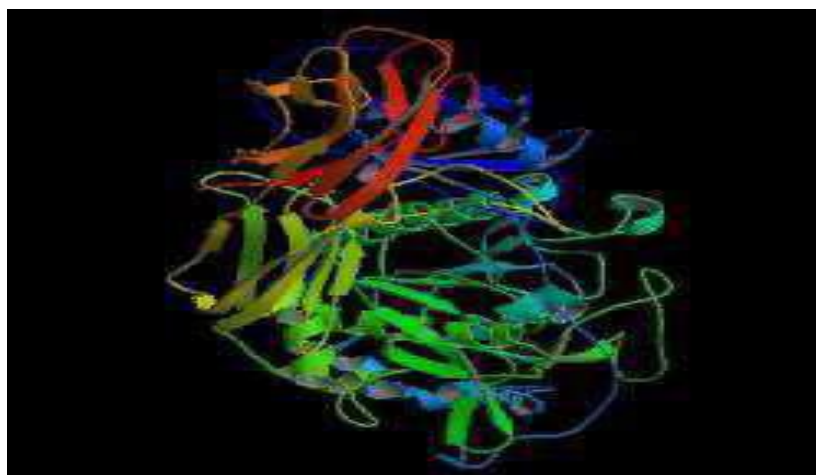


Figure 1 : Structure 3D en ruban des kératinases complexes (anonyme I).

III.1. Origine des kératinases

Les kératinases sont très répandues dans le monde microbien et elles peuvent être identifiées à partir de micro-organismes des trois domaines: Eucaryotes, Bactéries et Archaea. Ces micro-organismes ont été isolés des sites les plus distincts, des sols antarctiques aux sources d'eau chaude, y compris les environnements anaérobies. Par conséquent, les kératinases microbiennes présentent une grande diversité dans leurs propriétés biochimiques et biophysiques. Les caractéristiques de certaines kératinases microbiennes sont résumées dans le tableau II.

Tableau II : Diversité des microorganismes kératinolytiques et quelques propriétés biochimiques de leurs kératinases.

Microorganismes	type catalytique	M.M (kDa)	pH d'activité	T d'activité (° C)	Référence
Bactéries					
<i>Bacillus</i> sp. SCB-3	Metallo	134	7	40	Lee <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus cereus</i> DCUW	Serine	80	8,5	50	Ghosh <i>et al.</i> , 2008
<i>Fervidobacterium islandicum</i> AW-1	Serine	>200	9	100	Nam <i>et al.</i> , 2002
<i>Microbacterium</i> sp. kr10	Metallo	42	7,5	50	Thyset Brandelli, 2006
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	Serine	18	6-9,5	40-70	Bressollier <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces</i> sp. S7	Serine-metallo	44	11	45	Tatinen <i>et al.</i> , 2008
<i>Kocuriarosea</i>	Serine	240	10	40	Bernalet <i>et al.</i> , 2006
Champignons					
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Serine	/	6,5-9	45	Santos <i>et al.</i> , 1996
<i>Aspergillus oryzae</i>	Metallo	60	8	50	Faraget Hassan, 2004
<i>Paecilomyces marquandii</i>	Serine	33	8	60-65	Gradisari <i>et al.</i> , 2005

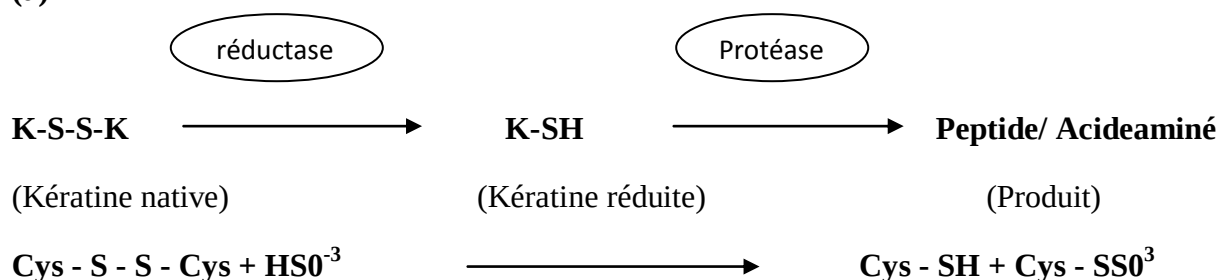
<i>Trichophyton sp. HÁ-2</i>	Serine	34	7,8	40	Anbu <i>et al.</i> , 2008
------------------------------	--------	----	-----	----	------------------------------

MM : masse moléculaire.pH : potentiel d'hydrogène ; T° : température.

III.2.Mode d'action

Ces enzymes kératinolytiques attaquent principalement les ponts disulfures du substrat non soluble par clivage de ces derniers ce qui permet l'attaque des protéases extracellulaires et donne une accumulation de sulfocysteine, l'excès de soufre est oxydé en sulfite et en sulfate ou en thiosulfate qui se concentre dans le milieu réactionnel (Suh et lee ,2001 ; Anabu*et al.*,2007) (**Fig.02**). Des études utilisant des substrats synthétiques ont montré que ces enzymes ont tendance à hydrolyser les liaisons peptidiques au niveau de l'amine des acides aminés aromatiques et hydrophobes (Venter *et al.*,1999).

(a)



(b)

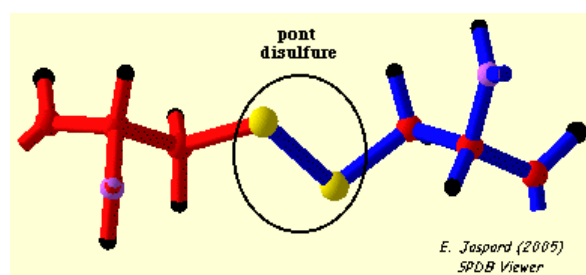


Figure 2: (a) Schéma représentant le mode d'action des kératinases sur les substrats kératiniques par clivage des ponts disulfures, (b) Représentation schématique des ponts disulfures entre les résidus de cystéines.(anonyme II).

III.3.Le substrat kératinique

La kératine est une protéine insoluble et hautement stable trouvée principalement dans les plumes, la laine, les ongles et les cheveux des vertébrés (jacques, 2003;Tomet *al.* ,2011).Elle est résistante aux enzymes protéolytiques communes telles que la papaïne, la pepsine et la trypsine (Papadopouloset *al.*,1986)et cette haute résistance de la kératine aux protéases peut être attribuée à la conformation moléculaire de leurs acides aminés structurels, c'est-à-dire emballé dans les hélices α (cheveux) et les feuillets β (plume) en présence de

liaisons disulfures de la cystine, liaisons hydrogènes et les interactions hydrophobes (Parry et North, 1998).

Les kératines sont des protéines dont les chaînes se présentent en hélice α (α kératine) ou en feuillet β (β kératine) qui se replient en forme tridimensionnelle. Les deux montrent une structure de matrice filamenteuse caractéristique: des filaments intermédiaires de 7 nm de diamètre pour l' α -kératine (**Fig.03**) et des filaments de 3 nm de diamètre pour la β -kératine (**Fig.04**). Les deux sont inclus dans une matrice de kératine amorphe. L'unité moléculaire des filaments intermédiaires de l' α -kératine est un hétérodimère à bobinage hélicoïdal et celle du filament de la β -kératine est une feuille plissée. La réponse mécanique de l' α -kératine a été largement étudiée et montre des régions linéaires, et dans certains cas, une forte déformation élastique réversible. Ainsi, cette forme de kératine peut également être considérée comme un «biopolymère». D'autre part, la β -kératine n'a pas été étudiée de manière aussi complète. Les matériaux kératiniques sont sensibles à la vitesse de déformation et l'effet de l'hydratation est important.

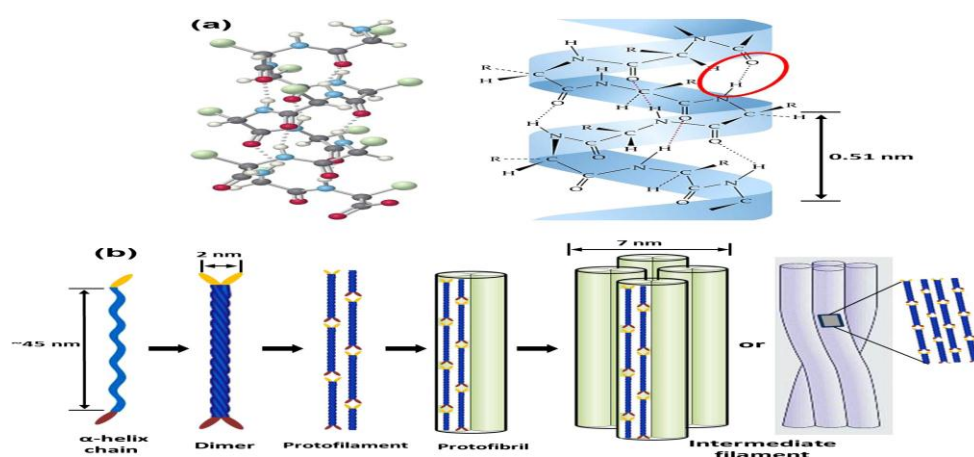


Figure3 : Structure du filament intermédiaire de l' α -kératine: (a) modèle à billes et à bâtonnets de la chaîne polypeptidique, et hélice α montrant la localisation des liaisons hydrogène (ellipse rouge) et le pas de 0,51 nm de l'hélice (Mcmurry et al., 2003); (b) dessin schématisé de la formation de filaments intermédiaires reproduite d'après (Iodish et al., 2000 ; Voet et al., 2008): les chaînes en hélice α se tordent pour former les dimères, qui s'assemblent pour former le protofilament. Quatre protofilaments s'organisent dans le filament intermédiaire.

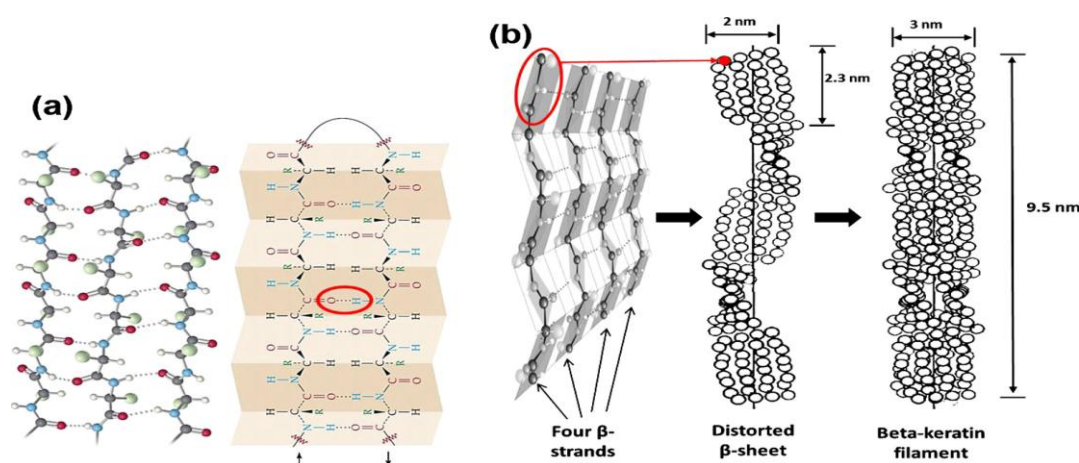


Figure4 : Structure des filaments de β -kératine: (a) modèle à billes et à bâtonnets de la chaîne polypeptidique, et illustration du plissé feuille bêta (Mcmurry et Fay,2003); (b) dessin schématique de la formation du filament bêta-kératine (adapté de (Fraser *et al.*, 1972): une chaîne polypeptidique se plie pour former quatre brins β qui se tordent pour former la feuille β déformée. Deux feuilles s'assemblent pour former un filament bêta-kératine.

III.3.1. Sources de kératine

La kératine peut avoir différentes sources qu'elle soit animale ou humaine connaissant diverses utilisations selon la source. Certaines sources de la kératine avec leur utilisation correspondante sont résumées dans le tableau III.

Tableau III : Diverses sources de kératine et leur utilisation (Selvam et Vishnupriya , 2012) .

Sources	Utilisation
Sabots d'animaux	Production de colle et de soins capillaires
Sabots en poudre	Agent sans restriction dans les aliments pour animaux
Laine de mouton	Réparation de tissus humains, utilisation biomédicale
Toile d'araignée Soie (β -kératine)	Sutures pour chirurgie oculaire, tendon artificiel et ligaments pour chirurgie du genou
kératine humaine	Aliments, vêtements, production de soins de la peau, la production de marqueur dans le diagnostic des tumeurs

III.3.1.1.Kératine de plume

Les plumes d'oiseaux terrestres sont composées d'une partie protéique (kératine) qui présente presque 90% des plumes et d'une partie non protéique qui inclut des pigments, des

minéraux, des polysaccharides, des nucléotides, de l'acide urique, du glucose et du ribose (Grosser,1956).

a).Source des plumes

Les plumes proviennent des volailles, ce sont des coproduits naturels de l'industrie alimentaire présentant des caractéristiques physiques spécifiques, tel qu'un pouvoir isolant et une légèreté, surtout utilisées dans l'industrie de textile.

Ce sont des sous-produits d'activités parmi lesquels on distingue deux catégories :

- Les plumes et duvets neufs provenant de l'élevage et de l'abattage des palmipèdes ou oiseaux terrestres.
- Les plumes de récupération provenant des articles textiles contenant des plumes.

b).Structure et composition

La plume est composée d'un axe central nommé le rachis, creux à sa base et plein dans sa partie principale. Elle porte des barbes, insérées en deux séries de part et d'autre de l'axe dans un seul plan et enchevêtrées par des barbules perpendiculaires, qui ne peuvent pas être observées à l'œil nu. Ces derniers sont accrochées les unes aux autres grâce à des crochets (Fakhfakh-Zouari, 2010) qui les tiennent (**fig.05**). Cette plume est très riche en acides aminés.

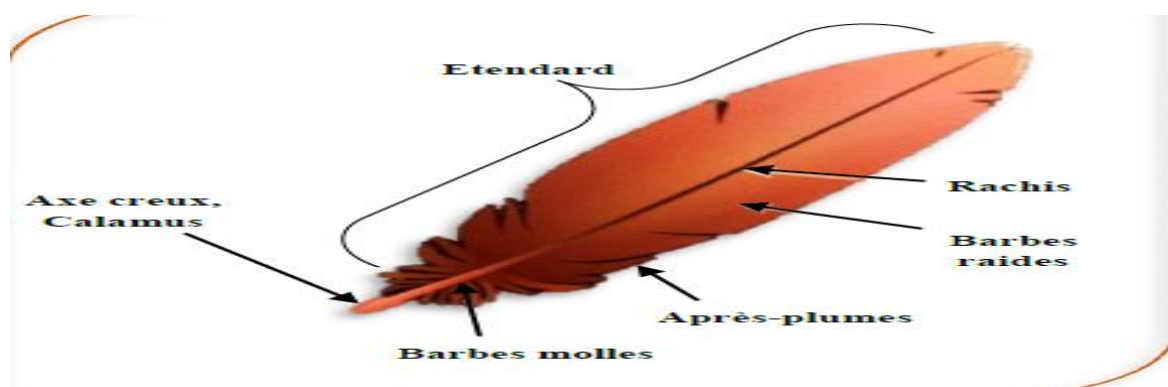


Figure 5 : Schéma illustrant une plume.

La plume est générée en grandes quantités comme cproduit dans l'industrie des volailles à l'échelle mondiale. Elle est considérée comme une très riche source de protéines surtout la β - kératine (protéine fibreuse insoluble) qui constitue 91% de la plume (Godheja et Shekhar , 2014). La présence de la kératine rend la plume récalcitrante à la plupart des protéases communes comme la trypsine, la pepsine et la papaïne, ce qui ralentit son processus de dégradation dans la nature (Grossr, 1956).

III.3.2. Valorisation des plumes de volaille

Les plumes et duvets sont, comme la laine et le cuir ; des coproduits de l'industrie alimentaire. Ces deux matières naturelles ont des caractéristiques physiques spécifiques. En effet, leur pouvoir isolant et leur légèreté, leur donne la propriété d'être utilisées dans de nombreuses applications courantes(Diarra, 2014). Donc, les plumes ne doivent pas, sauf cas particulier, être considérés comme des déchets au sens habituel du terme, mais plutôt comme une matière première naturelle traditionnelle, au même titre que le cuir, la laine, les peaux de lapins,...etc.(Diarra, 2014).

III.4.Application des kératinases

Bien que les kératines résistent à l'hydrolyse, leur accumulation ne se produit pas dans la nature en raison de la spécialisation des micro-organismes kératinolytiques tels que les mésophiles qui sont les mieux étudiés. Chaque année, les industries produisent des quantités significatives de déchets contenant de la kératine générant ainsi un besoin urgent de son utilisation (Dalev, 1994 ; Friedrich, 1996).L'utilisation des kératinases microbiennes (kératine-hydrolysant les protéines) peut être une méthode écologique puissante et sûre pour utiliser les déchets de kératine par biodégradation(Kublanovet *al.*,2009)offrant la possibilité de recycler ces résidus en précieux produits, protégeant ainsi l'environnement en minimisant le gaspillage (Daroit *et al.*, 2009; Kublanovet *al.*, 2009; Syed *et al.*, 2009).

Les kératinases microbiennes sont considérées comme des biocatalyseurs prometteurs à plusieurs fins, tel que leurs applications dans, l'industrie des engrais, pharmaceutique et biomédicale, des détergents, du cuir et du textile (Onifade *etal.* 1998; Gupta et Ramnani 2006; Brandelli, 2008). Malgré ceci, l'application industrielle et la demande du marché des kératinases, par rapport aux autres enzymes industrielles, est toujours modérée(Rai et *al.*,2009). Un résumé des applications actuelles des kératinases sont présentées dans le **tableau IV.**

Tableau IV : Application potentielle des kératinases microbiennes (Brandelli *et al.*,2010).

industrie	Applications
Industrie agro-alimentaire.	-production de l'hydrolysate d'aliments. -compliments alimentaires. -production d'entomopathogènes. -production d'engrais azotés.
Pharmaceutique-biomédicale	-hydrolyse du prion -amélioration de l'administration des médicaments - traitements dermatologiques -Produits de beauté
Industrie.	-Traitement du cuir (tannerie). -Modification de fibre (textiles). -Détergents. -Modification de la fonctionnalité des protéines (aliments), -Biopolymères (films, revêtements, colles). -Traitement des eaux usées / gestion des déchets.
Biomasse/bioénergie.	-Bioconversion des déchets kératiniques pour la production ultérieure de méthane ou de biohydrogène.

III.5. Les Enzymes de l'actinomycète

La Biodégradation par les kératinases produites par les actinomycètes représente une méthode alternative pour améliorer la valeur nutritionnelle des déchets de kératine (Noval et Nickerson, 1959; Young et Smith,1975 ; Mukhopadhyay et Chandra ,1990 ; Böckle *et al.*,1995). Les actinomycètes du genre *Streptomyces*,à savoir *S.fradiae*, *S.pactum*, *S.albidoflavus*, *S.thermoviolaceus*SD8et *S.graminofaciens*, et du genre de *Thermoactinomyces* à savoir *T.candidus*, sont communément décrit comme dégradeur de la kératine avec une capacité d'agir sur une grande variété de substrat, y compris la kératine des cheveux, la laine et des plumes (Gupta et Ramnani, 2006) .

Matériels et Méthode

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans ce travail est résumé en (Annexe I).

2. Matériel biologique

2.1. Microorganisme test

Les souches d'actinomycètes étudiées dans ce présent travail font partie de la collection de Mme BOUDRIES affiliée au Laboratoire de Microbiologie Appliquée(LMA) de l'université A. Mira de Bejaia. Ces souches ont été isolées sur milieu SCA (Starch Casein Agar) à partir d'un échantillon d'eau polluée de la région de Bejaïa et conservées à température ambiante.

2.2. Germes cibles utilisés

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

Bactéries à Gram positif

Staphylococcus aureus ATCC 25923.

SARM ATCC 43300.

Bactéries à Gram négatif

Escherichia coli ATCC 25922.

Salmonella typhi ATCCATCC 14028.

II. Méthodologie

II.1. Purification des souches d'actinomycètes

Avant d'entamer l'étude expérimentale, une vérification de la pureté de 10 souches d'actinomycètes est réalisée sur le milieu Minceur 50% d'eau de mer (MEM) ayant servi pour leur conservation et dont la composition est donnée (Annexe II).

II.2. Sélection des souches protéolytiques

II.2.1 .Test d'activité protéolytique

Afin de détecter l'activité protéolytique, les souches d'actinomycètes (NA1, AB3, NA4, ALB20 et NOP 24) sont repiquées sur gélose nutritive au lait (GNL) (Annexe II) puis incubés à 28 °C pendant 9 jours.

Le test d'activité est basé sur la diffusion de protéases secrétées par ces souches dans le milieu de culture et la dégradation de la caséine du lait au tour de la colonie.

II.3. Sélection de souche kératinolytiques

II.3.1. Préparation du substrat

Le substrat utilisé pour la mise en évidence de l'activité kératinolytique des souches sélectionnées est la farine de plumes issue des plumes (**Fig.06**) gracieusement offertes par une tuerie de volaille à Bejaïa. Les étapes de transformations des plumes de volaille en farine sont décrites ci-dessous :

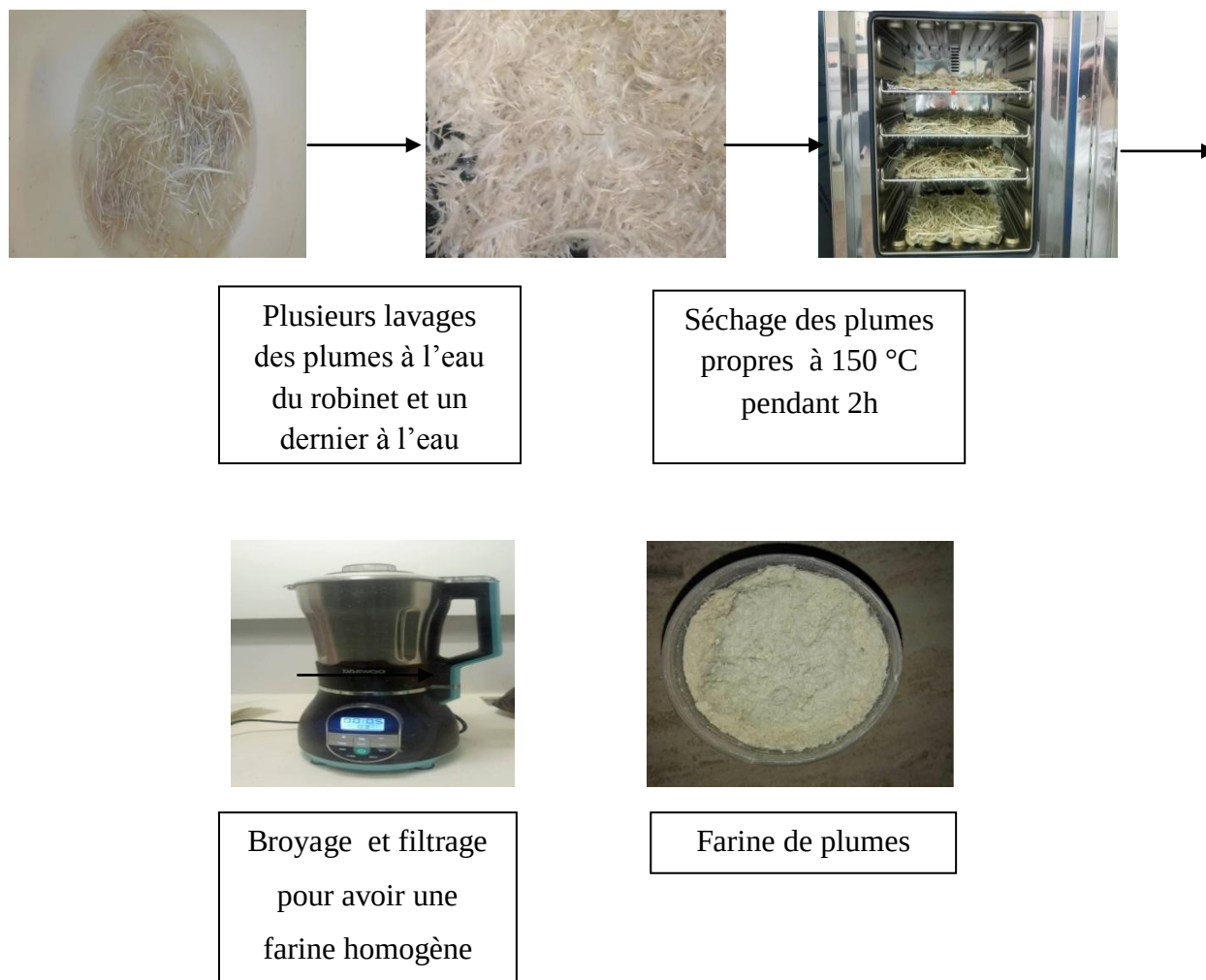


Figure 06: Schéma représentant les étapes de préparation de la farine de plumes

II.3.2. Culture en milieu solide

Afin de cribler l'activité kératinolytique, les isolats (ALB20 et NOP24) sont ensemencés sur milieu solide à base de farine de plume (FBMS) selon la méthode de Williams et ses collaborateurs (1990) (Annexe II) puis incubés à 28°C pendant 9 jours.

II.3.3. Culture en milieu liquide

Dans le but de mettre en évidence et de doser l'activité kératinolytique des souches ayant montré une bonne croissance sur milieu FBMS, ces dernières sont ensemencées sur le même milieu liquide à base de farine de plumes (FBML) (Annexe II). Les cultures sont réalisées dans des flacons de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu FBML. **(Fig.07)** Ensemencés avec des cylindres d'agar à raison de 3 cylindres d'une culture de la souche correspondante sur le milieu FBMS. Les cultures liquides sont incubées à 28°C sous agitation (IKALABORTECHNIK) tel que le montre la **(fig. .08)** pendant 4 jours.



Figure 07 : Culture sur milieu liquide à base de farine de plume (FMBL).

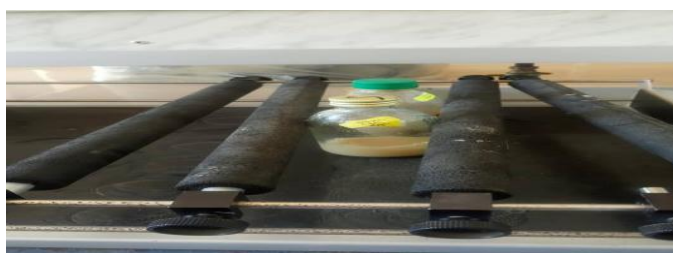


Figure 08 : Culture liquide sous agitation.

II.4 .Test d'activité kératinolytique

Le dosage de l'activité kératinolytique des souches est réalisé sur le surnageant de culture récupéré après une centrifugation à 6000 ×g pendant 20 min à 4°C.

4.1. Préparation du substrat kératinolytique

Le substrat est préparé selon la méthode de Gradisar *et al.*, (2005) qui consiste à une :

✓ **Extraction de la kératine des plumes**

Le substrat utilisé (la kératine) est préparée à partir de (5g) de farine de plumes dissoute dans 250 ml diméthyle sulfo oxyde(DMSO) le mélange est ensuite chauffé dans un évaporateur (BUCHI Rotavapor R-200rotatif) pendant 4h (**Fig.09**).



Figure 09 : Extraction de la kératine des plumes.

✓ **Précipitation du substrat**

Le substrat est précipité pendant 2h par l'addition de 500 ml d'acétone refroidis à -80°C (**Fig.10**).

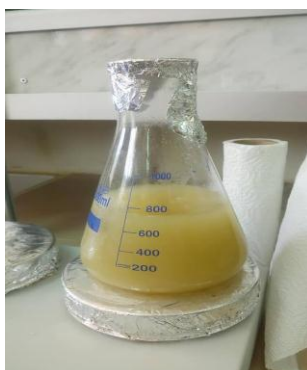


Figure 10 : precipitation du substrat.

✓ **Concentration et récupération du substrat**

La solution d'acétone est centrifugée à 5000 $\times g$ pendant 20 min à 4°C, le culot est ensuite récupéré et lavé abondamment à l'eau distillée, puis séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre (**Fig.11**).



Figure 11 : La kératine de plumes.

4.2. Dosage de l'activité kératinolytique

1g de farine de plumes est dissout dans 20ml de NaOH (1N) (Annexe III) le mélange est ajusté à pH=8 par une solution HCl (1N), la solution est diluée avec 200 ml de tris-HCl (0,05 M, pH8) (Annexe III) pour obtenir un substrat à utiliser (**Fig.12**).



Figure 12: Substrat de l'activité kératinolytique.

Le dosage de l'activité kératinolytique des isolats d'actinomycètes sélectionnés consiste à mélanger 1ml de la solution de kératine de plumes (substrat) avec 1 ml du surnageant de culture de la souche étudiée. Ce mélange est incubé au bain marie à 50°C pendant 10 minutes. Parallèlement des témoins sont préparés dans les mêmes conditions sans surnageant. La réaction est arrêtée par l'addition de 2ml de TCA (0.4M) (annexe III), et de 1ml de surnageant aux témoins. Enfin le mélange est incubé 5min dans un bain de glace, puis centrifugé pendant 20 min à 5000xg.

L'activité enzymatique est évaluée par mesure de l'absorbance à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UVmin-1240).

L'activité est calculée selon la formule suivante :

$$U = \frac{4 \times n \times A_{280}}{(0,01 \times 10)}$$

- ❖ n : le taux de dilution.
- ❖ 4 : le volume final (ml) de la réaction.
- ❖ 10 : le temps d'incubation (min).

Une unité (UI/ml) de l'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la DO_{280} par rapport au blanc, de 0,01 par minute dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

III. Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes

Afin de tester l'aptitude des souches étudiées à produire des antibiotiques, les isolats d'actinomycètes ALB 20, NOP 24 sont ensemencés en stries serrées à la surface des milieux MEM (Annexe II), Après incubation à 28°C pendant 10 jours, le test d'activité est effectué par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis de deux bactéries à Gram positif (*S. aureus* et SARM) deux bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Sal. Typhi*).

III. 1. Test des cylindres d'agar (Bastide et al, 1986)

La mise en évidence de l'activité antibactérienne est réalisée par la méthode des cylindres d'agar. Pour chaque germe cible, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18 à 24 h sur milieu Chapman (Annexe II) pour les deux souches *S.aureus* et SARM, et sur le milieu gélose nutritive (GN) (Annexe II) pour les autres germes cibles. La charge cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une concentration finale de 10^7 UFC/ml.

Après incubation à 28°C, pendant 10 jours, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce. Ces derniers sont ainsi déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton (MH) (Annexe II) préalablement ensemencés par écouvillonnage avec le germe cible. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'agar sont mises à 4 °C pendant 2 h pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives produites par les souches d'actinomycètes étudiées, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. La lecture est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibition (en mm) autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre étant pris en compte).

III .2 .Etude morphologique des souches d'actinomycètes

III .2.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude consiste à déterminer la croissance en déterminant la couleur des mycéliums aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles produits sur différents milieux de culture : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6 (Shirling et Gottlieb, 1966), Dont la composition est donnée en (Annexe II).

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans ce travail est résumé en (Annexe I).

2. Matériel biologique

2.1. Microorganisme test

Les souches d'actinomycètes étudiées dans ce présent travail font partie de la collection de Mme BOUDRIES affiliée au Laboratoire de Microbiologie Appliquée(LMA) de l'université A. Mira de Bejaia. Ces souches ont été isolées sur milieu SCA (Starch Casein Agar) à partir d'un échantillon d'eau polluée de la région de Bejaïa et conservées à température ambiante.

2.2. Germes cibles utilisés

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

Bactéries à Gram positif

Staphylococcus aureus ATCC 25923.

SARM ATCC 43300.

Bactéries à Gram négatif

Eshrechia coli ATCC 25922.

Salmonella typhi ATCCATCC 14028.

II. Méthodologie

II.1. Purification des souches d'actinomycètes

Avant d'entamer l'étude expérimentale, une vérification de la pureté de 10 souches d'actinomycètes est réalisée sur le milieu Minceur 50% d'eau de mer (MEM) ayant servi pour leur conservation et dont la composition est donnée (Annexe II).

II.2. Sélection des souches protéolytiques

II.2.1 .Test d'activité protéolytique

Afin de détecter l'activité protéolytique, les souches d'actinomycètes (NA1, AB3, NA4, ALB20 et NOP 24) sont repiquées sur gélose nutritive au lait (GNL) (Annexe II) puis incubés à 28 °C pendant 9 jours.

Le test d'activité est basé sur la diffusion de protéases secrétées par ces souches dans le milieu de culture et la dégradation de la caséine du lait au tour de la colonie.

II.3. Sélection de souche kératinolytiques

II.3.1. Préparation du substrat

Le substrat utilisé pour la mise en évidence de l'activité kératinolytique des souches sélectionnées est la farine de plumes issue des plumes (**Fig.06**) gracieusement offertes par une tuerie de volaille à Bejaïa. Les étapes de transformations des plumes de volaille en farine sont décrites ci-dessous :

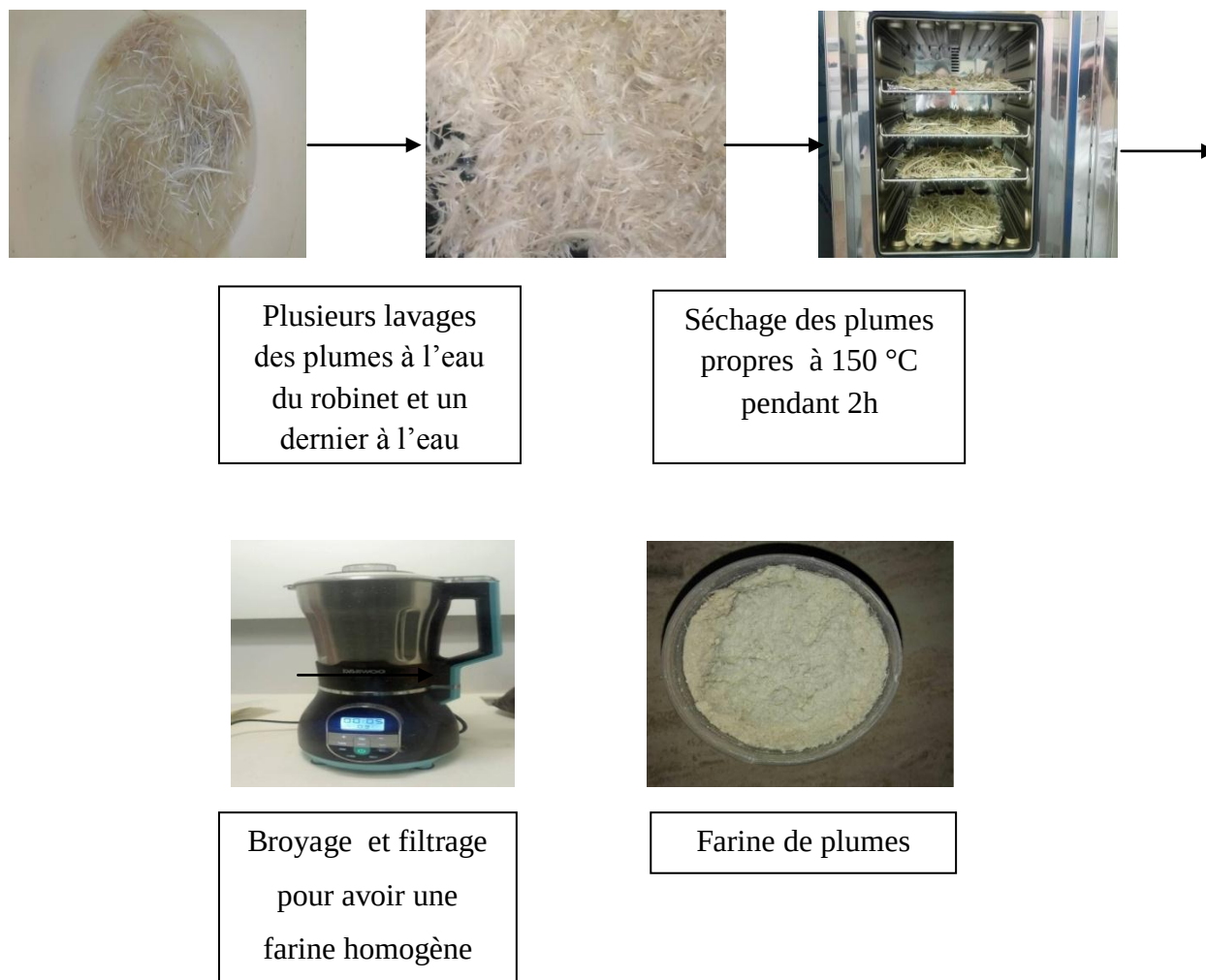


Figure 06: Schéma représentant les étapes de préparation de la farine de plumes

II.3.2. Culture en milieu solide

Afin de cribler l'activité kératinolytique, les isolats (ALB20 et NOP24) sont ensemencés sur milieu solide à base de farine de plume (FBMS) selon la méthode de Williams et ses collaborateurs (1990) (Annexe II) puis incubés à 28°C pendant 9 jours.

II.3.3. Culture en milieu liquide

Dans le but de mettre en évidence et de doser l'activité kératinolytique des souches ayant montré une bonne croissance sur milieu FBMS, ces dernières sont ensemencées sur le même milieu liquide à base de farine de plumes (FBML) (Annexe II). Les cultures sont réalisées dans des flacons de 250 ml contenant chacun 50 ml de milieu FBML. **(Fig.07)** Ensemencés avec des cylindres d'agar à raison de 3 cylindres d'une culture de la souche correspondante sur le milieu FBMS. Les cultures liquides sont incubées à 28°C sous agitation (IKALABORTECHNIK) tel que le montre la **(fig. .08)** pendant 4 jours.



Figure 07 : Culture sur milieu liquide à base de farine de plume (FMBL).

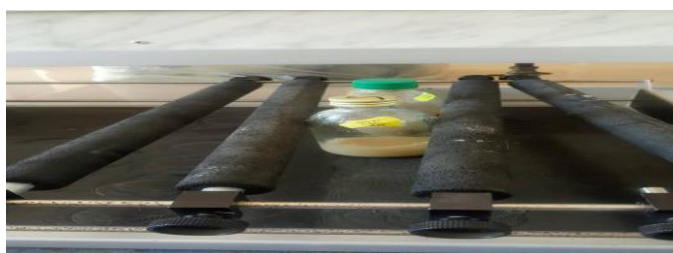


Figure 08 : Culture liquide sous agitation.

II.4 .Test d'activité kératinolytique

Le dosage de l'activité kératinolytique des souches est réalisé sur le surnageant de culture récupéré après une centrifugation à 6000 ×g pendant 20 min à 4°C.

4.1. Préparation du substrat kératinolytique

Le substrat est préparé selon la méthode de Gradisar *et al.*, (2005) qui consiste à une :

✓ **Extraction de la kératine des plumes**

Le substrat utilisé (la kératine) est préparée à partir de (5g) de farine de plumes dissoute dans 250 ml diméthyle sulfo oxyde(DMSO) le mélange est ensuite chauffé dans un évaporateur (BUCHI Rotavapor R-200rotatif) pendant 4h (**Fig.09**).



Figure 09 : Extraction de la kératine des plumes.

✓ **Précipitation du substrat**

Le substrat est précipité pendant 2h par l'addition de 500 ml d'acétone refroidis à -80°C (**Fig.10**).

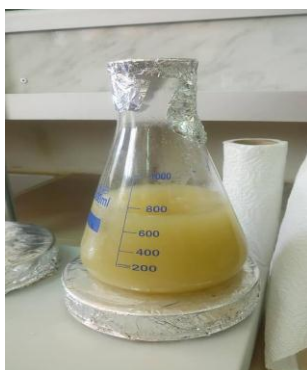


Figure 10 : precipitation du substrat.

✓ **Concentration et récupération du substrat**

La solution d'acétone est centrifugée à 5000 $\times g$ pendant 20 min à 4°C, le culot est ensuite récupéré et lavé abondamment à l'eau distillée, puis séché à 50 °C jusqu'à l'obtention d'une poudre (**Fig.11**).



Figure 11 : La kératine de plumes.

4.2. Dosage de l'activité kératinolytique

1g de farine de plumes est dissout dans 20ml de NaOH (1N) (Annexe III) le mélange est ajusté à pH=8 par une solution HCl (1N), la solution est diluée avec 200 ml de tris-HCl (0,05 M, pH8) (Annexe III) pour obtenir un substrat à utiliser (**Fig.12**).



Figure 12: Substrat de l'activité kératinolytique.

Le dosage de l'activité kératinolytique des isolats d'actinomycètes sélectionnés consiste à mélanger 1ml de la solution de kératine de plumes (substrat) avec 1 ml du surnageant de culture de la souche étudiée. Ce mélange est incubé au bain marie à 50°C pendant 10 minutes. Parallèlement des témoins sont préparés dans les mêmes conditions sans surnageant. La réaction est arrêtée par l'addition de 2ml de TCA (0.4M) (annexe III), et de 1ml de surnageant aux témoins. Enfin le mélange est incubé 5min dans un bain de glace, puis centrifugé pendant 20 min à 5000xg.

L'activité enzymatique est évaluée par mesure de l'absorbance à 280nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Shimadzu UVmin-1240).

L'activité est calculée selon la formule suivante :

$$U = \frac{4 \times n \times A_{280}}{(0,01 \times 10)}$$

- ❖ n : le taux de dilution.
- ❖ 4 : le volume final (ml) de la réaction.
- ❖ 10 : le temps d'incubation (min).

Une unité (UI/ml) de l'activité kératinolytique est définie comme étant l'augmentation de la DO_{280} par rapport au blanc, de 0,01 par minute dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus.

III. Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes

Afin de tester l'aptitude des souches étudiées à produire des antibiotiques, les isolats d'actinomycètes ALB 20, NOP 24 sont ensemencés en stries serrées à la surface des milieux MEM (Annexe II), Après incubation à 28°C pendant 10 jours, le test d'activité est effectué par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis de deux bactéries à Gram positif (*S. aureus* et SARM) deux bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Sal. Typhi*).

III. 1. Test des cylindres d'agar (Bastide et al, 1986)

La mise en évidence de l'activité antibactérienne est réalisée par la méthode des cylindres d'agar. Pour chaque germe cible, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18 à 24 h sur milieu Chapman (Annexe II) pour les deux souches *S.aureus* et SARM, et sur le milieu gélose nutritive (GN) (Annexe II) pour les autres germes cibles. La charge cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile de façon à obtenir une concentration finale de 10^7 UFC/ml.

Après incubation à 28°C, pendant 10 jours, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce. Ces derniers sont ainsi déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton (MH) (Annexe II) préalablement ensemencés par écouvillonnage avec le germe cible. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'agar sont mises à 4 °C pendant 2 h pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives produites par les souches d'actinomycètes étudiées, puis incubées à 37 °C pendant 24 h. La lecture est effectuée par mesure du diamètre des zones d'inhibition (en mm) autour des cylindres d'agar (le diamètre du cylindre étant pris en compte).

III .2 .Etude morphologique des souches d'actinomycètes

III .2.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude consiste à déterminer la croissance en déterminant la couleur des mycéliums aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles produits sur différents milieux de culture : ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6 (Shirling et Gottlieb, 1966), Dont la composition est donnée en (Annexe II).

Résultats et discussion

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie de l'université A. Mira de Bejaia durant la période allant 07/02/2018 au 14/05/2018, sous la direction de M^{me} BOUDRIES.

Dans ce qui suit, seront présentés les résultats et la discussion des principales parties de ce travail relatives à l'étude de la mise en évidence de l'activité kératinolytique et antibactérienne des souches d'actinomycètes ainsi qu'une caractérisation macromorphologique.

I. Purification des souches d'actinomycètes

Dans le but de purifier des souches d'actinomycètes, un milieu de culture MEM ayant servis à leur conservation a été utilisé. dix souches d'Actinomycètes ont été ensemencées sur ce milieu. Leur purification a nécessité dix repiquages ce qui a permis l'obtention de 5 souches d'actinomycètes pures, pour réaliser le reste de l'expérimentation.

II. Sélection des souches protéolytiques

II.1. L'activité protéolytique

Les 5 souches d'actinomycètes sélectionnées (NA1, AB3, NA4, ALB20 et NOP 24) sont ensemencées par spots sur milieu GNL solide à base de lait écrémé et incubées pendant neuf jours à 28°C. Parmi les isolats testés seul NOP 24 et ALB 20 ont présentés un halo translucide autour de leurs colonies (**Fig.13**).

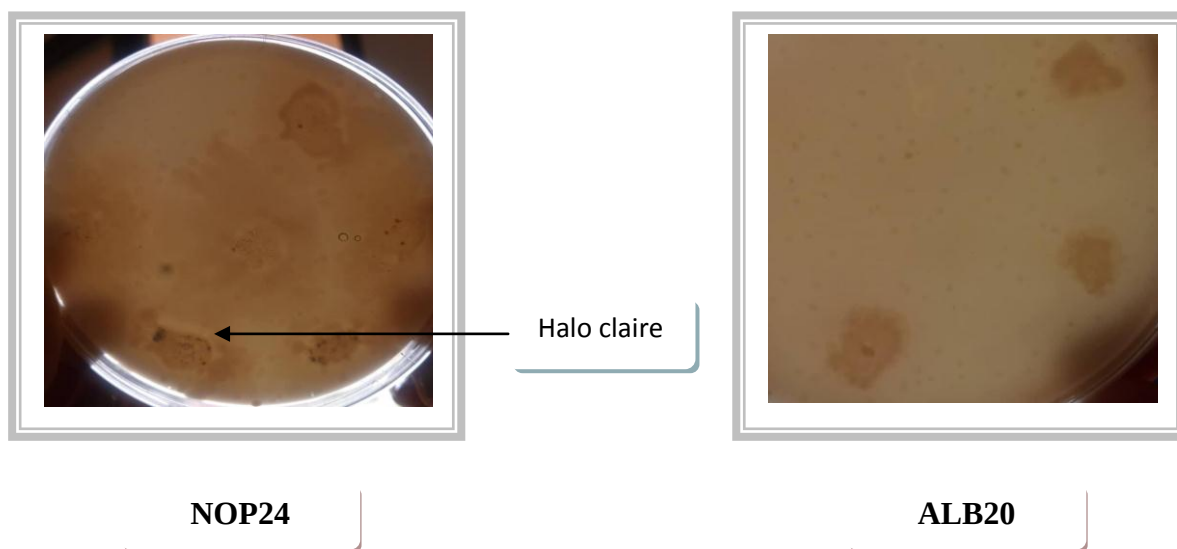


Figure 13 : Evaluation de l'activité protéolytique des souches NOP 24 et ALB20.

Les deux isolats NOP24 et ALB20 présentent des halos translucide autours de leurs colonies, contrairement aux isolats NA1, AB3, NA4 qui ne présentent aucun halo ce qui indique l'absence de l'activité protéolytique de ces souches.

Le diamètre des halos entourant les colonies des souches protéolytiques est proportionnel à la quantité de protéases libérées par ces colonies et à la diffusion des enzymes secrétées dans le milieu pendant le temps d'incubation.

Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche après 9 jours d'incubation. Sont représentés dans le **tableau V**

Tableau V : le rapport du diamètre de l'halo (mm) sur le diamètre de la colonie (mm),

Souche	Diamètre de l'halo en (mm)	Diamètre de la colonie en (mm)	Rapport
NOP24	18	9	2
ALB20	19	14	1,35

Les résultats obtenus après incubation sur le milieu sélectif indiquent que les deux souches sont dotées d'une activité protéolytique. Cette observation démontre clairement que, d'une part, ces actinomycètes sont capables d'hydrolyser la caséine du lait (protéine), et d'autre part, que les enzymes responsables de cette hydrolyse sont secrétées dans le milieu extérieur. Ce résultat permet de considérer ces souches comme productrices de protéases extracellulaires, ce qui représente un point très positif pour leur production et leur caractérisation.

Les deux souches ont des diamètres de croissance et d'hydrolyse considérable, ce qui a permis leur sélection pour la suite du travail.

Plusieurs études sur des souches d'actinobactéries ont rapporté la capacité de ces dernières à produire des protéases. Une étude menée par Nandini *et al.*, (2015) a rapporté la formation d'une zone de catalyse indiquant la production des protéases par des actinobactéries isolés d'un territoire régional autour des fermes de volailles alors que Selvam *et al.*, (2013) ont pu démontrés que des souches d'actinobactérie isolées à partir d'un échantillon de sol marin prélevé de la région côtière du sud de l'Inde peuvent dégrader la caséine (gélose au lait) et le soja (la farine de soja) ce qui confirme leur activité protéolytique. Selon (Ramamy *et al.*, 2016) la souche *Nocardiopsis* sp. SD8 a formé une zone de translucide autour de ces colonies indiquant son activité protéolytique.

D'autres études menées par Kumar et *al.*, (2012) et Xu et *al.* (2009) ont montré la capacité de *Bacillus megatarium* D1 isolées du sol prélevé de la zone d'élimination des déchets de volaille à produire des protéases.

III. Sélection des souches kératinolytiques

En vue de tester l'activité kératinolytiques les isolats NOP 24 et ALB 20 ayant montré une activité protéasique, sont cultivées par stries sur milieu FBM solide et incubées à 28°C pendant 9 jours. Les résultats obtenus montrent que les deux isolats (NOP 24, ALB 20) peuvent dégrader facilement la farine de plumes ce qui prouve que les 2 souches sont actives sur ce substrat par sécrétion de kératinases (**Fig.14**). Le choix de la farine de plume comme seule source de carbone et d'azote dans ce milieu de culture (FBMS) est très important pour la croissance des souches kératinolytiques. Ce milieu présente plusieurs avantages tels que la simplicité de préparation, la variété, la richesse en kératine et le faible cout.

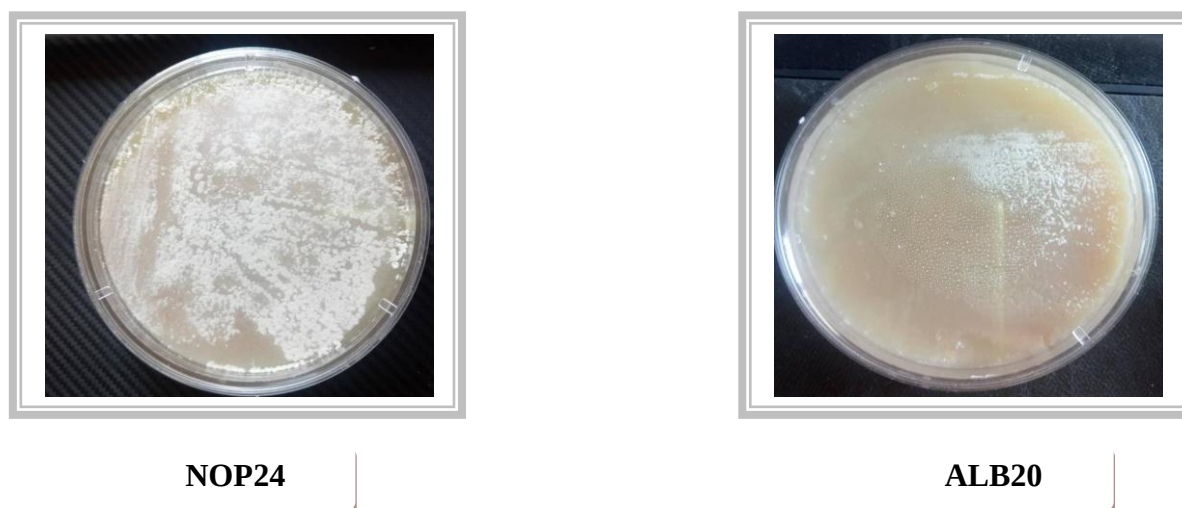


Figure 14 : Evaluation de l'activité kératinolytique des souches NOP 24 et ALB20.

Dans une étude menée par Dastager et *al.*, (2009), les auteurs ont conclu que la souche *Streptomyces gulbargensis* produit des kératinases associées à une croissance maximale. Les *Streptomyces* spp isolées de l'eau de mer Méditerranéenne ont été définie comme produisant de la kératinase sur le substrat de plume entière aussi très actif sur le substrat de son de blé (Azza et Abdel-Fattah, 2013). Le même résultat a été obtenu par (El-Gendy ,2010) qui a produit la keratinase constitutivement sur de la paille de riz solide.

IV .Test d'activité kératinolytique

Dans le but de doser l'activité kératinolytique des deux isolats étudiés, une culture est préparée sur milieu liquide à base de farine de plume FBML des isolats kératinolytiques NOP 24 et ALB 20,

Le substrat kératinolytique utilisé est préparé selon la méthode de Gradisar *et al.*,(2005) et l'activité est détectée par mesure de l'absorbance à 280nm, les résultats de l'activité kératinolytique des 2 isolats NOP 24 et ALB 20 sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau VI; Résultats de l'activité kératinolytiques des souches NOP 24 et ALB 20.

Isolat	Absorbance en (nm)	Activité kératinolytique en (UI/ml)
NOP24	0,06	2,4
ALB20	0,05	2

D'après les résultats mentionnés dans le tableau précédent les deux souches étudiées présentent des activités kératinolytiques équivalentes de 2,4 et 2 UI/ml pour la souche NOP 24 et ALB 20 respectivement.

Des études menée par Mona(2008) et Selvam *et al.* , (2012) ont rapportés des activités correspondantes a 9.11U/ml et 71.43U/ml pour les souches *Streptomyces sp.* MS-2 et *Streptomyces albogriseolus* NGP respectivement.

Une étude menée par Mehwish *et al.*, (2017) a rapporté une activité de 21.1UI/ml pour la souche *Bacillus megatarium* D1 isolée du sol de la zone d'élimination des déchets de volaille.

Ainsi nos souches s'avères être peu performantes sur la kératine des plumes utilisée et dans les conditions expérimentales réalisées. Cela pourrait s'expliquer par la faible affinité des enzymes produites vis-à-vis de la kératine des plumes testée exigeant ainsi d'autres expériences utilisant d'autres sources de kératine, ou alors par la faible concentration de kératinases produites nécessitant des modifications de l'une ou de plusieurs conditions opératoires afin d'optimiser la production d'une part et l'activité de ces enzymes d'autre part.

V. Activité antibactérienne des souches étudiées ALB 20 et NOP 24

L'activité antibactérienne des deux isolats ALB20 et NOP24 est mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar qui permet de détecter l'effet inhibiteur des souches

d'actinomycètes envers les germes cibles testés. Ce test est réalisé sur le milieu Muller-Hinton vis-à-vis de quatre bactéries à savoir *Staphylococcus aureus*, SARM, *Escherichia .coli*, et *Salmonella typhi* et les résultats sont représentés dans la **fig 15**

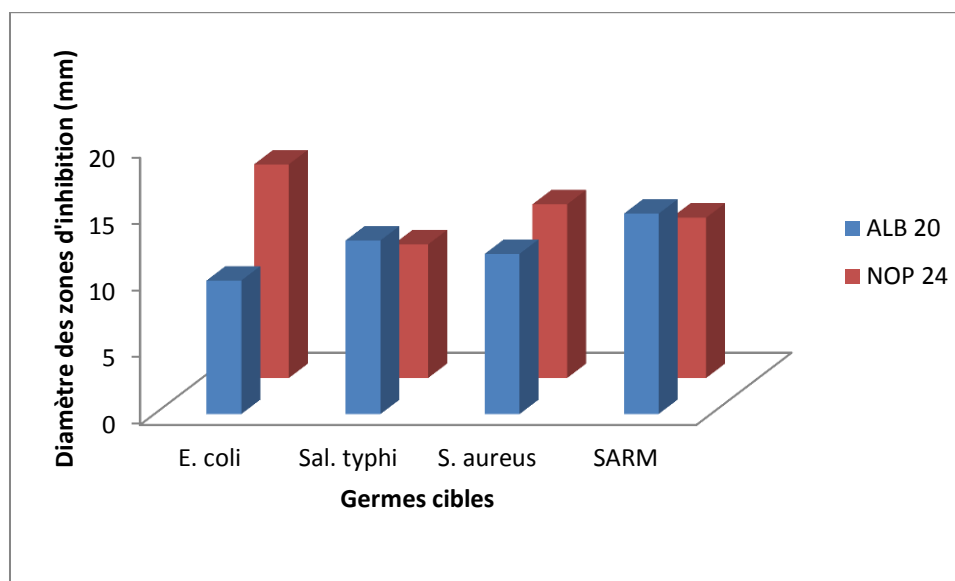


Figure 15:Activité antibactérienne des isolats ALB20 et NOP 24.

D'après les résultats ci-dessus les deux souches étudiées montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des quatre bactéries testées avec des diamètres des zones d'inhibition variant de 10 mm (noté pour *E. coli*) à 15 mm (noté pour le SARM) enregistrés pour la souche ALB20 et de 10 mm (noté pour *Sal. typhi*) à 16 mm (noté pour *E. coli*) avec la souche NOP24 (**Fig.15**), cette figure illustre une activité des deux isolats étudiés à l'égard des Gram + et des Gram- testés. Cette activité peut être due à différentes molécules ayant un spectre d'action étroit (vis-à-vis des Gram + ou des Gram -) ou bien à des molécules possédant un spectre élargie (à l'égard des deux type à la fois).

Parmi, les antibiotiques des actinomycètes, 80% ont des propriétés assez diverses : antibactérienne, à la fois antibactérienne et antifongique, antiviral, anti-tumorales, insecticides,... etc. et les 20% représentent les antifongiques (Sanglier *et al.*, 1996).

VI. Etude morphologique des souches d'actinomycètes

En vue d'un début de caractérisation des actinomycètes étudiés une caractérisation macromorphologique sur les milieux ISP préconisés par Shirling et Gottlieb, (1966) est réalisée.

VI. 1Caractères macromorphologiques

Des observations des cultures des 2 isolats cultivés sur divers milieux (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP 6) à 28°C sont réalisées après 7 jours d'incubation. D'après les résultats présentés sur le **tableau VII**, ci-dessous.

Tableau VII : Résultats de caractéristiques culturales des isolats d'actinomycètes sur les milieux ISP.

Caractère		Croissanc	Sporulatio	MA	MS	PS	PM
Isolats		e	n				
ISP1	ALB 20	++	+	++ blanc	++ blanc	-	-
	NOP 24	+++	+++	+++ beige-blanc	blanc	-	-
ISP2	ALB 20	+++	+++	+++ blanc- grisâtre	+++ blanc	-	-
	NOP 24	+++	+++	+++ beige-blanc	blanc	-	-
ISP3	ALB 20	+++	+++	+++ verdâtre	+++ gris- verdâtre	-	-
	NOP 24	+++	+++	+++ beige- verdâtre	blanc	-	-
ISP4	ALB 20	+++	+++	+++ blanc	+++ blanc	-	-
	NOP 24	+++	+++	+++ blanc	blanc	-	-
ISP6	ALB 20	+++	+++	+++ blanc- grisâtre	+++ blanc		-
	NOP 24	+++	+++	blanc	blanc		-

. MA : mycélium aérien. MS : mycélium du substrat. PS : pigment solubles. PM: pigments mélanoïdes. +++ : Abondant. ++ : Modéré. + : faible. - : inexistant

- L'isolat **ALB20** présente une croissance importante sur : ISP2, ISP3, ISP4, ISP6 , et moyenne sur ISP1. Le mycélium végétatif est blanc sur tous les milieux testés à l'exception de l'ISP 3 sur lequel ce mycélium est gris-verdâtre. L'isolat a sporulé sur tous les ISP testés. Cependant aucun pigments diffusible ni mélanoïde n'est observé

- La souche **NOP24** se développe bien sur les cinq milieux ISP testés. La couleur du MA est blanche sur l'ISP4, l'ISP6 alors qu'elle est beige- verdâtre sur l'ISP3 et beige-blanc sur l'ISP1 et l'ISP2. Aucun pigment n'est produit sur ces milieux



Figure 16 : Macromorphologie des souches ALB20 et NOP24 sur les milieux ISP.

Les bactéries appartenant à certains genres actinomycetale présentent des caractéristiques typiques et sont en effet, facilement reconnaissables, particulièrement la forme des colonies ainsi que leurs aspect (présence de MA et du MS) mais également la disposition des chaines de spores et leur agencement. En effet Selon Shirling et Gottlieb (1966), l'identification des actinobactéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinobactéries (*Streptomyces*, *Strepstovercillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (Williams *et al.*, 1993).

Conclusion et perspective

Dans le cadre de la recherche des enzymes kératinolytiques produites par des actinomycètes locales et d'étudier leur activité antagoniste vis-à-vis de deux Gram positif et deux Gram négatif, dix souches d'actinomycètes isolées à partir d'un échantillon d'eau polluée de la région de Bejaia ont été purifiées et repiquées sur milieu MEM.

La mise en évidence de l'activité protéolytique a été réalisée sur milieu GNL à 28°C. Cette culture a révélé, que deux souches sont relativement capables de former un halo de protéolyse autour des colonies. ce qui a permis leur sélection pour la suite du travail.

Afin de tester la capacité des souches à dégrader la farine de plumes, les deux souches retenues ALB20 et NOP 24 ont été cultivées sur milieu solide à base de farine de plumes (FBMS) pour tester leur activité kératinolytique après incubation à 28°C pendant 9 jours.

Les deux souches retenues après culture sur milieu FBMS la ALB20 et NOP 24, sont mise en culture sur milieu liquide à base de farine de plumes FBML afin d'estimer leur croissance bactérienne et de doser leur activité kératinolytique.

Le dosage de l'activité kératinolytique a révélé une production de kératinases après 4 jours d'incubation pour les deux souches équivalentes à 2,4UI/ml pour la souche NOP24 est 2UI/ml pour la souche ALB20. Cela pourrait être dû à la faible affinité entre les kératinases produites par les souches et le substrat utilisé ou à la faible production des kératinases par les souches dans les conditions opératoires utilisées.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test d'antagonisme vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, SARM, *Escherichia coli*, et *Salmonella typhi*). Les résultats ont montré que les deux souches testées possèdent une action antagoniste assez importante sur les quatre germes cibles testés.

Les deux souches ont fait objet d'une étude macromorphologique basée sur l'observation de leurs caractères culturels sur les milieux ISP en boîtes de Pétri. Cette étude a mis en relief différents caractères macromorphologiques distincts des deux isolats.

Au terme de ce travail, les résultats obtenus ouvrent d'autres perspectives et méritent d'être complétés par:

- Une Optimisation du milieu et des conditions de culture pour un meilleur rendement ;
- Un test d'activité des souches avec d'autres substrats pour évaluer son éventuel intérêt dans d'autres applications.
- Une identification et caractérisation des protéases produites.
- Elargir le spectre d'activité antimicrobien.
- Un test d'autre activité biologique.

*Références
bibliographiques*

A

- ❖ **Amanullah.A., Justen.P, Davies.A, Paul.G.C, Nienow. A.W, Thomas C.R.** (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *BiochemEng J*.5 : 109–114.
- ❖ **Anbu. P, Hilda.A, Sur.H.W, Hur .B.K, Jayanthi. S.** (2008) .Extracellular keratinase from *Trichophyton* sp. HA-2 isolated from feather dumping soil. *Int BiodeteriorBiodegrad* 62:287–292.
- ❖ **Anbu.P,Gapinath.S.C,Hilda.A,Lakshmipriya.T,Annadurai.G.**(2007).Optimizations of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresour Technol*. 98:1298-1303,
- ❖ **anonyme I :** ProteaseResearch. (page consultée 15 septembre 2012). [en ligne] Adresse URL:<http://proteases.org/structure.php?start=240>.
- ❖ **Anonyme II** Université d'Angers. Biochimie (Position des ponts disulfures dans un peptide). France (page consultée 19 Juin 2011) [en ligne] Adresse URL :<http://biochimej.univangers.fr/Page2/TexteTD/7ModuleS6BG3/ZSuite/7PositionPontDiul/1PosPontDisul.htm> .
- ❖ **Azeredo .L, Lima.M, Coelho.R, Freire.D**(2006). Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp in submerged and solid-state fermentations using feather meal. *J. Appl. Microbiol*. 100:641-647.
- ❖ **Azza M. Abdel-Fattah.** (2013). Novel keratinase from marine *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza exhibiting remarkable hide dehairing. *Egypt Pharm J*. 12:142–147.

B

- ❖ **Badji .B, Zitouni .A, Mathieu.F, Lebrihi.A, Sabaou .N .** (2006).Antimicrobial compounds produced by *Actinomadurasp* AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can.J. Microbiol*. 52: 373–382.
- ❖ **Bagewadi. Z .K ,Vernekar .A.G, Patil .A.Y, Limaye .A.A ,Jain. V.M.**(2011). Biodegradation of industrially important textile dyes by actinomycetes isolated from activated sludge. *Biotechnol Bioinf Bioeng*. 1 : 351-360 .
- ❖ **Bastide.A, de Méo.M, Andriantsoa.M, Laget.M, Duménil . G.** (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de

structure non-polyéniques. *Mircen journal of appliedmicrobiology and biotechnology*. 2: 453-466.

- ❖ **Bernal .C, Cairo.J, Coello.N.** (2006). Purification and characterization of a novelexocellular keratinase fromKocuriarosea. *EnzMicrobTechnol*. 38: 49-54.
- ❖ **Bode .W ,Huber.R.** (2005).Natural proteinproteinaseinhibitors and their interaction withproteinases. *Euro J Biochem* .204 :433–451.
- ❖ **Böeckle .B, Galunsky .B, Müller.R.** (1995). Characterization of a keratinolytic serine proteinasefrom*Streptomycespactum* DSM 40530.*Appl. Environ. Microbiol*. 61: 3705–3710.
- ❖ **Boubetra .D, Sabaou .N, Zitouni .A, Bijani .C, Lebrihi .A,Mathieu .F** .(2013).Taxonomy and chemicalcharacterization of new antibioticsproduced by *Saccharothrix*SA198 isolatedfrom a Saharansoil. *Microbiol. Res.***168** : 223–230.
- ❖ **Brandelli .A.** (2008). Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessingagroindustrialwastes and beyond. *Food BioprocessTechnol* 1:105–116.
- ❖ **Brandelli.A,Daniel .J, Daroit,Alessandro .R.**(2010). Biochemicalfeatures of microbial keratinases and their production and applications. *ApplMicrobiolBiotechnol* . 85:1735–1750.
- ❖ **Bressollier .P, Letourneau .F, Urdaci .M, Verneuil .B.** (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinasefrom*Streptomyces albidoflavus*. *Appl Environ Microbiol* .65:2570–2576.

C

- ❖ **Cai .B, Lou, Zheng .X, Zhejiang. J.** (2008). University Science. 9, 60.
- ❖ **Cedrola . S. M. L, de Melo .A. C. N, Mazotto .A. M, Lins.U, Zingali .R. B, Rosado .A. S, Vermelho .A. B.** (2012). Keratinases and sulfidefrom *Bacillus subtilis* SLC to recycle featherwaste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 :1259–1269.
- ❖ **Chhimpa .S, Yadav .C.S, John .P.J.** (2016).Isolation and identification of keratindegrading (keratinolytic) bacteriafrompoultryfeather dumping sites. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES)* 8 ; 109-119.
- ❖ **Chun. J, Youn . H.D, Yim .Y.I, Lee . H, Kim. M.Y, Hah .Y, Kang .S.O** .(1997). *Streptomyces seoulensis*ssp. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 47: 492–498

D

- ❖ **Dalev.P.G.(1994).**Utilisation of Waste Feathers from Poultry Slaughter for Production of a Protein Concentrate. *Biores. Technol.* 48:265–267.
- ❖ **Daroit.D.J, Corrêa .A.P.F, Brandelli .A .(2009).** Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Int BiodeteriorBiodegrad* 63:358–363.
- ❖ **Dastager. G .S, Jae C. L, Wen-Jun .L, Chang-Jin .K ,Dayanand .A.(2009).** Production, characterization and application of keratinase from *Streptomyces gulbargensis*. *Bioresource Technology*.100 : 1868–1871,
- ❖ **DIARRA .O .(2014).** Analyse de la cinétique de fermentation in vitro des résidus de tomates et d'orange ainsi que de deux plantes fibreuses, dans différentes sources d'azote, selon un modèle exponentiel .Mémoire de Master. Univ.Constantine 1. Algérie.

E

- ❖ **El-Gendy.MMA.(2010).** Keratinase production by endophytic *Penicillium* spp Morsy1 under solid-state fermentation using rice straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 162:780–794.
- ❖ **Ensign .J.C, Normand .P, Burden .J.P, Yallop. C.A. (1993).**Physiology of some actinomycetes genera. *Rev Microbiol.* 144: 657-660.
- ❖ **Essien .J.P, Umoh .A.A, Akpan .E.J, Eduok .S.I,Umoiyo .A .(2009).** Growth, keratinolytic proteinase activity and thermotolerance of dermatophytes associated with alopecia in Uyo, Nigeria. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 56: 61-69.
- ❖ **Eunice .J.A, Prosser. J.I. (1983).** Mycelial growth and branching of *streptomyces*.

F

- ❖ **FAKHFAK. Z. (2010).** Kératinases de *Bacillus licheniformis* RPK et *Bacillus pumilus* A1 production, purification, caractérisation et applications biotechnologiques. Thèse de Doctorat. Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax. Tunisie.
- ❖ **Farag .A.M, Hassan.M.A. (2004).** Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol* 34:85–93.
- ❖ **Fraser .R.D.B, MacRae.T .P, Rogers.G.E.(1972).** Keratin their composition, structure and biosynthesis. Charles C Thoma.

- ❖ **Friedrich.A.B,Antranikian.G.** (1996) .Keratin Degradation by *Fervido bacteriumpennivorans*, a Novel Thermophilic Anaerobic Species of the Order Thermotogales, Appl. Environ.Microbiol., 62:2875–2882.

G

- ❖ **George .S, Raju.V, Krishnan.M.R.V, Subramanian.T.V,Kunthala.J.**(1995). Production of protease by *Bacillusamyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. ProcessBiochemistry. 30: 457-462.
- ❖ **Ghosh . A, Chakrabarti .K, Chattopadhyay .D.** (2008) .Degradation of rawfeather by a novel high molecularweightextracellularproteasevfromnewlyisolated*Bacillus cereus* DCUW. J IndMicrobiolvBiotech 35:825–834.
- ❖ **Godheja.J, shekhar.S .K .**(2014). Biodegradation of KeratinfromChickenFeathers by FungalSpecies as a Means of SustainableDevelopment. J. Bioremed Biodeg.5 : 232.
- ❖ **Gradisar .H, Friedrich.J, Krizaj.I, Jerala.R.**(2005).Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to someknownproteases. Appl Environ Microbiol 71:3420–3426.
- ❖ **Grosser.**(1956). Water soluble compounds (non-keratins) associatedwith the plumage of the pigeon (*Columbia livia*). J Exp Med Sci. 34: 65-70.
- ❖ **Gupta .R, Beg.Q. K,Lorenz .P.**(2002). Bacterialalkalineproteases: Molecularapproaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59 :15–32.
- ❖ **Gupta .R,Ramnani .P.**(2006).Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. Appliedmicrobiology and biotechnology.70 :21–33.

H

- ❖ **Harvey.I.** (1999).Sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque. Thèse de Doctorat. Université Laval (Canada).127.

I

- ❖ **Ignatova . Z, Gousterova .A, Spasov .G, Nedkov . P.** (1999). Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a

wooldegradingthermophilicactinomycetstrain *Thermoactinomyces candidus*. Can J Microbiol. 45: 217-222.

J

- ❖ **Jacques .christophe** .(2003) .étude de la valorisation des déchets d'origine kératinique par voie thermo-mécano-chimique en vue de l'obtention de filaments continus :cas spécifique de la laine. Thèse de doctorat en science des agroressources. Toulouse : l'institut national polytechnique de toulouse.279.
- ❖ **Janaki .T.**(2016) . Keratinase activity (Feather) of *Streptomyces cacaoi*subsp. *cacaoi*-M20. Int Journal of Pharma Sci and Research, 1; 25-27.

K

- ❖ **Kornilowicz-Kowalska .T, Bohacz .J.** (2011). Biodegradation of keratinwaste: Theory and practical aspects. WasteManag. 31 :1689-701.
- ❖ **Kublanov .I.V, Tsiroulnikov.K.B, Kaliberda.E.M, Rumsh.L.D, Haertlé.T, Bonch-Osmolovskaya.E.A.**(2009).KeratinaseofananaerobicthermophilicbacteriumThermoan aerobacter sp. strain 1004-09 isolatedfroma hot spring in the Baikal rift zone. Microbiology (Russia) .78:67–75.
- ❖ **Kulkarni.N,Gadre .RV.**(2002).Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. J. Ind. Food. Microbiol;. 28: 344-348.
- ❖ **Kumar .C.G,Takagi .H.** (1999). Microbialalkalineproteases: From a bioindustrialviewpoint. BiotechnologyAdvances,. 17 : 561–594.
- ❖ **KUMAR.P, KAZI.Y.F, SOOMRO.I. H.** (2012). A comparative characterization of indigenous keratinase enzymes from district Khairpur .Sindh, Pakistan. Pak. J. Pharm. Sci., 25 :73- 79.

L

- ❖ **Łaba, W, Choińska.A, Rodziewicz.A.** (2013).the release of sulfur compounds duringdegradation of featherkeratin by twobacillusstrains. Acta ScientiarumPolonorum: Biotechnologia, 12 : 29 - 40.
- ❖ **Larpent.J.P,Sanglier.J.J.**(1989).Biotechnologie des antibiotiques. Ed.Masson. Paris, 48.

- ❖ **Lee.H, Suh.D.B, Hwang.J.H, Suh.H.J.**(2002).Characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Bacillus* sp. SCB-3. *Appl Biochem Biotechnol* 97:123–133.
- ❖ **Lodish.H, Berk.A, Zipursky.S.L, Matsudaira.P, Baltimore.D, Darnell.J.**(2000). *Molecular cell biology*. 4th ed. New York W.H. Freeman and Company.

M

- ❖ **Mariat.F, Sebald.M. (1990).** Actinomycètes In: *Bactériologie Médicale*. Le Minor L. et Véron M. (Eds). 2ème édition, Flammarion. Paris. 935-949.
- ❖ **McMurry.J, Fay.R. (2003).** *Biochemistry* In: *Chemistry* Pearson Prentice Hall.
- ❖ **Mehwish.I, Javed.I.Q, Nudrat.B, Saima.S.M, Roheena.A, Afshan.K, Shagufta .N .** (2017). Bioconversion of agro-industrial feather waste utilizing thermophilic *Bacillus megatarium* D1 Romanian *Biotechnological Letters* .22.
- ❖ **Mohamedin .A. (1999).** Isolation, identification and some cultural conditions of a protease producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *Inter Biodeter Biodegrad*; 43:13–21.
- ❖ **Mona E. M. Mabrouk. (2008).** Feather degradation by a new keratinolytic *Streptomyces* sp. MS-2. *World J. Microbiol Biotechnol*. 24: 2331-2338.
- ❖ **Mukhopadhyay.R.P, Chandra.A.L. (1990).** Keratinase of a streptomycete. *Ind. J. Exp. Biol*. 28: 575–577.

N

- ❖ **Nam. G.W, Lee. D.W, Lee .H.S, Lee. N.J, Kim .B.C, Choe .E.A, Hwang. J.K, Suhartono. M.T, Pyun YR. (2002).** Native-feather degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a newly isolated keratinase producing thermophilic anaerobe. *Arch Microbiol* 178:538–547.
- ❖ **Nandini. A, Madhusudhan. D.N, Dayanand. A. (2015).** Detection of Keratinolytic Actinobacteria and evaluation of Bioprocess for Production of Alkaline Keratinase .*international journal of current microbiology and applied sciences*. 4:907-918.
- ❖ **Narayana.K.J.P et al.(2007).** L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J. Microbiol* , 48: 331-336.
- ❖ **Narayana .K.J.P, Prabhakar. P, Vijayalakshmi .M, Venkateswarlu .Y, Krishna. P.S.J. (2008).** Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Pol. J. Microbiol*. 57: 35 – 39.

- ❖ **Ninawe.S,Lal.R,Kuhad .R.**(2006).Isolation of three xylanase-producing strains of actinomycetes and their identification using molecular methods. *Curr Microbiol*, 53:178–182.
- ❖ **Noval.J.J,Nickerson.W.J.**(1959). Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 77: 251–263.
- ❖ **Nutsunidze. N.** (2010).Halophylic actinomycetes from saline soils of eastern Georgia and their protease activity. *Bull. Georg. Natl. Acad. Sci.* 4: 82–85.

O

- ❖ **Omura .S.** (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc.281–303.
- ❖ **Onifade.A.A,Al-Sane.N.A,Al-Musallam.A.A,Al-Zarban.S.**(1998).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* 66:1–11.
- ❖ **Oskay.M,Tamer.A.U,Azeri .C.**(2004).Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of biotechnology*.3:441-446.

P

- ❖ **Pandey.A, Nigam .P, Soccol.C.R,Soccol.V.T,Singh.D ,Mohan. R.**(2000).Advances in microbial analysis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135-152.
- ❖ **Papadopoulos,.M.C, El Bously.A.R., Roodbeen. A.E.,Ketelaars.E.H.** (1986). Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 14: 279–290.
- ❖ **Parry. D.A.D,North.A.C.T.**(1998). Hard -keratin intermediate filament chains: Substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domain soft type I and type II chains. *J. Structure Biol.* 122: 67-75.
- ❖ **Pataraya.D, Gurielidze.M, Berishvili.T, Cholokava.N, Zaalishvili.G, Suh.H.J, Lee H.K.** (2010). Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J Protein Chem.* 20: 165-169.

- ❖ **Prasad .V, Kuma.G, Karthik .L, Rao .K.V.B.**(2010). Screening of Extracellular Keratinase Producing Bacteria from Feather Processing Areas in Vellore, Tamil Nadu, India. *Journal of scientific research*.2 :559-56

R

- ❖ **Rajagopalan. G, Krishnan. C.** (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Biores Technol.*; 99:3044–3050.
- ❖ **Rai .SK, Konwarh .R, Mukherjee .AK.** (2009). Purification, characterization and biotechnological application of an alkaline β - keratinase produced by *Bacillus subtilis* RM-01 in solid-state fermentation using chicken-feather as substrate. *Biochem Eng J* 45:218–225.
- ❖ **Ramasamy .T, Saha .S, Dharumadurai. D, Nooruddin .T.** (2016). Preliminary screening of Ni(II) metal tolerance and dye-decolorizing by *Nocardiopsis* sp. SD8. *Journal of Coastal Life Medicine*.4: 295-298.
- ❖ **Riffel A, Brandelli A.** (2006). Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. *Braz. J. Microbiol.* 37:395-399.

S

- ❖ **Sanglier. J.J, Haag.H, Huck.T.A and Fehr .T.** (1996); Review of actinomycetes compounds 1990- 1995. *Expert. Opin. Invest. Drugs*. 5: 207-223.
- ❖ **Santos .R.M.D.B, Firmino. AAP, Sá CM, Felix .CR.** (1996). Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Curr Microbiol* 33:364–370.
- ❖ **Schmid. R. D and Verger .R.** (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37: 1608-1633.
- ❖ **Selvam. K , Vishnupriya. B.** (2012). Biochemical and Molecular Characterization of Microbial Keratinase and Its Remarkable Applications. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* . 3:267-275.
- ❖ **Selvam.K , Vishnupriya.K. , Yamuna. M.** (2013). Isolation and description of keratinase producing marine actinobacteria from South Indian Coastal Region. *African Journal of Biotechnology* .12: 1684–5315
- ❖ **Selvam, K., Vishnupriya, B. and Yamuna, M.** (2013). Isolation and description of keratinase producing marine actinobacteria from South Indian Coastal Region. *African Journal of Biotechnology*. 12: 19-26.

- ❖ **Sharmin. S, Hossain .MT , Anwar .MN.** (2005). Isolation and characterization of a proteaseproducingbacteria*Bacillus amonvivorus*and optimization of somefactors of culture conditions for protease production, *Journal of Biological Sciences*,. 5(3), 358-362.
- ❖ **Shirling .E. B, Gottlieb.D. .** (1966) .Methods for Characterisation of *Streptomyces* Species. *International journal of systemic and evolutionary microbiology*. 16: 313-340 .
- ❖ **Sivakumar, N., et Raveendran, S.** (2015). Keratindegradation by bacteria and fungiisolatedfrom a poultryfarm and plumage. *British poultry science*, 56 :, 210–217.
- ❖ **. Sriyapai T. Somyoonsap P. Matsui K. Kawai F. Chansiri K.** (2011).Cloning of a thermostable xylanase from*Actinomadura* sp. S14 and its expression in *Escherichia coli* and *Pichiapastoris*. *J BiosciBioeng*, 111:528–536.
- ❖ **Sudo.K, Konno. K, Yokota.T ,Shigeta.S. A.**(1995). Screening system for antiviral compounds againtsHerpes simplex virus type 1 using the MTT methodwith L 929 cells.*Tohuku. J. Exp.Med*. 176: 163-071.
- ❖ **Suh H.J., Lee H.K.** (2001). Characterization of a keratinolytic serine proteasefrom*Bacillus subtilis* KS-1. *J ProteinChem*. 20: 165-169.
- ❖ **Suzuki Y, Tsujimoto Y, Matsui H, Watanabe K.** (2006). Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilicbacteria. *J. Biosci. Bioeng*. 102:73-81.

T

- ❖ **Taibi Z. Saoudi B. Boudelaa M. Trigui H. Belghith H. Gargouri A.** 2012. et al. Purification and biochemicalcharacterization of a highly thermostable xylanase from*Actinomadura* sp. strain Cpt20 isolatedfrompoultry compost. *ApplBiochemBiotechnol* 166:663–679.
- ❖ **Takahashi .Y and Omura .S.** .(2003). Isolation of new actinomycetesstrains for the screening of new bioactive compounds. *J .Gen .Appl. Microbiol*.49: 141-054.
- ❖ **Tatineni R, Doddapaneni KK, Potumarthi RC, Vellanki RN, Kandathil MT, Kolli N, Mangamoori LN.** (2008). Purification and characterization of an alkaline keratinase from*Streptomyces* sp. *Bioresour Technol* 99:1596–1602.
- ❖ **Thys .RCS, Brandelli .A.** (2006). Purification and properties of a keratinolytic metalloproteasefrom *Microbacterium* sp. *J ApplMicrobiol* 101:1259–1268.

- ❖ **Tom sinoy.ES, chavan.pb,patre,pr.**(2011). isolation and identification degradablemicroorganism .technical and non-technical journal.2 :128-136.

V

- ❖ **Venter H., Osthoff G., Litthauer D.**(1999). Purification and characterization of a metalloproteasefrom*Chryseobacterium indologenes* I 9a and determination of the aminoacidspecificitywithelectrospray mass spectrometry. *ProteinExprPurif* .15: 282-295.
- ❖ **Vigal .T, Gil JF, Daza .A, Garcia-Gonzalez MD,Martin. JF.**(1991).Cloningcharacterization and expression of an alpha amylase genefrom*Streptomyces griseus*IMRU 3570. *Mol Gen Genet*; . 225:278–288.
- ❖ **Voet D, Voet JG, Pratt CW** (2008). *Biochemistry: life at the molecularlevel*. 3rd ed. New York: John Wiley& Sons.

W

- ❖ **Williams CS, Richter JM, Mackenzie JC, Shih H.** (1990). Isolation,identification and characterization of a featherdegradingbacterium. *ApplEnvir Microbiol.*56:1509-1515.
- ❖ **Williams, S. T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D. I., Kuznetsov, V. D., Le Monnier, F.J., Long, P. F., Maycroft, K. A., Palma, R. A., Petrolini, B., Quaroni, S., Todd, J.I., and West, M.** (1993).Detection and identification of novelactinomycetes. *Res Microbiol*.144 : 653–656.

X

- ❖ **Xu.B, zhong.Q, Tang.X ,. Yang.Y, huang.Z.**(2009). Isolation and characterization of a new keratinolytic bacteriumthatexhibitssignificantfeather-degradingcapability. *Afr. J. Biotechnol.*,8 :4590, 4596.

Y

- ❖ **Yassien .MAM, Jiman-Fatani. AAM., Asfour. HZ.**(2014).Production, purification and characterization of cellulase from *Streptomyces* sp. *Afri Journal of Microbio*, , 4. 348-354.
- ❖ **Young, R.A., and Smith, R.E.**(1975). Degradation of featherkeratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. *Can. J. Microbiol*. 21: 583–586.

Annexes

Matériel utilisé

- Autoclave.
- Balance (ScouttImpro) (Ae ADAM AFA-120LC).
- Barreaux magnétiques.
- Bec bunsen.
- Béchers.
- Boîte de Petri.
- Bain Marie (raypa).
- Centrifugeuse (Sigma 2- 16K).
- Entonnoir.
- Eprouvettes graduée.
- Erlenmeyers.
- Etuve à 28 °C (memmert).
- Flacons.
- Micropipette 100Ml.
- pH-mètre (BOECO).
- plaque agitatrice (IKALABORTECHNIK).
- Pipette Pasteur.
- Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200).
- Spectrophotomètre (UVmini 1240 SHIMADZU).
- Tube à hémolyse.

Composition des milieux de cultures en (g/l).

- **Milieu de culture solide à Base de Farine de plumes (FBM) (Williams et al.,1990).**

• Farine de plume	20g.
• K ₂ HPO ₄	1g.
• MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.5g
• CaCO ₃	3g.
• FeSO ₄ (7H ₂ O)	01g.
• NaCl	0.5g.
• Agar.....	20g.
• Eau distillée	1l.
• pH.....	7,2

❖ **Gélose nutritive a base de lait (GNL) :**

• Peptone.....	5g.
• Extrait de viande.....	1g.
• Extrait de levure.....	2g.
• Chlorure de sodium (NaCl)	5g.
• Agar.....	14g.
• pH final.....	7,3±0.2.
• lait écrémé.....	250ml
• Eau distillée.....	750ml

❖ **Gélose nutritive (GN)**

• Peptone.....	5g.
• Extrait de viande.....	1g.
• Extrait de levure.....	2g.
• Chlorure de sodium (NaCl)	5g.
• Agar.....	14g.
• pH final.....	7,3±0.2.
• Eau distillée.....	1l.

❖ **Starch Casein Agar (SCA)**

• Amidon	10g.
----------------	------

• Caséine.....	0.3g
• KNO ₃	2g.
• K ₂ HPO ₄	2g.
• NaCl.....	2g.
• MgSO ₄ 7H ₂ O	0.05g.
• CaCO ₃	0.02g.
• FeSO ₄ , 7H ₂ O	0.01g.
• Agar.....	18g.
• H ₂ O.....	50 ml.
• pH.....	7.2±0.2.

❖ **Milieu Minceur**

• Amidon.....	10g,
• Extrait de levure	4g,
• Peptone.....	2g,
• Agar	18g,
• H ₂ O.....	1L,
• pH.....	7.2

❖ **Milieu Mueller-Hinton**

• Extrait de viande	2 g.
• Hydrolysate acide de caséine	17, 5 g.
• Amidon.....	1, 5 g.
• Agar.....	10 g.
• 1 litre d'eau de mer 50%.	
• pH.....	7,3.

❖ **Milieu Chapman**

• Peptone	10 g.
• extrait de viande de bœuf :.....	1g.
• chlorure de sodium	75 g.
• mannitol	10 g.
• rouge de phénol.....	0,025 g.
• agar-agar	15g.
• eau distillée	1L.

Les milieux ISP ont été préconisés par l'International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

❖ **Milieu ISP1**

- Tryptone.....5g.
- Extrait de levure.....3g.
- Agar.....15g.
- Eau distillée1L.
- PH.....7.2±0.2.

❖ **Milieu ISP2**

- Glucose.....4 g.
- Extrait de levure.....4 g.
- Extrait de malt.....10 g.
- Eau distillée1L.
- Agar.....20 g.

❖ **Milieu ISP3**

- Farine d'avoine.....20 g.
- Solution saline standard.....1 ML.
- Agar.....20 g.
- Eau distillée1L
- PH.....7.2±0.2.

✓ **Solution saline standard**

- FeSO₄, 7H₂O.....0,1 g.
- MnC₁₂, 4H₂O.....0, 1 g.
- ZnSO₄, 7H₂O.....0.1 g.
- Eau distillée q.s.p.....100 ml.

❖ **Milieu ISP4**

- Amidon.....10 g.
- K₂HPO₄.....1 g.
- MgSO₄, 7H₂O.....1 g.
- NaCl.....1 g.
- (NH₄)₂SO₄.....2 g.
- CaCO₃.....2g.

- Solution saline standard (voir ISP3).....1ml.
- Agar.....20 g
- Eau distillée1L.
- PH.....7.2±0..

❖ **Milieu ISP6**

- Peptone.....15g.
- Protéose peptone.....5g.
- Citrate de ferammoniacal.....0,5g.
- Thiosulfate de sodium.....0,08g.
- Extrait de levure.....1g.
- K₂HPO₄.....1 g.
- Agar.....20g.
- Eau distillé.....1L.
- PH.....7±0

.

Solutions et tampons préparés.

- **Solution tampon tris HCl (0,05 M)**

Le Trishydroxyméthylaminométhane (tris) présente une masse molaire de 121,14 g/mol à servi pour la préparation de 300 ml du tampon tris HCl à 0,05 M, par le mélange de 1,817 g du tris dans 300 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 masse molaire de 163,39 g/mol dont 26,142 sont dissouts dans 300 ml d'eau distillée et mélangés vigoureusement.

- **Solution hydroxyde de sodium NaOH à (1N)**

Pour la préparation de 200 ml d'hydroxyde de sodium qui présent une masse molaire de 40 g/mol, 8 g du NaOH sont dissouts dans 200 ml d'eau distillé suivi d'une agitation vigoureuse.

Résumé

Ce travail porte sur l'étude de l'activité kératinolytique et antagoniste par de souches d'actinomycètes isolées partir d'un échantillon d'eau polluée à Bejaïa.

La mise en évidence de l'activité protéolytique des souches d'actinomycètes sur milieu GNL, nous a permit de sélectionner les deux souches ALB20 et NOP24 comme meilleures souches productrices de protéases. Ces dernières possèdent une activité kératinolytique sur milieu solide a base de farine de plumes et l'estimation de l'activité kératinolytique sur milieu liquide à base de farine de plumes a révélé une faible activité équivalente pour les deux isolats avec une activité de 2,4 et de 2 UI/ml pour les souches NOP 24 et ALB 20 respectivement.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches ALB20 et NOP24a été évalué à l'égard de 4 bactéries pathogènes (*S. aureus* ATCC 25923, *SARM* ATCC 43300, *E. coli* ATCC 25922, *Sal. typhi* ATCCATCC 14028) et les deux souches ont présenté une activité antibactérienne à l'égard des quatre germes cibles testés.

Mots clés : kératinases, kératine, actinomycètes, activité protéolytique, activité Kératinolytique, activité antibactérienne, farine de plumes.