

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBÈS  
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE MOLECULAIRE PROTEOMICS ET SANTÉ

THESE Présentée par

M<sup>lle</sup> BOUKHTACHE Hadjer

EN VUE DE L'OBTENTION

DU DIPLOME DE DOCTORAT 3<sup>ème</sup> CYCLE

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Moléculaire et Protéomies

Thème

Isolement et caractérisation des bactéries productrices de protéases à  
intérêt biotechnologique

Devant le Jury composé de :

Soutenu le : 19/02/2018

Président :

Mr. BENALI Mohamed (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Examineurs :

Mr. BELABID Lakhdar (Professeur, Université de Mascara).

Mme. KANOUN Khadoudja (MCA, Université de Sidi Bel Abbès).

Co-Encadreur :

Mme ALLEM Rachida (Professeur, Université de Chlef).

Directeur de thèse :

Mr. ABBOUNI Bouziane (Professeur, Université de Sidi Bel Abbès).

Année universitaire 2017/2018

# DEDICACES

---

*A*

*Celle qui m'a donné la vie, mon image d'affection celle qui s'est sacrifiée toute sa vie pour ma réussite et ma joie, à toi ma chère maman.*

*A*

*Celui qui m'a donné son éducation, qui m'a aidé pour continuer mon chemin et qui est resté à mes côtés, mon père mon bien aimé. Que Dieu le garde pour moi.*

*A*

*Ma grande mère khadidja pour ces louanges.*

*A*

*Mon cher fiancé et ma belle-mère pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur soutien. Merci d'être toujours à mes côtés.*

*A*

*Mes précieuses petites sœurs «Maroua et Ferial» et mon cher frère «Younes». Que Dieu vous protège.*

*A*

*Mes tantes «Nora et Yasmina» pour leur amour et leur  
conseils.*

*A*

*Mon oncle « Lakhdar » et tata Leila pour leur soutien  
et leurs aides.... Je leurs dis Merci.*

*Et pour terminer je dédie se travail à mes proches, toute  
ma famille et tous mes amis sans prononcer les noms  
pour ne pas oublier certaines personnes et pour tous  
ceux qui m'aiment et a tout ceux que j'aime ...Merci.*

***Boukhtache Hadjer***

## RESUME

Les producteurs d'enzymes ont effectué des recherches afin de trouver des alternatives moins dispendieuses en utilisant les sols riches en protéines comme substrat prometteur économique, afin de stimuler la production à des coûts moindres et valoriser les sous-produits issus du sol.

Dix (10) échantillons de sols riches en protéines où les déchets sont soumis à une fermentation naturelle, prélevés dans les environs de la ville de Chlef, en Algérie à partir des sols entourant les laiteries, les abattoirs, les usines des alimentations de bétails et les sols riches en matières organiques en décomposition, ont fait l'objet d'une analyse microbiologique à fin de déterminer la diversité des bactéries productrices de la protéase. Le screening primaire a permis l'isolement de 115 souches protéolytiques, parmi lesquelles, 15 sont sélectionnées dans le screening secondaire comme les plus performantes et sont retenues pour être identifiées dans un premier temps par une caractérisation phénotypique, suivie d'une caractérisation génotypique par la technique de la PCR et le séquençage du gène codant l'ADNr 16S.

L'utilisation de l'outil de la biologie moléculaire a permis une identification génétique des souches sélectionnées productrices de la protéase et l'analyse phylogénétique.

Dans le but d'augmenter la production de la protéase chez les souches isolées sélectionnées, un certain nombre de paramètres tels que la source de carbone et d'azote, la température, le pH, le temps de réaction et la concentration en inoculum sont optimisés. Les résultats obtenus ont montré que chez les souches (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4p</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et P<sub>1op</sub>) une production maximale est obtenue après 48 heures d'incubation lors de leur inoculation sur un milieu de culture de production contenant : 1g/l glucose, 1g/l amidon, 1g/l caséine, 1% peptone et 2% d'inoculum avec des taux de production de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) respectivement.

L'activité protéolytique est mesurée et l'analyse de la pureté est ensuite effectuée par SDS-PAGE en conditions dénaturantes révélant l'apparence de bandes protéiques de poids moléculaires différents suggérant que ces enzymes sont homogènes, ce qui confirme que les souches isolées ont des activités protéolytiques différentes.

**Mots clés:** Protéase, caractérisation, sols riches en protéines, le gène 16S rDNA, optimisation, SDS-PAGE.



## **ABSTRACT**

Producers of enzymes are researching to find cheaper alternatives using protein rich soils as a promising economic substrate, to stimulate production at lower costs and to value the byproducts from soil.

Ten (10) samples of protein rich soils where the waste is subjected to natural fermentation collected in the vicinity of the town of Chlef, Algeria from soils surrounding, dairies, slaughterhouses, cattle feeding factories and decomposing organic matter rich soils, were subjected to microbiological analysis in order to determine the diversity in protease producing bacteria.

The primary screening allowed the isolation of 115 bacterial strains, from which 15 were selected in the secondary screening as the most powerful isolates and were chosen to be identified initially by a phenotypic characterization, followed by genotypic characterization by PCR and the sequencing of the gene encoding 16S rDNA.

The use of molecular biology tool enabled a genetic identification and phylogenetic analysis of the selected strains producing proteases.

In order to increase the production of proteases in selected high performance strains, a number of parameters such as carbon and nitrogen source, temperature, pH, reaction time and inoculums concentration have been optimized. The results obtained showed that maximum production (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 and 0,60 UI /ml ) respectively for the strains (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>(op), E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4p</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN and P<sub>1op</sub>) is obtained after 48 hours of incubation during inoculation of the strains on a production medium containing, 1 g/l glucose, 1g/l starch, 1g/l casein, 1% peptone and 2% of inoculum.

The proteolytic activity is measured and the purity analysis is then carried out by SDS-PAGE under denaturing conditions revealing the appearance of protein bands of different molecular weights suggesting that these enzymes are homogeneous, confirming that our strains have different proteolytic activities.

**Key words:** Protease, characterization, proteins rich soils, 16S rDNA gene, optimization, SDS- PAGE.

## ملخص

يحاول منتجو الإنزيمات البحث عن بدائل باستخدام التربة الغنية بالبروتين باعتبارها ركيزة اقتصادية واعدة، لتحفيز الإنتاج بتكاليف أقل ولتقييم المنتجات الثانوية من التربة.

تم إخضاع عشرة (10) عينات من التربة الغنية بالبروتين حيث تعرضت النفايات للتخمر الطبيعي الذي تم جمعه على مقربة من ولاية الشلف بالجزائر من التربة المحيطة بمصانع الألبان، المسالخ، مصانع تغذية الماشية و التربة الغنية بالمواد العضوية المتحللة، تم اجراء التحليل الميكروبيولوجي من أجل تحديد التنوع في البكتيريا المنتجة للبروتياز. وأتاح الفحص الأولي عن عزل 115 سلالة بكتيرية، تم اختيار 15 منها في الفرز الثانوي وتم اختيارها ليتم تحديدها في البداية بواسطة النمط الظاهري، يليها تحديد النمط الوراثي بواسطة DNA 16Sr.

مكن استخدام البيولوجيا الجزيئية من التعرف على السلالات المختارة التي تنتج البروتياز. من أجل زيادة إنتاج البروتياز في سلالات عالية الأداء ، تم تحديد تأثير مجموعة من العوامل مثل مصدر الكربون والنيتروجين، ودرجة الحرارة، ودرجة الحموضة، وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الإنتاج الأقصى (1,6 ، 1,45 ، 1,50 ، 1,8 ، 1,65 ، 1,30 ، 1,30 ، 1,30 ، 1,70 ، 1,50 ، 1,48 ، 1,55 ، 0,95 ، 1,62 ، 1,65 ، 0,60 وحدة/مل) للسلالات التالية على الترتيب (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2</sub>' , AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>(op), E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1</sub> (op), Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4p</sub> , E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> (IBN, P<sub>1</sub> op) بعد 48 ساعة من حضن السلالات على 1 غ/ل غلوكوز ، 1 غ/ل نشاء ، 1 غ/ل كازين 1%، بيتون و 2% من اللقاح.

تم قياس النشاط بروتيني ثم تم تحليل النقاء بواسطة (SDS-PAGE) كاشفا عن ظهور عصابات البروتين ذات أوزان جزيئية مختلفة مما يشير إلى أن هذه الإنزيمات متجانسة مؤكدا أن السلالات لديها أنشطة بروتين مختلفة.

**الكلمات الدالة:** بروتياز، وصف، التربة الغنية بالبروتين، تحسين الإنتاج، جين SDS-PAGE , 16S rDNA.

## **Avant-Propos**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de préparation d'une thèse de Doctorat, qui s'intéresse de l'isolement et la caractérisation d'une population bactérienne spécifique à partir des sols riches en protéines de la région de Chlef, afin de déterminer les principaux métabolites synthétisés par ces microorganismes, et d'explorer la richesse des sols au niveau du territoire Algérien. Ensuite, la recherche d'enzymes à intérêt biotechnologique en l'occurrence les protéases qui sont largement exploitées par les industriels grâce à leur valeur ajoutée et envisagée. Les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase sont soumises à une identification moléculaire et une analyse phylogénétique. Pour cela, une synthèse bibliographique relative est réalisée, plusieurs approches expérimentales sont ensuite retenues.

Ce mémoire est divisé en 5 sections :

La **première section** est la revue générale de la littérature qui est présentée en deux chapitres.

Le **premier chapitre** a abordé une généralité et des aspects importants reliés aux différentes applications des protéases. Le **second chapitre** a traité des notions générales concernant les genres bactériens isolés et caractérisé par leur performance dans la production des protéases.

La **deuxième section** a décrit la méthodologie employée dans ce projet de recherche et les différentes étapes de la partie pratique.

La **troisième section** a présenté les résultats obtenus.

La **quatrième section** a compris une analyse de ces résultats.

Enfin la **dernière section** est consacrée aux conclusions et aux recommandations pour les travaux futurs.

# Remerciements

---

Pour commencer je remercie le Grand Dieu de m'avoir donné la volonté et le courage pour terminer cette recherche.

J'adresse mes sincères remerciements et ma gratitude la plus profonde à tous ceux qui m'ont aidé à l'accomplissement de cette modeste thèse. Je remercie chaleureusement mon promoteur Professeur ABBOUNI Bouziane, pour la confiance qu'il m'a accordé, son soutien scientifique tout au long du travail, et surtout pour la grande motivation qu'il a su m'insuffler durant mon travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à ma Co-promotrice Pr. ALLEM Rachida, d'avoir été toujours présente, pour ses conseils, ses annotations critiques qui m'ont guidé à l'évolution et la bonification de mon travail, pour ses orientations constructifs et l'enthousiasme communicatif qui m'a vraiment vivifier.

Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer ce modeste travail.

J'exprime également ma gratitude à l'égard de Monsieur AICHOUNI Ahmed et Madame AIT IKEN Saida pour l'accueil généreux dans leur laboratoire de recherche (LBRN).

Je souhaite également remercier l'équipe de recherche du Laboratoire Epigénétique et Signalisation Cellulaire de l'Institut Albert Bonniot France, spécialement Monsieur BOUSSOUAR Fayçal et Professeur Saadi Khochbin de m'avoir donné l'occasion de mener à bien et faciliter mon travail, sans cette coopération ma recherche ne pourrait jamais être possible.

J'exprime également ma gratitude à l'égard de Monsieur HASSAINE Omar pour ses conseils et son aide. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous et je tiens à tester que vous êtes un maître chevronné dans le domaine de la biologie moléculaire et la bioinformatique.

Je profite également de cette précieuse occasion pour remercier mes sœurs Laradj ZAZOU Khalida, Saib Fatima, ALI HAIMOUD Safia, BOUDJEMAA Hadjer, MEKRAF Souhila et BEN AZOUZ Asma pour leur esprit d'équipe et leur coopération professionnelle.

Sans oublier toute l'équipe du laboratoire de l'EPSP d'El Attef, je vous remercie infiniment pour tous ce que vous avez faits pour m'aider.

J'adresse également mes remerciements aux membres de ma famille pour leur soutien et leur patience, dont ils m'ont fait preuve et leur confiance en moi, ce qui m'aidait moralement pour faire aboutir cette thèse.

Au risque de me répéter, j'exprime mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de cette thèse.

## Table des Matières

Dédicace.....	I
Résumé.....	III
Abstract .....	IV
ملخص .....	V
Avant-Propos.....	VI
Remerciements.....	VII
Table des matières.....	IX
Liste des abréviations .....	XIV
Liste des tableaux .....	XVI
Liste des figures .....	XVII
Liste des annexes.....	XXVIII
<b>Introduction</b> .....	1

### Partie 1. Etude bibliographique

<b>Chapitre I</b> .....	3
1. Les applications industrielles et biotechnologiques des protéases.....	3
1.1 Généralités sur les enzymes .....	3
1.1.1 Définition, Rôle et actions des enzymes .....	3
1.1.2 Marché des enzymes .....	3
1.1.3 Classification des enzymes .....	4
1.1.4 L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes.....	4
1.2 Les enzymes protéolytiques .....	5
1.2.1 Historique évolutive des protéases.....	5
1.2.2 Définition des protéases .....	5
1.2.3 Classification et nomenclature des protéases .....	6
1.2.3.1 Selon la longueur de la chaîne polypeptidique .....	6
1.2.3.2 Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique .....	6
1.2.3.2.1 Les exopeptidases.....	7
❖ Aminopeptidases.....	7
❖ Carboxypeptidases .....	7
1.2.3.3 Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif .....	7
1.2.3.3.1 Les endopeptidases.....	7
❖ Sérilylprotéases.....	8
❖ Cystéylprotéases.....	8
❖ Aspartylprotéases .....	8
❖ Métalloprotéases.....	8
1.2.3.4 Selon le pH d'activité .....	9
1.3 Substrat des protéases.....	9
1.3.1 Définition d'une protéine .....	9
1.3.2 Structure d'une protéine .....	9
1.3.3 Principales propriétés d'une protéine .....	10
1.3.3.1 La solubilité.....	10
1.3.3.2 Masse moléculaire .....	10

1.3.3.3	Propriétés optiques .....	10
1.3.3.4	Propriétés osmotiques .....	11
1.3.3.5	Propriétés d'ionisation .....	11
1.3.4	Abondance des protéines .....	11
1.3.5	Importance économique des protéines .....	11
1.4	Structure des protéases .....	12
1.5	Mode d'action des protéases .....	12
1.6	Propriétés analytiques des protéases .....	13
1.7	Répartition des protéases dans le monde vivant .....	13
1.7.1	Protéases d'origine végétale .....	13
1.7.2	Protéases d'origine animale.....	14
1.7.3	Protéases d'origine microbienne .....	14
1.8	Mesure de l'activité protéolytique.....	15
1.9	Physiologie de la production des protéases.....	15
➤	Influence de la source de carbone.....	15
➤	Influence de la source d'azote .....	16
➤	Influence des éléments traces.....	16
➤	Effet du PH.....	16
➤	Effet de la température.....	17
➤	Aération et agitation.....	17
1.10	Applications industrielles des protéases .....	17
1.10.1	Industrie du détergent .....	17
1.10.2	L'industrie du cuir.....	17
1.10.3	Récupération de l'argent .....	18
1.10.4	Usages médicaux.....	18
1.10.5	Industrie alimentaire.....	18
1.10.6	Traitement des déchets .....	19
1.10.7	Industrie chimique .....	20
<b>Chapitre II</b>	.....	21
2.	Ingénierie des protéases bactérienne.....	21
2.1.	Les genres <i>Bacillus</i> et <i>Lysinibacillus</i> .....	21
2.1.1	Caractéristiques générale .....	21
2.1.2	Taxonomie et classification .....	21
2.1.2.1	Taxonomie phénotypique.....	21
2.1.2.2	Taxonomie génotypique.....	22
2.1.3	Croissance et métabolisme .....	24
2.1.4	Production des protéases .....	24
2.2.	Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	25
2.2.1	Caractéristiques générale.....	25
2.2.2	Classification et taxonomie .....	26
2.2.2.1	Étapes de la classification.....	26
2.2.2.2	Classification contemporaine .....	27
2.2.3	Croissance et métabolisme .....	27
2.2.4	Production des protéases .....	28

2.2.4.1	Les métalloprotéases .....	28
2.2.4.1.1	L'élastase Las B .....	28
2.2.4.1.2	L'élastase Las A .....	28
2.2.4.1.3	La protéase alcaline .....	28
2.2.4.2	Les sérines protéases .....	28
2.2.4.2.1	La protéase IV .....	28
2.2.4.2.2	Las D .....	29
2.3.	Les bactéries lactiques.....	29
2.3.1	Caractéristiques générale .....	29
2.3.2	Taxonomie et classification .....	30
2.3.2.1	Origine des bactéries lactiques .....	30
2.3.2.2	Diversité des bactéries lactiques.....	30
2.3.2.3	Taxonomie des bactéries lactiques.....	30
2.3.3	Croissance et métabolisme .....	31
2.3.4	Production des protéases .....	32
2.4.	Le genre <i>Enterobacter</i> .....	32
2.4.1	Caractéristiques générale.....	32
2.4.2	Taxonomie et classification.....	33
2.4.3	Croissance et métabolisme .....	33
2.4.3.1	Catabolisme des protéines.....	33
	❖ La désamination .....	34
	❖ La décarboxylation.....	34
2.4.4	Production des protéases .....	34

## **Partie 2. Etude Expérimentale**

<b>Chapitre III. Matériel et méthodes</b> .....	36
1. Objectifs de recherche .....	36
2. Constitution d'une collection de souches .....	36
2.1. Origine des échantillons .....	36
2.2. Prélèvement .....	38
3. Stratégie d'isolement.....	38
3.1. Screening primaire .....	38
3.2. Purification des souches protéolytiques.....	39
3.3. Identification phénotypique des souches .....	39
3.3.1 Critères morphologiques .....	39
3.3.2 Coloration de Gram .....	39
3.3.3 Réaction à la catalase .....	39
3.3.4 Test d'oxydase.....	39
3.3.5 Détermination du type respiratoire.....	40
3.3.6 Mobilité .....	40
3.4. Conservation des souches isolées.....	40
3.5. Le screening secondaire des souches productrices de la protéase.....	41
3.5.1 Mesure de la zone d'hydrolyse sur milieu de culture solide .....	41
3.5.2 Détermination de l'activité protéolytique sur milieu de culture liquide .....	41



3.5.2.1 Préparation de l'inoculum .....	41
a) Milieu de production de la protéase .....	41
b) Culture de départ .....	42
c) Culture en batch.....	42
d) Cinétique de croissance .....	42
3.5.2.2 Mesure de l'activité protéolytique .....	42
3.5.3. Influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la protéase.....	43
3.5.3.1 Etude de l'effet de la durée d'incubation sur la production de la protéase	43
3.5.3.2 Etude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase .....	43
3.5.3.3 Etude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase.....	43
3.6. La sélection des souches productrices de la protéase.....	43
3.7. L'identification de l'espèce par le système API.....	44
4. L'identification moléculaire .....	44
4.1 Extraction de l'ADN génomique.....	44
4.2 Dosage de l'ADN au Nanodrop.....	45
4.3 Amplification du gène codant l'ADN 16s par PCR .....	46
4.3.1 Choix des amorces.....	46
4.3.2 Préparation du pré-mix PCR.....	46
4.3.3 Amplification .....	47
4.4 L'électrophorèse sur gel d'agarose.....	47
4.5 Purification de l'ADN a partir d'un produit PCR.....	48
4.6 Le séquençage des gènes amplifiés (16S rDNA) .....	49
4.7 Assemblage et correction des séquences.....	51
4.8 Soumission des séquences à la base de données Genbank.....	51
4.9 Analyse phylogénétique des souches sélectionnées .....	51
5. Optimisation des paramètres de production de la protéase .....	52
5.1 Effet des différentes concentrations en caséine .....	52
5.2 Effet de la source d'azote .....	53
5.3 Effet des différentes sources de carbone .....	53
5.4 Effet de l'inoculum.....	53
6. SDS-PAGE et analyse de la protéase .....	53
6.1 Extraction des protéines totales .....	53
6.2 Dosage des protéines .....	54
6.3 Electrophorèse par SDS-PAGE.....	54
6.4 La migration .....	54
6.5 Coloration et décoloration des gels .....	55
<b>Chapitre IV. Résultats</b> .....	57
1. La stratégie d'isolement .....	57
1.1 Le screening primaire.....	57
1.2 Screening secondaire des souches productrices de la protéase .....	63
1.2.1 Etude de l'activité protéolytique sur milieu de culture solide .....	63
1.2.2 Etude de l'activité protéolytique sur milieu de culture liquide .....	65

2. Etude de la cinétique de croissance .....	68
3. Influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la protéase... 69	
3.1 Etude de l'effet de la durée d'incubation sur la production de la protéase .....	69
3.2 Effet de la température d'incubation sur la production de la protéase.....	72
3.3 Effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase .....	75
4. Identification des souches performantes par galeries API .....	78
5. Identification moléculaire des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase .80	
5.1 Quantification de l'ADN au Nanodrop .....	80
5.2 Profils d'amplification des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase .....	82
5.3 Purification de l'ADN amplifié .....	82
5.4 Séquençage, correction et assemblage des gènes amplifiés .....	83
5.5 Phylogénie et construction de l'arbre phylogénétique .....	92
6. Optimisation des paramètres de la production de la protéase .....	92
6.1 Etude de l'effet des différentes concentrations de caséine.....	92
6.2 Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique.....	96
6.3 Etude de l'effet des différentes sources de carbone sur l'activité protéolytique....	99
6.4 Etude de l'effet de l'inoculum sur l'activité protéolytique .....	102
7. SDS-PAGE et analyse des protéases.....	105
7.1 Dosage des protéines .....	105
7.2 Electrophorèse par SDS-PAGE .....	105
<b>Discussion générale</b> .....	107
<b>Conclusion</b> .....	121
<b>Références bibliographiques</b> .....	123
<b>Annexes</b> .....	157

# Liste des abréviations

---

**A:** Adénine.

**ADH:** Arginine dihydrolase.

**ADN:** Acide désoxyribonucléique.

**ADNr 16s:** Séquence d'ADN ribosomal (ADN) 16s (petite sous unité ribosomique).

**API :** Analytical profile index.

**ARA:** Arabinose.

**ARN:** Acide ribonucléique.

**B:** *Bacillus*.

**BET:** Bromure d'éthidium.

**C:** Cytosine.

**DO:** Densité Optique.

**E:** *Enterobacter*.

**E:** *Enterococcus*.

**EDTA:** Acide Éthylène Diamine Tétracétique.

**G:** Guanine.

**GEL:** Gélatine.

**GLU:** Glucose.

**M:** Masse.

**M:** Molaire.

**MAL:** Maltose.

**MAN:** Mannitol.

**Mm:** Milli molaire.

**MT:** Marqueur de taille.

**nm:** Nanomètre.

**ONPG:** Orto-nitro-phényl- $\beta$ -D- galactopyranoside.

**P:** *Pseudomonas*.

**Pb:** Paire de base.

**mPb:** Mega paire de base.

**PCR:** polymerase chain reaction.

**rpm:** Rotation par minute.

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

**T:** Thymine.

**TAE:** Tris, Acétate, EDTA.

**TCA:** Acide trichloracétique.

**TGEA:** Tryptone, glucose, extrait de levure, agar.

**Tris:** Trishydroxyméthylaminométhane.

**UFC:** Unité formant colonie.

**UI:** unité international.

**V:** Volte.

**$\mu$ g:** Microgramme.

**$\mu$ l:** Microlitre.

# Liste des tableaux

---

**Tableau 1.** Présentation des six classes d'enzymes.

**Tableau 2.** Illustration de la spécificité des protéases.

**Tableau 3.** Classification des protéases.

**Tableau 4.** Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques.

**Tableau 5.** Origines des espèces du genre *Bacillus*.

**Tableau 6.** Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques.

**Tableau 7.** Les différents genres appartenant aux *Enterobacteriaceae*.

**Tableau 8.** Présentation des différents sites de prélèvement et leur codification.

**Tableau 9.** Composition du mélange réactionnel.

**Tableau 10.** Purification des produits de la PCR par le Nucleo Spin Gel and PCR Clean Up.

**Tableau 11.** Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques lors de l'identification préliminaire des isolats.

**Tableau 12.** Calcul de l'index d'activité protéolytique des souches isolées, productrices de la protéase, inoculées sur milieu de culture gélosé /et ou TGEA, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 24 heures.

**Tableau 13.** Illustration des profils biochimique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.

**Tableau 14.** Détermination de la quantité d'ADN bactérien à l'aide d'un Nanodrop.

**Tableau 15.** Valeurs des dilutions de l'ADN bactérien.

**Tableau 16.** Dosage des fragments d'ADN purifiés, amplifiés par PCR en présence des amorces (W001/W002) et (W001 /W007), par le Nanodrop 2000.

**Tableau 17.** L'insertion des séquences des souches identifiées dans la base de données RDP Project.

**Tableau 18.** Présentation des numéros d'accèsion, le pourcentage de similarité et l'identité des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.

# Liste des figures

---

**Figure 1.** Distribution de la commercialisation des enzymes.

**Figure 2.** Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.

**Figure 3.** Présentation des quatre types d'endopeptidases.

**Figure 4.** Formule développée d'une protéine de (n) acides aminés.

**Figure 5.** Étapes de l'organisation d'une protéine.

**Figure 6.** Présentation de la Structure tridimensionnelle d'une protéase bactérienne.

**Figure 7.** Mode d'action des protéases.

**Figure 8.** Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (A: cellules végétatives, B: spores).

**Figure 9.** Courbe de croissance microbienne en mode discontinu.

**Figure 10.** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries, contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas*.

**Figure 11.** Observation au microscopique électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) de *Lactobacillus* Rosell-11.

**Figure 12.** Observation au microscopique électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) d'*Enterococcus* sp.

**Figure 13.** Présentation du site de prélèvement (Y) effectué à partir des sols riches en protéines de la laiterie de Rahmoune.

**Figure 14.** Présentation du site de prélèvement (NB) effectué à partir des sols riches en protéines de l'oued de Chlef.

**Figure 15.** Présentation du site de prélèvement (Xg) effectué à partir des boues d'épuration de la STEPE d'Oued Fodda.

**Figure 16.** Présentation du site de prélèvement (E<sub>3</sub>S) effectué à partir des sols riches en protéines de la STEPE de Ténès.

**Figure 17.** Détermination du type respiratoire.

**Figure 18.** Aspect de la galerie API 20E avant l'inoculation avec les souches sélectionnées, productrices de la protéase.

**Figure 19.** Nanodrop 2000/2000c.

**Figure 20 :** Schéma récapitulatif des étapes de séquençage selon la méthode de Sanger.

**Figure 21:** Capture d'écran du programme MEGA 6 Software lors de la construction de l'arbre phylogénétique.

**Figure 22.** Migration électrophorétique des protéines sur gel d'acrylamide.

**Figure 23.** Coloration du gel au bleu de comassie.

**Figure 24.** Décoloration du bleu de comassie.

**Figure 25.** L'illustration des zones d'hydrolyses formées autour des colonies productrices de la protéase, inoculées sur gélose nutritive additionnée à une concentration de 1% de lait écrémé, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.

**Figure 26.** Diversité des aspects macroscopiques des colonies isolées, sélectionnées productrices de la protéase.

**Figure 27.** La mise en évidence du test de la catalase chez quelques souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.

**Figure 28.** Coloration de Gram et observation microscopiques des souches isolées sélectionnées productrices de la protéase (grossissement×100).

**Figure 29.** Illustration de la zone d'hydrolyse formée autour des colonies, sélectionnées productrices de la protéase (Xg<sub>4</sub>, T<sub>2op</sub>, AH<sub>2</sub> (-2) et TB<sub>2op</sub>), ensemencées par spot/et ou strie, incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

**Figure 30.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (Y) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 31.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (H<sub>1</sub>) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 32.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (AH<sub>2</sub>) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 33.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (T) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48

heures.

**Figure 34.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (Xg) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 35.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (E<sub>3</sub>S) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48heures.

**Figure 36.** Estimation de la production de protéases chez les souches isolées à partir du site (NBop) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 37.** Estimation de la production de protéases chez les souches isolées à partir du site (LV) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 38.** Estimation de la production de protéases chez les souches isolées à partir du site (TBop) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 39.** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (P) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 40.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée (T<sub>2</sub>'), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 41.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 42.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée (LV<sub>2</sub>), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 43.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub> et T<sub>2op</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 44.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées NB<sub>1op</sub> et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



**Figure 45.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 46.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et p<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 47.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 48.** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

**Figure 49.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 50.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 51.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 52.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et TB<sub>2</sub>op, inoculées sur

milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 53.** L'impact de la température sur l'activité protéolytique chez les souches T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, NB<sub>1op</sub> et Y<sub>4</sub>.

**Figure 54.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub> et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 55.** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2), P<sub>1op</sub> et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

**Figure 56.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 30 °C pendant 48 heures.

**Figure 57.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 45°C pendant 48 heures.

**Figure 58.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

**Figure 59.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2op</sub> et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30 °C pendant 48 heures.

**Figure 60.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub> et T<sub>2op</sub> inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 35°C pendant 48 heures.

**Figure 61.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées NB<sub>1op</sub> et Y<sub>4</sub> inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 35°C pendant 48 heures.

- Figure 62.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.
- Figure 63.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.
- Figure 64.** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.
- Figure 65.** Aspect des galeries biochimiques inoculées par les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase, incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.
- Figure 66.** Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés par PCR en présence d'un couple d'amorces (W001/W002) et (W001 /W007).
- Figure 67.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche T<sub>2</sub>'.
- Figure 68.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche AH<sub>2</sub> (-2).
- Figure 69.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche P<sub>1</sub> op.
- Figure 70.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche Xg<sub>4</sub>.
- Figure 71.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche P<sub>2</sub> op.
- Figure 72.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche T<sub>2</sub>.
- Figure 73.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P.
- Figure 74.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche NB<sub>1</sub> op.
- Figure 75.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche Y<sub>4</sub>.

**Figure 76.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **LV<sub>2</sub>**.

**Figure 77.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **T<sub>2</sub> op.**

**Figure 78.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P.**

**Figure 79.** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **TB<sub>2</sub> op.**

**Figure 80 :** Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées, productrice de la protéase et les souches de référence par l'utilisation de la méthode Neighbor-joining.

**Figure 81.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub> et T<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

**Figure 82.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Y<sub>4</sub> et NB<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

**Figure 83.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 84.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 85.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub>(-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

**Figure 86.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 87.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 88.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 89.** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 90.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculées sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 91.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

**Figure 92.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 93.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

**Figure 94.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P inoculées sur milieu de

production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 95.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 96.** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 97.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 98.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

**Figure 99.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée, avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

**Figure 100.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 101.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub> inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

**Figure 102.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 103.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 104.** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub> inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 105.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 106.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub>(-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

**Figure 107.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub> inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 108.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 109.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

**Figure 110.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur



milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 111.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2op</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 112.** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1op</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

**Figure 113.** Courbe d'étalonnage standard du dosage des protéines préparées par la méthode de Bradford avec l'utilisation du sérum albumine bovin (BSA 1 α).

**Figure 114.** Représentation photographique du profile protéique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.



# Listes des annexes

---

- ✚ Annexe A : Composition des milieux de culture utilisés.
- ✚ Annexe B : Cinétique de croissance des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.
- ✚ Annexe C : Préparation des solutions pour la mesure de l'activité protéolytique.
- ✚ Annexe D : Bases de données pour galerie Api.
- ✚ Annexe E : Electrophorèse des protéines sur gel d'acrylamide.
- ✚ Annexe F : Captures d'écran des courbes d'absorbance en fonction de la longueur d'onde.
- ✚ Travaux réalisés dans le cadre de la thèse.

# **INTRODUCTION**

---

### Introduction

La pollution environnementale causée par l'utilisation industrielle des produits chimiques reste un problème majeur. Les alternatives biologiques, compatibles avec l'environnement, sont plus privilégiées, auquel l'utilisation des enzymes industrielles est bénéfique sur le plan énergétique et l'aspect environnemental (**Sacheveda et al., 1999**).

Par ailleurs, l'utilisation des enzymes industrielles au début des années 1960 reste très limitée. Cependant, la mise en œuvre de nouvelles techniques a augmenté considérablement la demande pour ces enzymes. Actuellement, cette industrie est en pleine progression et son chiffre d'affaire global croît à un rythme accéléré (**Sacheveda et al., 1999 ; Lachhab et al., 2001**).

La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique telles que les **lipases**, les **cellulases** et les **protéases**. Ces dernières présentent une classe d'enzymes très intéressante par rapport à leurs applications dans les différents domaines. L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux exigences du marché mondial a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes, où les bactéries constituent une excellente source d'enzymes en raison de leur grande diversité biochimique et la présence des caractéristiques souhaitées pour les applications biotechnologiques (**Moreira et al., 2002**).

Les réactions métaboliques impliquant les protéases permettent aux différentes cellules d'effectuer les fonctions pour lesquelles elles existent et ceci s'applique parfaitement bien aux bactéries. En effet, certains organismes, à l'aide de ces enzymes, peuvent dégrader des composés se trouvant dans leur environnement et ce caractère peut être exploité par les industries de différents domaines, telles que l'industrie des pâtes et papiers, les textiles, les détergents, les tanneries, l'industrie alimentaire, l'industrie des alcools, les boulangeries, les confiseries, l'industrie laitière et pharmaceutique (**Rao et al., 1998 ; Yezza et al., 2004**).

La production et la commercialisation mondiale des enzymes est en expansion considérable (**Verstraete, 2002**) avec des rentes d'environ 1.5 milliard de dollars en 1998 et les prévisions prévoient des augmentations de 2-25% de ce chiffre annuellement (**Van Bielen et Li, 2002**).

Puisque la plupart des nouvelles technologies sont axées vers des considérations écologiques et environnementales, les divers organismes et industries doivent savoir s'adapter en ce sens.

Le présent projet s'inscrit dans cette optique, et les objectifs tracés pour la réalisation de ce travail sont:

- ✓ L'isolement et le screening d'une large gamme de bactéries productrices de la protéase à partir des sols riches en protéines.

- ✓ La sélection des souches protéolytiques par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyses formées sur un milieu de culture solide.
- ✓ La caractérisation phénotypique des souches les plus performantes.
- ✓ L'optimisation des différents paramètres impliqués dans la production de la protéase.
- ✓ L'identification des souches sélectionnées productrices de la protéase par l'amplification et le séquençage des fragments ADN de la région ARN 16S.

**PARTIE I.**

---

**ETUDE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Les applications industrielles et biotechnologiques des protéases

Aujourd'hui, les protéases sont qualifiées des participants majeurs dans plusieurs industries. A cet effet, ces enzymes disposent de possibilité d'applications biotechnologiques très étendues par leur capacité à conquérir les produits chimiques, ce qui a augmenté la demande pour ces biomolécules.

### 1.1. Généralités sur les enzymes

#### 1.1.1. Définition, Rôle et actions des enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique, ce sont des macromolécules (10 à 1000 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants (Sikati-Foko *et al.*, 2001) où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant la transformation des nutriments en énergie et en matériaux cellulaires (Meunier, 1999 ; Burhan *et al.*, 2003).

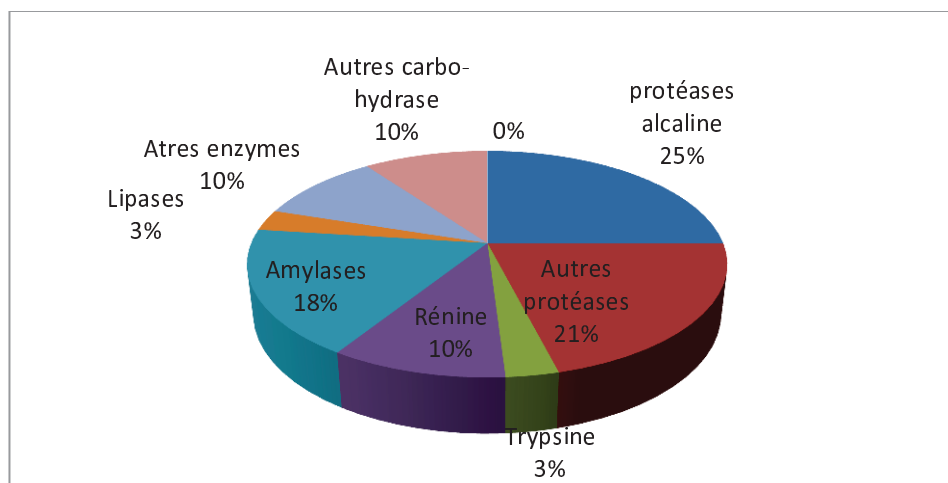
Ces biomolécules sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts efficacité. Également, les enzymes présentent de nombreux avantages au niveau environnemental, biodégradabilité, action spécifique, faible toxicité et formation de sous-produits compatibles avec l'environnement (Prescott *et al.*, 1995 ; Barnabé, 2003 ). De façon générale, la majorité des réactions enzymatiques peuvent être représentées de la façon suivante (Meunier, 1999) :

**Enzyme + Substrat  $\rightleftharpoons$  Complexe Enzyme - Substrat  $\longrightarrow$  Produit + Enzyme**

#### 1.1.2. Marché des enzymes

En 1994, le marché mondiale des enzymes industrielles compte pour environ 400 millions \$, avec 112 millions \$ du secteur des détergents (Hodgson, 1994 ; Anbu, 2009). La production des protéases représentent la part majeure de la commercialisation de ces enzymes avec des ventes d'environ 60% (García-Gómez *et al.*, 2009; Rai et Mukherjee, 2010) (Figure 1).

Les ventes industrielle des protéases sont estimées à 350 millions US\$ (Kumar *et al.*, 2008a). Ce marché conserve une forte croissance chaque année. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en 2000, et une croissance de 6 milliards de dollars en 2011 (Horikoshi, 1996 ; Kumar *et al.*, 2008b).



**Figure 1:** Distribution des ventes des enzymes (Rao et al., 1998).

### 1.1.3. Classification des enzymes

Selon l'I.U.B (*International Union of Biochemistry*), les enzymes industrielles sont réparties en six classes (Tableau 1), dont environ 75% sont des hydrolases (Botella et al., 2005; Assamoi et al., 2009).

**Tableau 1:** Présentation des six classes d'enzymes (Benlounissi, 2004).

Classes	Réactions catalytiques
<b>Oxydoréductases</b>	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène)
<b>Transférases</b>	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
<b>Hydrolases</b>	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
<b>Lyases</b>	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
<b>Isomérases</b>	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
<b>Ligases</b>	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP)

### 1.1.4. L'avantage de la production des enzymes par les microorganismes

La production d'enzymes à partir de la flore microbienne constitue une voie privilégiée par les producteurs (Dion, 1950 ; Marmbregot et al., 1994). Les principaux avantages de la production des enzymes par l'utilisation des microorganismes sont les suivant :

- Croissance rapide sur des milieux de culture contenant des substances organiques moins coûteuses.
- Elaboration de certaines biomolécules.
- Culture facile et abondante.
- Production de quantités abondantes d'enzymes.

- L'induction de certaines modifications recherchées d'une manière simple et rapide par l'amélioration des souches microbiennes par génie génétique et l'optimisation des conditions de fermentation.
- Conservation des propriétés sécrétoires des souches.

## 1.2. Les enzymes protéolytiques

### 1.2.1. Historique évolutive des protéases

L'industrie d'enzymes protéolytique est en pleine progression et enregistre un chiffre d'affaire important avec une augmentation considérable depuis les années 80 (Aehle et al., 1993). En 1998, les hydrolases ont présenté 75% des enzymes industrielle (Rao et al., 1998).

La Takadiastase, est la première protéase industrielle, utilisée dans l'industrie textile et les tanneries, découverte par Takamine en 1890 et produite par *Aspergillus oryzae* sur un milieu à base de blé (Sadek, 2000). Par ailleurs, la *Subtilisin Carlsberg*, découverte en 1947, produite par *Bacillus licheniformis* et commercialisée depuis 1960 par la compagnie Novo Nordsik (Danemark) (Yezza et al., 2005). Cependant, les protéases pancréatiques sont utilisées pour le délainage des peaux et comme agent de pré-lavage en 1910, et actuellement remplacées par des protéases d'origine microbienne (Bezawada et al., 2010).

### 1.2.2. Définition des protéases

Les protéases ou les protéinases sont des hydrolases qui scindent les protéines dans des sites bien spécifique en fragments polypeptidiques (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999). Ces enzymes sont produites intracellulairement comme extracellulairement (Pelmont, 1995; Scriban, 1999; Kumar et al., 2008b).

**Tableau 2:** Illustration de la spécificité des protéases (Rao et al., 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à cliver
Trypsine.....	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine.....	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu)↓-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase .....	-Asp (ou Glu)↓-----
Papaïne .....	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa↓-----
Thermolysine.....	.---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine.....	-Phe (ou Tyr, Leu)↓ Trp (ou Phe, Tyr)

La flèche indique le site d'action des protéases ; Xaa, n'importe quel acide aminé.



### 1.2.3. Classification et nomenclature des protéases

Selon l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (**Jakubowski, 2001**), les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases). Leur classification est basée sur plusieurs critères tels que: la longueur et le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique, le pH d'activité et la nature des résidu impliqués dans le site actif (**Colwell et Grigorova, 1989 ; Rao et al., 1998**).

#### 1.2.3.1. Selon la longueur de la chaîne polypeptidique

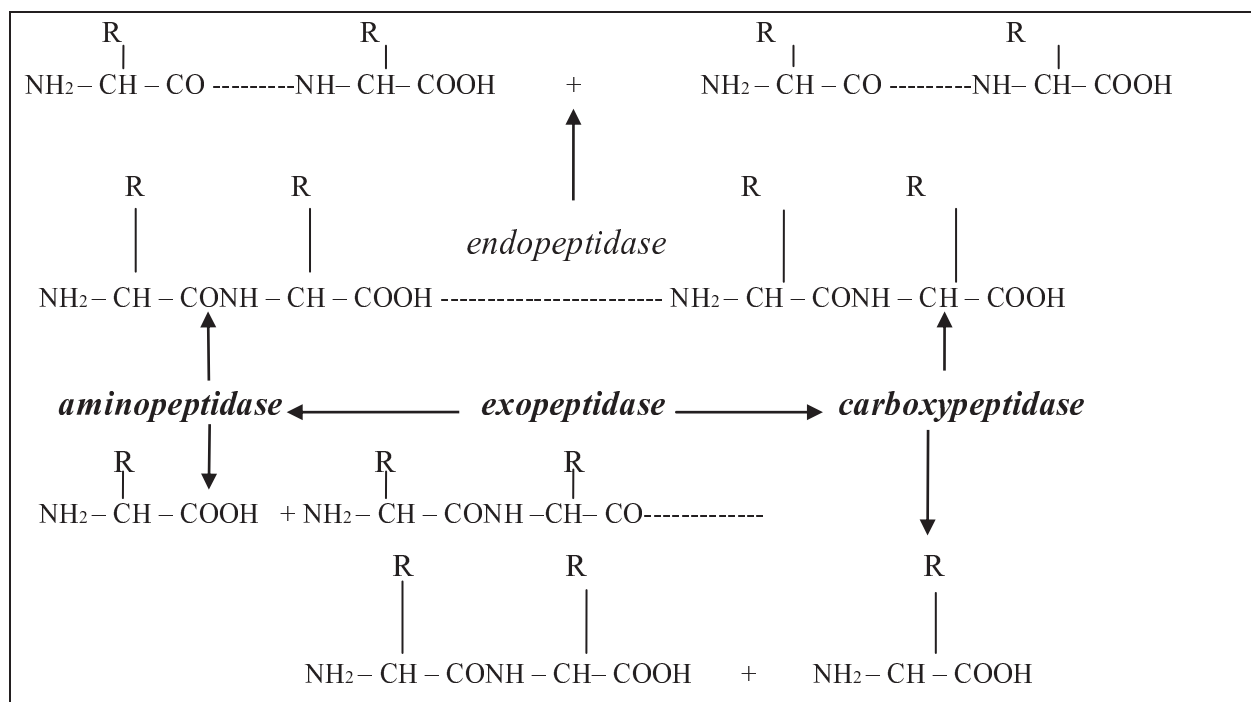
Il existe deux catégories: les protéases qui scindent la molécule protéique en fragments polypeptidiques et les peptidases qui hydrolysent les polypeptides et les transforment en acides aminés libres (**Frazier, 1967 ; Colwell et Grigorova, 1989**).

#### 1.2.3.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

Les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (**Scriban, 1999 ; Moodie, 2001**) (**Tableau3**). Ces dernières sont-elles mêmes subdivisées en deux sous classes les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Les aminopeptidases débutent leur action par l'extrémité NH<sub>2</sub> libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique, les carboxypeptidases commencent leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide (**Scriban, 1999; Trap et Boireau, 2000**) (**Figure 02**).

**Tableau 3:** Classification des protéases (**Rao et al., 1998**).

Type de protéase	Classes et sous-classe
Exopeptidases	Aminopeptidases Peptidyle peptidases Dipeptidyle peptidases Tripeptidyle peptidases Carboxypeptidases Sérine carboxypeptidases Metallocoarboxypeptidases Cystéine carboxypeptidases
Endopeptidases	Protéases sérines Protéases cystéines ou protéases thiols Protéases aspartiques ou protéases acides Métalloprotéases



**Figure 2:** Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

### 1.2.3.2.1. Les exopeptidases

Les exopeptidases hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C terminales des protéines. Ces enzymes sont faiblement utilisées en industrie (Puri *et al.*, 2002).

#### ❖ Aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, d'où les sous-classes (Rao *et al.*, 1998).

#### ❖ Carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont des exopeptidases qui agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines et libèrent un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous classes: les sérines carboxypeptidases, les métallo carboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents au site actif et selon leur mécanisme catalytique (Rao *et al.*, 1998).

### 1.2.3.3. Selon la nature du résidu impliqué dans le site actif

#### 1.2.3.3.1. Les endopeptidases

La plupart des enzymes industrielle sont des endopeptidases. Les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif ont permis leur classification en quatre grandes familles (Jakubowski, 2001).

## ❖ Sérylprotéases ou Protéases sérines

Les protéases sérines sont des enzymes industrielles largement commercialisées dans le monde (**Brar et al., 2007**). Elles sont composées d'un résidu sérine au niveau du site actif et inhibées par le di-isopropyl fluorophosphate (DFP) et le phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF). Les protéases sérines sont actives à des pH neutres et alcalins avec une valeur optimale comprises entre 7 à 11 (**Brar et al., 2007**). Elles ont un large spectre de spécificité au substrat et un faible poids moléculaire (18,5-35 kDa) (**Reginald et al., 1975 ; Kresze, 1991 ; Kortt et al., 1994 ; Miller, 2002**).

## ❖ Cystéylprotéases ou protéases cystéines

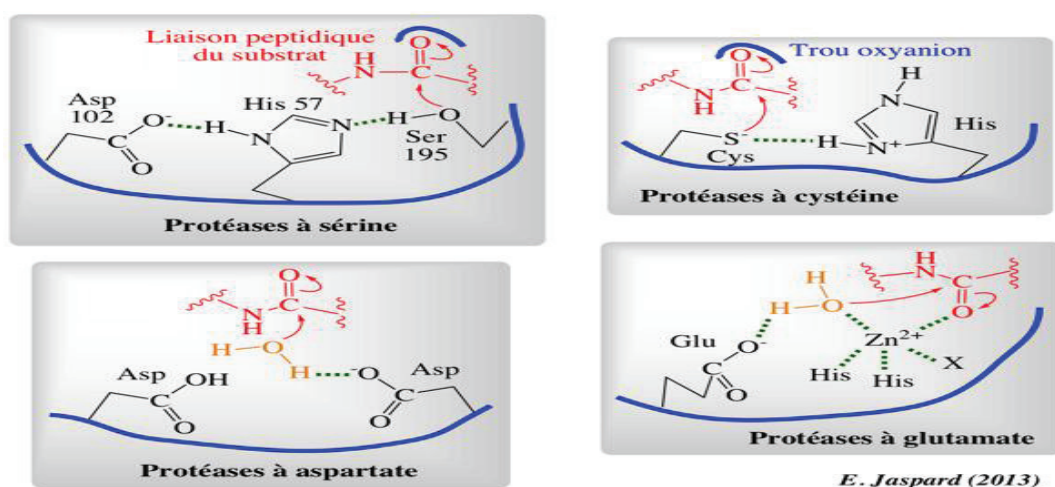
L'occurrence des protéases cystéines est rapportée chez quelques espèces de mycètes (**Kalisz, 1988**). Des enzymes intracellulaires avec des propriétés similaires aux protéases cystéines sont rapportées chez *Trichosporon spp*, *Oidiodendron kalrai* et *Nannizzia fulva*. Par ailleurs, d'autre protéases cystéines extracellulaires sont rapportées chez *Microsporium sp*, *Aspergillus oryzae* et *Sporotrichum pulverulentum* (**Kaur et al., 2001**).

## ❖ Aspartylprotéases

Les protéases aspartiques sont caractérisées par leur activité maximale à des valeurs de pH comprises entre 3-4 (**Joo et al., 2002**). Elles sont largement rencontrées chez les mycètes, et faiblement présentes chez les bactéries et les protozoaires. La plupart de ces protéases ont des poids moléculaires de 30-45 kDa (**Puri et al., 2002**).

## ❖ Métalloprotéases

Les métalloprotéases ont une valeur de pH optimale comprises entre 5-9, sensibles aux agents de chélation tels que l'EDTA (**Giesecke et al., 1991**).



**Figure 3 :** Présentation des quatre types d'endopeptidases (**Jaspard, 2013**).

### 1.2.3.4. Selon le pH d'activité

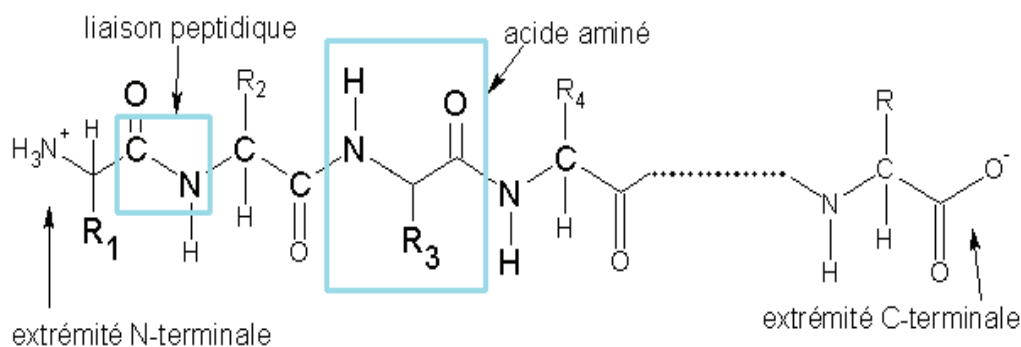
Les enzymes protéolytiques de différentes origines sont classées en trois groupes: les protéases acides, neutres et alcalines (Auberger et al., 1995).

Les protéases fongiques ont des valeurs de pH optimale comprises entre 2.5-5.0 (Auberger et al., 1985; Botton et al., 1999 ; Mechakra et al., 1999). En outre, les métalloprotéases ont un optimum de pH de 7.0, appelées encore les protéases neutres. Par ailleurs, les métalloprotéases ont une activité maximale pour l'hydrolyse de la caséine à des pH entre 7-8 et sont stables dans une gamme de pH comprises entre 5-10. (Aunstrup et al., 1980).

## 1.3. Substrat des protéases

### 1.3.1. Définition d'une protéine

La protéine est une séquence de plus de 100 acides aminés tenus ensemble par des liaisons peptidiques (Frateur et al., 2006). La conformation native d'une protéine lui assure ses propriétés spécifiques, fonctions enzymatiques et mécaniques, stabilité thermique....(Atilganet al., 2001) (Figure 4).



**Figure 4 :** Formule développée d'une protéine de (n) acides aminés. Les  $R_i$  désignent les différentes chaînes latérales des résidus (Atilganet al., 2001).

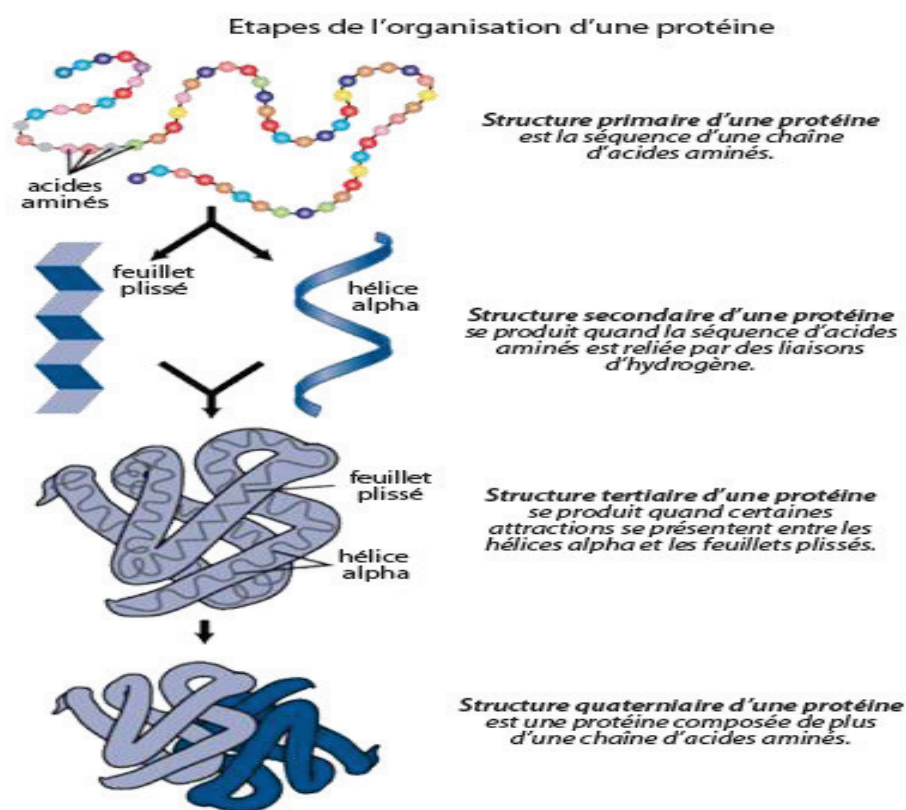
### 1.3.2. Structure d'une protéine

Cette structure est décrite en termes de quatre niveaux (Frateur et al., 2006).

- **La Structure primaire:** Présente la séquence linéaire des acides aminés dans la protéine.
- **La structure secondaire :** Présente l'organisation de groupes d'acides aminés en éléments structuraux simples : hélices alpha, feuilletts et tours beta, autres structures.
- **La structure tertiaire :** C'est le repliement d'une protéine dans l'espace tridimensionnel. Cette structure résulte de l'organisation des éléments de la structure

secondaire entre eux, ou de l'attachement de plusieurs chaînes protéiques par des liaisons covalentes.

➤ **La structure quaternaire :** Présente l'association entre des protéines de structures primaires identiques (homo association) ou distinctes (hétéro association) par liaisons faibles.



**Figure 5 :** Étapes de l'organisation d'une protéine (Bastard, 2003).

### 1.3.3. Principales propriétés d'une protéine

#### 1.3.3.1. La solubilité

Trois catégories de protéines en fonction de leur solubilité sont obtenues :

Les protéines solubles dans l'eau pure telles que les albumines, les protéines solubles dans les sels neutres ou un milieu légèrement acide ou faiblement alcalin telles que les globulines et les protéines insolubles telles que les scléroprotéines (Bahar et al., 1999).

#### 1.3.3.2. Masse moléculaire

Cette propriété diffère d'une protéine à l'autre (Bahar et al., 1997).

#### 1.3.3.3 Propriétés optiques

Les solutions protéiques absorbent et diffusent la lumière. Les propriétés optiques sont en rapport avec la concentration de la solution, la taille et la forme des molécules. Ces propriétés sont importantes pour l'étude et le dosage des protéines (Bahar et al., 1999).

#### 1.3.3.4 Propriétés osmotiques

Les protéines sont des molécules indiffusables à travers les membranes perméables de dialyse, due principalement à leur taille. Elles développent une pression osmotique et interviennent dans les échanges cellulaires ou dans les échanges des secteurs hydriques de l'organisme (**Bahar et Jernigan, 1999**).

#### 1.3.3.5 Propriétés d'ionisation

La totalité des protéines possède un nombre important de groupements ionisables. Cette propriété a permis la séparation et la caractérisation des protéines (électrophorèse ou chromatographie) (**Carugo et Pongor, 2002**).

#### 1.3.4. Abondance des protéines

Les protéines sont indispensables aux processus biologiques et jouent de nombreux rôles dans la structure et le fonctionnement de l'organisme. Elles sont présentes dans les produits alimentaires (animaux et végétaux), les fluides biologiques, les membranes, les tissus et les muscles (**Chen et Stites, 2001**).

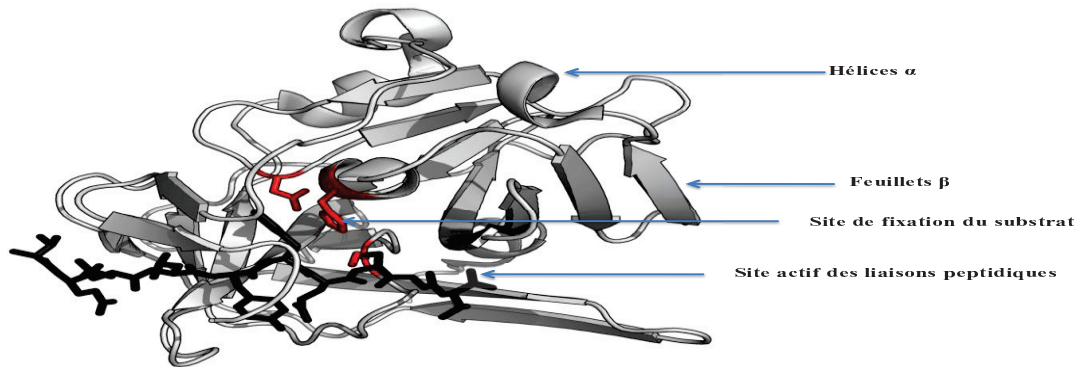
#### 1.3.5. Importance économique des protéines

Les protéines agissent comme des biocatalyseurs qui accélèrent les réactions chimiques du métabolisme. Cette classe de protéine est largement utilisée en industrie. Par conséquent, l'ingénierie des protéines est un domaine de recherche très actif afin de créer de nouvelles enzymes aux propriétés originales qui catalysent des réactions qui ne se produisent pas dans la nature. En effet selon le même rapport, les coûts de recherche ont véritablement explosé ces dernières années, passant de 100 millions d'euros par molécule en 1975 à 600 millions d'euros en 2000 (**Prescrire, 2003; Goozner, 2004**). Dans le but de résoudre ce problème, de nombreuses sociétés pharmaceutiques sont tournées vers les protéines ou leurs dérivés (peptides) comme agents thérapeutiques (**Lathan et al, 1999**).

En effet, cette molécule idéale doit présenter un faible poids moléculaire, être soluble, capable de mimer parfaitement tant chimiquement que structuralement un ligand naturel, ne pas induire d'effets secondaires, être éliminée rapidement de l'organisme, sa production doit être facile, peu onéreuse et son administration au patient doit être aisée. Les protéines peuvent, sous certaines conditions, répondre à ces critères et les sociétés pharmaceutiques croient en l'avenir de cette filière (**Edwards et al, 1999**).

### 1.4. Structure des protéases

Les protéases possèdent un site actif qui assure l'hydrolyse des liaisons peptidiques et un site de reconnaissance du substrat pour agir sur la protéine cible (Figure 6) (Gordon *et al.*, 2005).

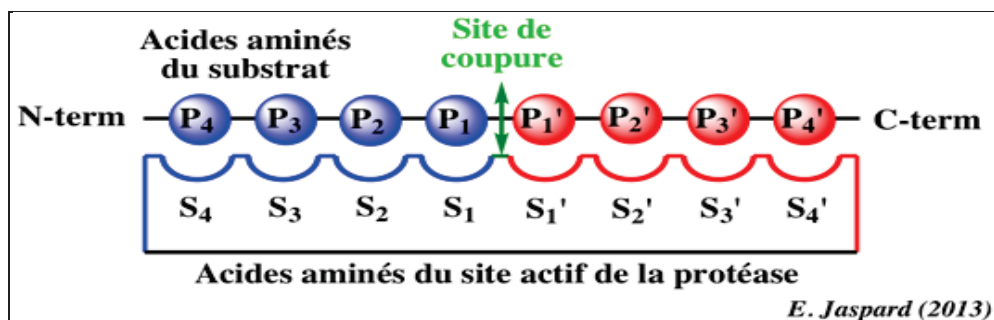


**Figure 6 :** Présentation de la Structure tridimensionnelle d'une protéase bactérienne (Gordon *et al.*, 2005).

### 1.5. Mode d'action des protéases

Le processus catalytique des protéases est récapitulé en trois étapes :

- Dans les deux premières étapes, l'enzyme dégrade la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, ce qui facilite son attaque nucléophile et conduit à la formation d'une liaison covalente transitoire entre le morceau portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération de l'autre morceau (le premier produit) protoné par un proton cédé d'un résidu enzymatique.
- Dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH d'une molécule d'eau et libère le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l' $H_2O$ ) (Pelmont, 1995) (Figure.7).



**Figure 7:** Mode d'action des protéases (Jaspard, 2013).

### 1.6. Propriétés analytiques des protéases

L'activité protéolytique est fortement liée à la valeur du pH, la température, la vitesse de réaction et la présence de certains activateurs ou inhibiteurs (Penasse, 1974).

**Tableau 4:** Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques (Deymié et al., 1981).

Classe	Exemple	Origine	pH optimal	T° optimale	Inhibiteur
Seryl protéases	chymotrypsine	pancréas	8.0 - 8.5	35	nombreux aa PPN ou OP $\alpha$ TSF inhibiteurs naturels PMSF nombreux aa
	trypsine	//	7.5 - 8.0	45	
	subtilisine	<i>B. subtilis</i>	7.4	60	
	p.extracellulaire	<i>B. licheniformis</i>	10	56	
	endopeptidase	<i>B. amyloliquefaciens</i>	10	60	
		<i>Fusarium culmorum</i> <i>Trichoderma viride</i>	8.3 - 9.6 7.0 - 8.0	50 40	
Cystéylprotéase	papaïne	<i>Carica papaya</i>	8.0 - 8.5	35	Hg EDTA oxydants agents chélateurs // et EDTA
	ficine	<i>Ficus globrata</i>	4.0 - 6.0	35	
	protéase neutre	<i>Geotrichum</i>	7.0	42	
	aminopeptidase	<i>candidum</i>	7.0	37	
	streptopain	<i>Lactobacillus</i>	7.2	37	
	cathepsineK	<i>helveticus</i> <i>Streptococcus sp</i> cellules animales	6.5		
Aspartylprotéases	pepsine A	estomac	1.5 - 2.5	40	alcools pepstatine des époxydes (EPNP et le DAN)
	chymosine	estomac de veau	4.0 - 4.5	40 - 42	
	cathepsineD	cellules animales	2.5 - 3.5	37	
	p.extracellulaire	<i>Trichoderma</i>	4.5	40	
	//	<i>harzianum</i> <i>Aspergillus niger</i>	4.6	50	
Métalloprotéases	carboxypeptidase	l'intestin grêle des	7.5	37	certains aa certains aa agents chélateurs
	A	vertébrés	8.0	37	
	carboxypeptidase	//	7.4	50	
	B	<i>Micrococcus</i>	7.4	38	
	P.bactérienne collagénase	<i>caseolyticus</i> Cellules animales			

### 1.7. Répartition des protéases dans le monde vivant

Tous les êtres vivants contiennent des enzymes dans leurs cellules, ces molécules sont présentes sous des formes et des types différents. Il y a les protéases, les amylases, les lipases, les phytases, les cellulases, les hémicellulases, les mannases, les laccases, les lactases et d'autres qui ne sont pas nommées (Sharma et al., 2001 ; Ole et al., 2002;).

#### 1.7.1. Protéases d'origine végétale

Les végétaux ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche pour la production d'enzymes protéolytiques, telles que la bromélaïne extraite de la tige de l'ananas (*Ananas comosus* Merr), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie,



2001). Ces deux enzymes sont proches de la papaïne, extraite du latex d'une plante équatoriale et tropicale (*Carica papaya*) (Alais, 1975). Et la kératinase, protéine utilisée dans la dégradation des cheveux et des laines, produite chez certaines plantes (Rao et al., 1998).

### 1.7.2. Protéases d'origine animale

Les protéases sécrétées par l'estomac des ruminants présentent un intérêt industriel tel que: la présure, enzyme ancienne, largement répandue, préparée à partir du quatrième estomac des veaux, ainsi que les pepsines bovines et porcines. L'activité non spécifique des enzymes pancréatiques telles que les trypsines et chymotrypsines, les rendent moins importantes que les enzymes gastriques (McKenzie, 1971 ; Alais, 1975 ; Scriban, 1999). Des études antérieures réalisées par Trap et Boireau (2000) sur la caractérisation de certaines protéases chez les helminthes : *Schistosoma sp*, *Fasciolasp*, *Taenia sp* et *Haemonchus sp*, ont rapporté leur utilisation comme cibles potentielles majeures en thérapie et en vaccination antiparasitaire.

➤ **La trypsine** : Est une protéase digestive intestinale à sérine de poids moléculaire de 23,3 kDa), responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût amer entraîné (Rao et al., 1998).

➤ **La chymotrypsine** : La chymotrypsine pure est une protéase très coûteuse de poids moléculaire de 23,8 kDa, utilisée uniquement dans des applications de diagnostic et d'analyse (Rao et al., 1998).

➤ **La pepsine** : Est une protéase acide présente dans l'estomac de la totalité des vertébrés de poids moléculaire de 34,5 kDa, dont les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (Scriban, 1993).

➤ **La rénine** : Est une protéase à aspartate de poids moléculaire de 30,7 kDa et présente un constituant majeur de la présure, utilisée dans industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (Pelmont, 1995 ; Rao et al., 1998).

### 1.7.3. Protéases d'origine microbienne

Les protéases peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

#### ➤ Protéases des moisissures

Les protéases sont produites chez certaines souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc. Elles sont largement utilisées en industrie telles que la boulangerie, l'industrie alimentaire humaine et animale, la production des détergents (lessives), dans les tanneries et en industrie pharmaceutique (Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003).

### ➤ Protéases des levures

Certaines levures appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces* sont largement utilisées dans la production des protéases. Par exemple, *Saccharomyces cerevisiae* produit trois types de protéases, l'aspartylprotéase, la sérine protéase et la métalloprotéase. L'activité protéolytique de ces genres est particulièrement utilisée dans l'affinage des fromages (Kresze, 1991 ; Boiron, 1996).

### ➤ Protéases des bactéries

Les protéases bactériennes telles que la subtilisine ou subtilase, essentiellement produite chez *Bacillus subtilis* et certains genres apparentés sont caractérisées par leur stabilité et leur résistance à l'action des détergents (Frazier, 1967; Calk et al., 2000). Certaines bactéries psychrotrophes du lait et particulièrement *Pseudomonas*, sécrètent des métalloprotéases thermorésistantes, utilisées dans la coagulation du lait et dans l'affinage du fromage, ensuite détruites par la pasteurisation. Cependant, les protéases extracellulaires sont partiellement inactivées (Cousin et al., 1982). Par ailleurs, les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* sont utilisées dans l'affinage des fromages (Desmazeaud, 1978).

## 1.8. Mesure de l'activité protéolytique

La mesure de l'activité protéolytique est précédée par des méthodes qualitatives et quantitatives. Les méthodes qualitatives reposent sur l'analyse du diamètre de la zone claire d'hydrolyse formée sur la surface du milieu de culture gélosé, due principalement à la production de la protéase. Par ailleurs, les méthodes quantitatives ont permis de mesurer le potentiel protéolytique d'une enzyme par dosage de la quantité de peptide libérée lors de l'hydrolyse d'une protéine. La lecture est effectuée par spectrophotométrie, fluorométrie, radiométrie et la méthode d'ELISA (Gupta et al., 2002)

## 1.9. Physiologie de la production des protéases

La production des protéases chez les bactéries est considérablement affectée par de nombreuses conditions environnementales telles que la nature et la concentration des sources d'azotes et de carbones, la valeur du pH du milieu de culture, la température et l'aération. (Kumar et Parrack, 2003).

### ➤ Influence de la source de carbone

L'utilisation du glucose comme source de carbone dans la culture des bactéries productrices de la protéase est largement étudiée (Frankena et al., 1985; Sinha et al., 1991 ; Ferrero et al., 1996; Kumar et Takaji, 1999; Gupta et al., 2002a; Puri et al., 2002). En effet, lors d'une fermentation employant le glucose comme source de carbone, la production de la

protéase commence au moment où ce sucre est épuisé (Ferrero et al., 1996; Kumar et Takaji, 1999). Par contre, l'ajout du glucose au milieu de culture induit une inhibition de la production de la protéase (Doi, 1974). Cependant, l'utilisation de certains sucres tels que le lactose et le fructose à des faibles concentrations (3-4 %) permet une meilleure production de la protéase (Mabrouk et al., 1999). Par ailleurs, l'emploi du sucrose, maltose et le xylose ont donné des rendements très faibles (Ferrero et al., 1996; Mabrouk et al., 1999).

➤ **Influence de la source d'azote**

La production de la protéase est fortement liée à la disponibilité des sources d'azote (Kumar et Takaji, 1999). La présence d'azote inorganique est nécessaire pour la production de cet enzyme. L'ajout d'une source d'azote telle que les ions ammonium ou de nitrate à des faibles concentrations dans un milieu de culture à base de caséine a stimulé considérablement la production de la protéase. A l'opposé, l'ajout des ions ammonium en grande quantité a manifesté un effet répressur sur la production de cette enzyme (Giesecke et al., 1991 ; Ferrero et al., 1996). Cependant, cette production est considérablement inhibé par la présence de certaines sources d'azote inorganiques rapidement métabolisables telles que les acides aminés et l'ion ammonium (Giesecke et al., 1991; Kumar et Takaji, 1999).

Par ailleurs, l'utilisation de sources d'azotes organiques telles que les peptones, la caséine, l'extrait de bœuf, les liqueurs de maïs et le son de blé ont généralement stimulé la production protéolytique (Sinha et al., 1991; Mabrouk et al., 1999; Puri et al., 2002).

➤ **Influence des éléments traces**

Certains ions tels que le calcium, le cobalt, le cuivre, le bore, le magnésium, le manganèse et le molybdène ont manifesté un effet bénéfique sur la production de la protéase. Le calcium contribue à la stabilité des protéases (Kumar et Takaji, 1999). Le phosphate de potassium, utilisé comme source de phosphore a montré un effet tampon sur le milieu de culture (Kembhavi et al., 1993; Kumar et Takaji, 1999).

➤ **Effet du PH**

Calik et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que la valeur du pH du milieu de culture a affecté considérablement les mécanismes de régulation métabolique de la production des protéases chez les bactéries. Par ailleurs, Kembhawi et al., (1993) et Hameed et al., (1999) ont montré que la production de la protéase est maximale lors du contrôle des valeurs de pH du milieu de culture durant les phases de croissance. Des résultats similaires sont observés dans plusieurs autres études (Kumar et Takaji, 1999 ; Gupta et al., 2002b).

➤ **Effet de la température**

La température constitue un facteur abiotique très important, qui influence considérablement la production de la protéase chez les microorganismes mis en cause. Cependant, Les protéases sont produites à des intervalles de température variés selon la bactérie sélectionnée productrice (**Hmidet et al., 2009**).

➤ **Aération et agitation**

L'agitation assure un environnement nutritionnel et physique homogène dans la culture des cellules. Un tel environnement est indispensable pour une production maximale de protéases (**Calik et al., 2000a**). Des taux d'aération et d'agitation contrôlés et optimaux sont indispensables pour assurer un transfert d'oxygène adéquat lors des fermentations (**Calik et al., 1998 et 2002; Hameed et al., 1999; Yezza et al., 2004**).

### **1.10. Applications industrielles des protéases**

Les protéases sont des enzymes réputées pour leur robustesse et leur aptitude à être utilisées dans l'industrie du détergent, tannerie, la récupération de l'argent, l'industrie pharmaceutique et alimentaire, les industries chimiques et le traitement des déchets. Ces enzymes contribuent au développement de produits à hautes valeurs ajoutées par exploitation de leur activité de digestion partielle (**Rahman et al., 2005**). Les domaines d'utilisation des protéases sont nombreux et variés :

#### **1.10.1 Industrie du détergent**

L'utilisation des protéases dans la production des détergents à usage domestique a vêtu une importance particulière. L'intérêt porté aux enzymes protéolytiques est due principalement aux apports en terme de qualité du nettoyage reconnue par le consommateur, aux performances d'amélioration de la qualité des tissus et l'augmentation du rapport performance/prix en raison de la disponibilité d'enzymes de plus en plus efficaces couplée à une réduction des couts de production industrielle (**Rahman et al., 2005; Joo et Chang, 2005; Guangrong et al., 2008**).

#### **1.10.2. L'industrie du cuir**

L'industrie du cuir et de tannerie ont utilisé les enzymes protéolytiques pour l'épilage des peaux d'animaux. Traditionnellement, cette opération est effectuée par le traitement des peaux d'animaux avec une solution saturée de chaux et de sulfite de sodium. Outre, la technique de production très couteuse et drastique, elle conduit à l'accumulation d'un effluent très pollué (**Calik et al., 2000a**). Cependant, l'utilisation des enzymes pour l'épilage des peaux

d'animaux devient possible lors de l'utilisation des protéases hautement alcaline (pH11) (Brar et al., 2004; Barnabé, 2007).

### 1.10.3. Récupération de l'argent

Les protéases sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usagés pour la récupération de l'argent. En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1.5 à 2% (m/m) d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnelle de récupération de l'argent consiste à brûler les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela l'utilisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base de polyester du film (Fujiwara et Yamamoto, 1987 ; Fujiwara et al. 1989 ; Gajju et al., 1996 ).

### 1.10.4. Usages médicaux

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium sp*, ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement de brûlures et de plaies. Une élastotérase provenant de *B. subtilis* est utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes (Kudrya et Simonenko, 1994). Enfin, une asparaginase provenant d'*E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine chez des patients atteints de certaines formes de leucémie (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002a).

### 1.10.5. Industrie alimentaire

Les protéases sont largement utilisées dans la préparation d'hydrolysats de protéines à haute valeur nutritionnelle par leur intervention dans la régulation de la pression artérielle, elles sont également employés dans fabrication de certains aliments des enfants, les produits diététiques et l'enrichissement des jus de fruits et des boissons non alcoolisées (Lazim et al., 2009).

Certains hydrolysats de protéine de la caséine, des protéines du lactosérum et de soja sont majoritairement utilisés dans les formulations d'aliments hypoallergéniques des enfants (Elibol et Moreira, 2005). Par ailleurs, certaines protéases interviennent dans l'attendrissage de la viande de bœuf. Une élastase alcaline et une protéase alcaline thermostable ont montré leurs efficacités à attendrir la viande puisqu'elles possèdent la capacité d'hydrolyser les tissus connectifs ainsi que les fibres protéiques des muscles. (Godfrey et al., 1985 ; Takagi et al., 1992).

### ❖ Préparation du fromage

L'industrie fromagère utilise une importante quantité de protéases acides dans la production du fromage (Fogarthy et Kelly, 1990 ; Rao et al., 1998). La majorité des protéases utilisées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. De nombreuses enzymes sont utilisées dans le procédé de la coagulation des protéines du lait telles que la présure de veau, enzyme provenant du système digestif des jeunes veaux. A cet effet, cette enzyme est remplacée par des protéases microbiennes (Lamontagne, 2004).

### ❖ Boulangerie

La farine de blé largement utilisée en boulangerie, contient de protéine insoluble dans l'eau et du gluten, responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour l'hydrolyse du gluten (Rao et al., 1998).

### ❖ Produits à base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées largement dans la préparation de la sauce soja et d'autres produits alimentaires. Les modifications des protéines du soja en présence des protéases ont permis l'augmentation de leurs propriétés fonctionnelles. A cet effet, le traitement des protéines par la protéase alcaline, ajustée à une valeur de pH 8 a permis la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes (Rao et al, 1998).

### ❖ Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. La configuration en *L* de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est crucial et engendre des coûts très importants lors de l'utilisation des méthodes de synthèse chimiques. La synthèse enzymatique de l'aspartame est préconisée lors de la considération des protéases comme des enzymes hydrolytiques, capables de catalyser parfois la réaction inverse en présence de certaines conditions précises (Rao et al., 1998).

#### 1.10.6. Traitement des déchets

Les protéases ont trouvé de nombreuses applications dans le domaine de la gestion des déchets domestiques et des industries agro-alimentaires. Les protéines fibreuses de poils, de cheveux, d'ongles ou encore de plume sont des déchets très abondants dans la nature, qui peuvent être transformées en biomasse et en acides aminés par l'utilisation de certaines protéases d'origine microbienne (Anwar et Saleemuddin, 1998).

**1.10.7 Industrie chimique**

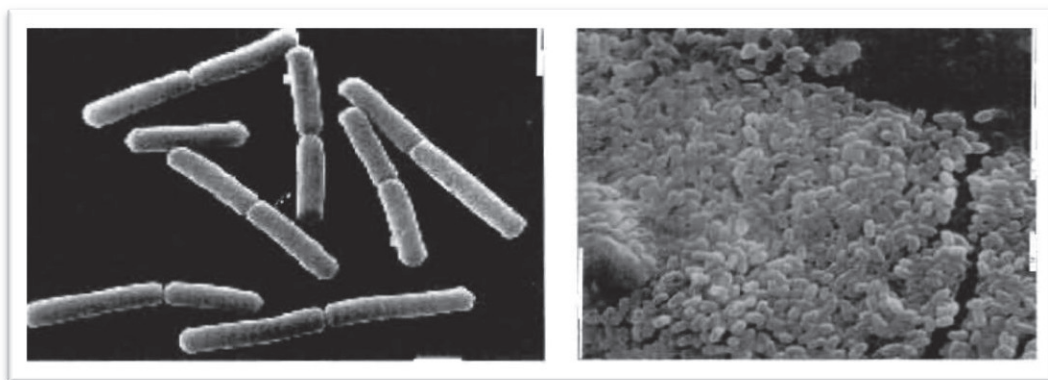
Les enzymes sont des biocatalyseurs qui interviennent dans des réactions de la synthèse chimique à travers la dégradation des matières organiques. Cependant, une conséquence majeure de cette approche est que l'activité enzymatique est réduite dans des conditions de déshydratation assez poussée. Des travaux antérieurs réalisés par (**Chen et al., 1991; Nagashima et al., 1992; Gololobov et al., 1994**) ont rapporté sur l'utilisation des protéases dans la synthèse des peptides dans des milieux de culture organique. Par ailleurs, **Wilson et ces collaborateurs (1994)** ont rapporté sur la synthèse des peptides en présence des enzymes immobilisées sur des supports insolubles.

## 2. Ingénierie des protéases bactériennes

### 2.1. Les genres *Bacillus* et *Lysinibacillus*

#### 2.1.1. Caractéristiques générale

*Bacillus* et *Lysinibacillus* appartenant à la famille des Bacillaceae (Bradley et Galil, 1977) sont de grands bacilles en forme de bâtonnets, gram positif, groupés en chaînettes, aérobie à anaérobie facultatifs, sporulés et ubiquitaires (Claus et Berkeley, 1986) (Figure 8). Le genre *Bacillus* se distingue des autres représentants de la famille par de nombreux caractères tels que leur hétérogénéité sur le plan génétique et phénotypique notamment au niveau de leur distribution dans la nature et leur métabolisme (Gordon et al., 1973 ; Claus et Berkeley, 1986). En outre, les espèces de ce genre présentent plusieurs intérêts d'ordre médical, agronomique, pharmaceutique et industriel (Gordon et al., 1973; Hara et Veda, 1982; Carr, 1983; Parry et al., 1983). Par ailleurs, *Lysinibacillus* est un autre genre appartenant à la famille des Bacillaceae, connu initialement sous le nom de *Bacillus* (Albert et al., 2007 ; Lee et al., 2010). Cette classification taxonomique est réattribuée en raison de leur caractéristiques distinctives telles que leur physiologie, leur phylogénie et la composition de leur peptidoglycane (Ahmed et al., 2007).



A

B

**Figure 8:** Caractéristiques morphologiques des *Bacillus* (A : cellules végétatives, B : spores) (Claus et Berkeley, 1986).

#### 2.1.2. Taxonomie et classification

##### 2.1.2.1. Taxonomie phénotypique

Les Bacillaceae sont classés par l'utilisation des approches phénotypiques telles que les caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels (Snith et al., 1952; Gordon et al., 1973; Logan et Berkeley 1984; Berkeley et al., 1984; Stackebrandt et al.,



1987). Cependant, la classification la plus utilisée est basée sur la forme des spores qui permet de distinguer 3 groupes (Fritze, 2004) :

- Bacilles à spore ovale non déformante.
- Bacilles à spore ovale déformante.
- Bacilles à spore ronde déformante.

#### 2.1.2.2. Taxonomie génotypique

Des approches moléculaires basées sur la composition d'ADN (Fahmy et al., 1985), la séquence du gène 16S (Crosby et Criddle, 2003) et l'hybridation ADN-ADN (Priest et al., 1981) sont mises en évidence.

La classification des Bacillaceae est basée essentiellement sur deux critères, la croissance dans des conditions d'aérobiose et la formation d'endospore. Dans l'édition de Bergey (1986), le genre *Bacillus* comporte 34 espèces (Tableau 5), distingués par leur morphologie, leur type respiratoire et la présence de l'enzyme de catalase. Ce genre apparait extrêmement hétérogène sur le plan génétique avec un pourcentage GC de 32-69% que phénotypique (Ochi, 1994 ; Kenneth et Ph, 2008).

Tableau 5: Origines des isolats d'espèces de *Bacillus* (Ochi 1994).

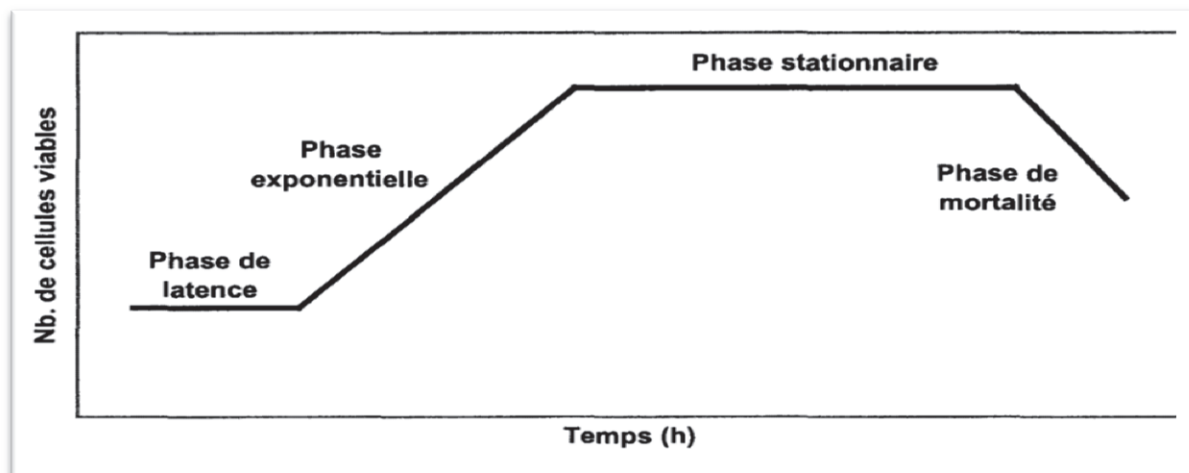
Espèces	Habitat et origines d'isolement
<i>B. subtilis</i>	Sol et eau
<i>B. acidocaldarius</i>	Eau acide, thermique et sol
<i>B. alcalophilus</i>	Sol alcalin
<i>B. alvei</i>	Sol, les larves d'abeilles malades
<i>B. amylolyticus</i>	Sol
<i>B. anthracis</i>	Animaux malades
<i>B. azotoformans</i>	Sol
<i>B. badius</i>	Matières fécales, aliments , sources marines
<i>B. brevis</i>	Sol, aliments
<i>B. cereus</i>	Sol, aliments
<i>B. circulans</i>	Sol
<i>B. coagulans</i>	Aliments acides
<i>B. fastidiosus</i>	Sols, litières de volaille
<i>B. firmus</i>	Sol, marais salants
<i>B. globisporus</i>	Sol, eau
<i>B. insolitus</i>	Sol
<i>B. larvae</i>	Larves d'abeilles malades
<i>B. laterosporus</i>	Sol, eau
<i>B. lautus</i>	Sol et matière fécales
<i>B. lentimorbus</i>	Larves d'abeilles malades
<i>B. licheniformis</i>	Sol
<i>B. macerans</i>	Matières végétale et aliments
<i>B. macquariensis</i>	Sol subantarctique
<i>B. marinus</i>	Sédiments marins
<i>B. megaterium</i>	Sol
<i>B. mycoides</i>	Sol
<i>B. pabuli</i> Soil	Sol, fourrages
<i>B. pantothenicus</i>	Sol
<i>B. pasteurii</i>	Sol, eau, eaux usées
<i>B. popilliae</i>	Coléoptères scarabid malades
<i>B. psychrophilus</i>	Sol, eau
<i>B. pumilus</i>	Sol
<i>B. schlegelii</i>	Sédiments des lacs
<i>B. sphaericus</i>	Sédiments des eaux, sol, les aliments
<i>B. stearothermophilus</i>	Sol, sources d'eaux chaudes, aliments
<i>B. thermoglucosidasius</i>	Sol
<i>B. thuringiensis</i>	Sol, aliments
<i>B. validus</i>	Sol

### 2.1.3. Croissance et métabolisme

Les molécules organiques et les glucides sont utilisés comme source d'énergie et de carbone dans la culture de *Bacillus* (Deutscher et al., 2002). De plus, des composés organiques d'une grande variété sont utilisés comme source d'azote et assimilés par les souches de Bacillaceae sous forme de  $\text{NH}_4^+$ . *Bacillus* manifeste une croissance optimale dans des conditions aérobies sur un milieu de culture usuel. Cependant, certaines souches de ce genre peuvent croître en anaérobiose, grâce à leur capacité de fermentation des sucres et la respiration anaérobie par l'utilisation du nitrate comme accepteur final d'électron (Fisher et Débarbouillé, 2002).

Par ailleurs, ce genre peut pousser sur une large gamme de température de 20-60°C. A l'opposé, les températures optimales de la production des protéases varient entre 30-60°C selon les souches mises en cause (Gupta et al., 2002a).

Le pH optimal de croissance est situé entre 7,0 et 7,65. D'autre part, les fermentations sont effectuées en mode discontinu sur un milieu de culture non régénéré (Atlas et Bartha, 1998; Meunier, 1999) et représentées graphiquement par quatre phases bien distinctes (Figure 9) (Prescott et al., 1995).



**Figure 9:** Courbe de croissance microbienne en mode discontinu (Prescott et al., 1995).

### 2.1.4. Production de la protéase

La production de la protéase est initiée durant la phase stationnaire chez les différentes espèces des Bacillaceae, elle est grandement influencée par les conditions de culture. Cette production est inhibée en présence de certaines sources de carbone ou d'azote et stimulée en conditions limitantes (Secades et Guijarro, 1999). Par ailleurs, de nombreux facteurs

physiques tels que le pH, la température, l'aération et le volume d'inoculum peuvent interagir (Hameed et al., 1999). La synthèse des protéases est intimement liée à la sporulation chez la totalité des espèces de Bacillaceae (Zouari et Jaoua, 1999). En effet, la protéolyse effectuée permet la fourniture des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines impliquées dans la formation des spores (Doi, 1972; Reddy et al., 1998).

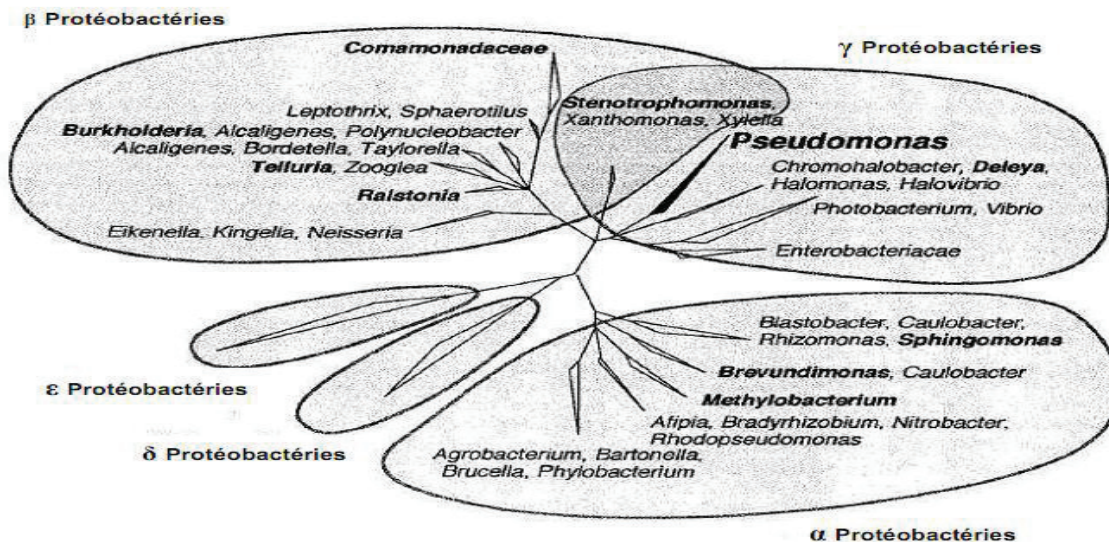
De plus, les protéases produites par les espèces de Bacillaceae ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherches, puisque de nombreuses études ont démontré leur capacité à hydrolyser les cristaux protéiques (Chestukhina et al., 1980; Andrews et al., 1985; Bibilos et Andrews, 1988; Carroll et al., 1993, Donovan et al., 1997; Meenakshisundareseh et Gujar, 1998).

## 2.2. Le genre *Pseudomonas*

### 2.2.1. Caractéristiques générale

La famille des Pseudomonadaceae représente un large groupe bactérien de la sous-classe des  $\gamma$  protéobactéries, avec plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (Hansen, 1991 ; Bossis et al., 2000 ; Palleroni, 2008). Le genre type de ce groupe est *pseudomonas* et les espèces regroupées sont principalement des microorganismes saprophytes, telluriques et aquatiques. Toutefois, leur isolement est effectuée à partir des végétaux, des selles, des sécrétions et de la surface de la peau. Certaines espèces de *Pseudomonas* sont responsables des altérations des denrées alimentaires réfrigérées en produisant des enzymes (protéases et lipases) et le dégagement des odeurs indésirables (Alquati et al., 2002).

En milieu hospitalier, les *Pseudomonas* sont rencontrées dans l'environnement immédiat des patients (évier, robinets et équipement sanitaire) (Tryfinopoulou et al., 2002). Certaines espèces sont pathogènes de l'homme, les animaux et les plantes (Akkermans et al., 1996 ; Nishimori et al., 2000 ; Munsch et Alatosava, 2002). Cependant, d'autres sont utiles et stimulent la croissance des plantes (Bouchez et al., 1995 ; Johnsen et al., 1996 ; Andersen et al., 2000 ; Pandey et al., 2002 ; Kesseru et al., 2003)(Figure 10).



**Figure 10 :** Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis et al., 2000).

## 2.2.2. Classification et taxonomie

### 2.2.2.1. Étapes de la classification

Stanier et ses collaborateurs (1960) ont rapporté sur les caractéristiques nutritionnelles de 267 isolats du genre, basé essentiellement sur l'utilisation de 146 composés organiques, en plus d'autres tests déterminants. Par ailleurs, la découverte du caractère de renaturation de l'ADN, a permis de confirmer la classification phénotypique des *Pseudomonas*, lors des essais d'hybridation ADN/ADN (Colwell et Mandel, 1964; Colwell et al., 1965; Johnson et Ordal, 1968 ; Palleroni, 2008).

Le plus grand succès de la classification des *Pseudomonas*, selon les caractères génotypiques est atteint par Palleroni et ses collaborateurs en 1973, qui ont classifié ce groupe en cinq sous-groupes d'ARNr, sur la base d'homologies ARN/ADN.

Toutefois, ces sous classes d'ARNr sont phylogénétiquement trop éloignées, et finalement seules les bactéries appartenant au groupe ARNr I sont retenues dans le genre *Pseudomonas* (Peix et al., 2009).

Dans l'édition de Bergey (1974), ces bactéries appartiennent à la famille des Pseudomonadaceae. Leur classification est basée sur des caractéristiques phénotypiques, avec l'ajout de la composition en G-C comme caractéristique génétique.

La révision taxonomique détaillée du genre *Pseudomonas* est basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S (Anzai et al., 2000). En analysant les séquences de 128 espèces de

*Pseudomonas*, ils ont conclu que 57 seulement appartiennent au groupe des *Pseudomonas sensu stricto*; la comparaison de 1073 nucléotides les a subdivisés en 7 classes :

- Le groupe des *P. syringae*.
- Le groupe des *P. chlororaphis*.
- Le groupe des *P. fluorescens*.
- Le groupe des *P. putida*.
- Le groupe des *P. stutzeri*.
- Le groupe des *P. aeruginosa*.
- Et le groupe des *P. pertucinogena*.

#### 2.2.2.2. Classification contemporaine

##### ➤ Caractéristiques phénotypiques

Cette approche est basée sur la forme cellulaire, le type de flagelle, les sources de carbone utilisées, la capacité de croissance dans des conditions de culture variables, la synthèse d'exoenzymes et la production d'antibiotiques (Palleroni, 2005).

##### ➤ Études chémo-taxonomiques

La présence de certains lipides polaires telles que le phosphatidyl-glycerol, diphosphatidyl-glycerol et la phosphatidyl-éthanolamine (Camara et al., 2007), les ARN stables (5S rRNA et tRNA) de faible poids moléculaire (Höfle, 1988, 1990), et les systèmes quinones sont utilisés dans la reclassification des *Pseudomonas* (Kampfer et al., 2008 ; Peix et al., 2009).

##### ➤ Caractérisations génétiques

Les gènes ribosomiaux sont présents chez tous les organismes et possèdent la même fonction vitale. Ces caractéristiques font des ribosomes d'excellents candidats d'études pour les taxonomistes (Meyer et al., 2002, 2007). Parmi tous les ARN ribosomiaux seul le gène ARNr16S remplit ces deux caractéristiques, le gène ARNr 23S est extrêmement conservé alors que le gène ARNr 5S est trop petit (Peix et al., 2009). Pour cette raison l'ARNr 16S est devenu la molécule clé dans la classification des procaryotes, incluant les *Pseudomonas* (Anzai et al., 2000; Palleroni, 2005).

#### 2.2.3. Croissance et métabolisme

Le genre *Pseudomonas* est caractérisé par un métabolisme oxydatif et non fermentatif, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (Lelliot et al., 1966 ; Holloway, 1992). Cependant, d'autres souches utilisent pour leur croissance les nitrates comme accepteur final d'électrons (dénitrification). Ces bactéries sont catalase positive, mésophile et chimio-organotrophe (Bossis et al., 2000 ; Ramalho et al., 2002). Par ailleurs, d'autres souches sont chimio-organotrophes facultatives et utilisent l'hydrogène comme source d'énergie (Mavrodi

et *al.*, 2001 ; Euzeby, 2008). Leur température optimale de croissance est située entre 4-42°C, cette dernière est caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*. Les *Pseudomonas* ont la faculté de dégrader les composés organiques complexes, tels que les protéines et les polysaccharides (l'amidon et la cellulose)(Palleroni, 1984 ;Visca et *al.*, 2007).

#### 2.2.4. Production de la protéase

*P. aeruginosa* produit deux types de protéases : les métalloprotéases et les sérineprotéases avec une régulation par le quorum-sensing ( Toder et *al.*, 1991; Gambello et Iglewski, 1991; Gambello et *al.*, 1993).

##### 2.2.4.1. Les métalloprotéases

###### 2.2.4.1.1. L'élastase Las B (Pseudolysine)

L'élastase Las B est une métalloprotéase d'un poids moléculaire de 33 kDa, codée par le gène *lasB* et sécrétée par le système de sécrétion de type II (Moriyama et *al.*, 1965 ;Bever et Iglewski, 1988; Kessler et Safrin, 1988 ; De Bentzmann et *al.*, 2000 ; Beaufort et *al.*, 2004). L'activité de cette protéase est fortement liée à la présence du zinc et intervient dans la pathogénie de *P.aeruginosa* (Azghani et *al.*,1993; Azghani, 1996; Kon et *al.*, 1999 ; Azghani et *al.*, 2000; Alcorn et *al.*, 2004; Dulon et *al.*, 2005).

###### 2.2.4.1.2. L'élastase Las A (Staphylolysine)

L'élastase Las A est une protéase de 20 kDa, codée par le gène *lasA* et sécrétée par le système de sécrétion de type II, elle agit en synergie avec l'élastase Las B pour la dégradation de l'élastine (Olson et Ohman, 1992 ;Kessler et *al.*, 1997). Cette protéase représente un facteur de virulence important qui a la capacité de moduler les défenses de l'hôte (Estrellas et *al.*, 2000; Park et *al.*, 2001).

###### 2.2.4.1.3. La protéase alcaline (Aeruginolysine)

La protéase alcaline est une métalloprotéase à zinc d'un poids moléculaire de 56 kDa, codée par le gène *aprA*, et représente la seule protéase sécrétée par le système de sécrétion de type I. Elle lyse la fibrine et inhibe sa formation (Okuda et *al.*, 1990 ; Guzzo et *al.*, 1991 ; Leidal et *al.*, 2003; Kipnis et *al.*, 2004 ).

##### 2.2.4.2. Les sérine-protéases

###### 2.2.4.2.1. La protéase IV (Arginyl peptidase)

La protéase IV est une protéase d'un poids moléculaire de 26 kDa, codée par le gène *prpL*, dégrade les protéines A, D et B du surfactant, le fibrinogène, la plasmine, le plasminogène, l'épithélium cornéen, les IgG, le complément et contribue aussi au pouvoir pathogène de la bactérie (O'Callaghan et *al.*, 1996 ; Engel et *al.*, 1997; Engel et *al.*, 1998a ; Engel et *al.*,

1998b; Wilderman et al., 2001; Traidej et al., 2003 ; Matsumoto et al., 2004 ; Malloy et al., 2005).

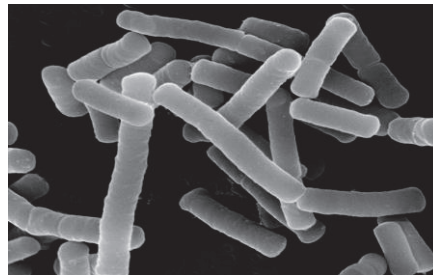
#### 2.2.4.2.2. Las D

La protéase Las D est une protéase d'un poids moléculaire de 23 kDa, intervient dans la lyse de *Staphylococcus aureus* et favorise la prédominance de *P. aeruginosa* au niveau du poumon (Park et Galloway, 1995 ; Braun et al., 1998; Park et Galloway, 1998 ; Folders et al., 2000).

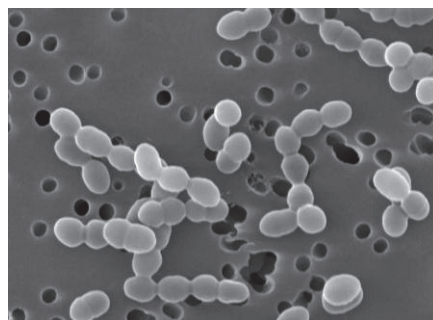
### 2.3. Les bactéries lactiques

#### 2.3.1. Caractéristiques générale

Les bactéries lactiques sont des microorganismes à Gram positif qui regroupent 12 genres dont : *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus*. C'est un groupe avec des formes en bâtonnets ou en coques, immobiles et non sporulant (Salminen et al., 2004)(Figures 11 et 12).



**Figure 11 :** Observation au microscopique électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) de *Lactobacillus* Rosell-11 ([http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52\\_big.jpg](http://www.institut-rosell-lallemand.com/uploads/images/souches/lactobacillus-R52_big.jpg)).



**Figure 12:** Observation au microscopique électronique à transmission (M.E.T.) (x10000) d'*Enterococcus* (<http://www.oocities.com/cheezyfr/photos/Enterococcus.jpg>).

Les bactéries lactiques sont souvent rencontrées dans différentes niches écologiques telles que le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson, les muqueuses humaines et animales et le tractus digestif, ce qui explique l'hétérogénéité de leur température de



croissance (**Tableau 6**). La taille de leur génome est comprise entre 1,8-3,3 Mpb, avec un pourcentage GC compris entre 30 et 60% (**Stiles et Holzapfel, 1997**). Les bactéries lactiques sont caractérisées par leur capacité de fermentation des sucres tels que le glucose, fructose, mannose, galactose, saccharose et lactose en acide lactique, l'absence de production d'une pseudocatalase et le métabolisme anaérobie strict ou aérotoleérant (**Kandler et Weiss, 1986 ; Hardie, 1986**).

### 2.3.2. Taxonomie et classification

#### 2.3.2.1. Origine des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont rencontrées dans des sédiments datant de 2,75 milliard d'années, avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui explique leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). De même, des études antérieures sur la phylogénie bactérienne ont rapporté sur leur apparition avant les cyanobactéries (**Quiberoni et al., 2001**).

#### 2.3.2.2. Diversité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques ont regroupé de nombreux genres bactériens tels que *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* (**Tableau 6**). De plus, l'utilisation des séquences des gènes codant les ARN 16S et 23S a conduit à l'identification de nouveaux genres bactériens, tels que *Carnobacteria*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus* (**Vandamme et al., 1996**).

#### 2.3.2.3. Taxonomie des bactéries lactiques

De nombreuses classifications des bactéries lactiques sont proposées telles que l'utilisation de la composition de la paroi cellulaire (**Gilarová et al., 1994 ; de Ambrosini et al., 1996**), et les différents types de fermentation du glucose, cette dernière a permis de distinguer 3 groupes de bactéries lactiques (**McLeod et al., 2008**). Groupe I des bactéries homofermentaires comporte majoritairement des *Lactobacillus*. Le groupe II des bactéries hétérofermentaires telles que les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Et le groupe III rassemble quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces du genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* (**McLeod et al., 2008**). Les études d'hybridation ADN/ADN et des séquences d'ARN ribosomiaux sont devenues des éléments essentiels permettant l'identification et la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Stanckbrandt et Teuber, 1988 ; Woese et al., 1990 ; Mäkelä et al., 1992 ; Vandamme et al., 1996 ;**).

Selon la dernière édition de **Bergey (2009)**, les bactéries lactiques sont classées dans le Phylum des Firmicutes, la Classe des Bacilli et l'Ordre des Lactobacillales, renfermant

trente-cinq genres (Pot, 2008 ; Rodrigues et al., 2014) réparties sur six familles. Parmi ces genres, seulement douze sont importants d'un point de vue biotechnologique (Guiraud, 2003 ; Axelsson, 2004).

**Tableau 6** : Les différents genres de bactéries lactiques et leurs principales caractéristiques (Federighi , 2005).

Genre	Morphologies	Fermentation	Caractéristiques principes	Habitats Principaux
<i>Lactobacillus</i>	Bacille	Homofermentaire Ou Hétérofermentaire	Thermophilus ou mésophiles	Homme, Produits laitiers, carnés, végétaux
<i>Carnobacterium</i>	Bacille	Hétérofermentaire	Psychotropes, peu acidotolérants	Produits carnés, poissons, produits laitiers
<i>Lactococcus</i>	Coque	Homofermentaire	Mésophiles, croissance à 10°C et non à 45°C	Produit laitiers, Végétaux
<i>Streptococcus</i>	Coque	Homofermentaire	Thermophiles	Produit laitiers
<i>Enterococcus</i>	Coque	Homofermentaire	Mésophiles, croissance à 45°C thermorésistance	Intestin del'homme et des animaux, produits laitiers
<i>Pediococcus</i>	Coque en tétrade	Homofermentaire	Mésophiles, halotolérants	Bière, produits végétaux, Saucissons
<i>Tetragenococcus</i>	Coque en tétrade	Homofermentaire	Mésophiles, halophiles	Saumures
<i>Leuconostoc</i>	Coque	Hétérofermentaire	Mésophiles	Produits végétaux, produits laitiers
<i>Oenococcus</i>	Coque	Hétérofermentaire	Mésophiles	Vin
<i>Bifidobacterium</i>	Forme irrégulière	Acide acétique et Lactique	Mésophiles	Intestin del'homme et des Animaux
<i>Vagococcus</i>	Coque mobile	Homofermentaire	Mésophiles	Intestin del'homme et des animaux, produits laitiers

### 2.3.3. Croissance et métabolisme

Les bactéries lactiques sont cultivées essentiellement sur des milieux riches en nutriments et pauvres en oxygène, elles sont capables de survivre dans des milieux de culture très acides en raison de la production d'acide lactique (Pirodda et al., 2004 ; Hammes et Hertel, 2006 ; Falagas et al., 2006; Björkroth et Holzappel, 2006 ; Ruiz et al., 2009). Ces bactéries utilisent la fermentation lactique pour la dégradation des glucides et la production de l'énergie sous forme d'ATP. Il existe deux voies principales de fermentation lactique. L'homofémentation qui regroupe la voie de la glycolyse et l'hétérofémentation, communément appelée voie des pentoses phosphate (Kandler, 1983). Toutefois, il existe d'autres types de fermentations telles que la fermentation malolactique, moins connue, utilisée principalement dans la désacidification du vin. Cette fermentation commence après la

fermentation alcoolique et consiste en la conversion de l'acide malique en acide lactique avec dégagement de CO<sub>2</sub> (Zaunmüller et al., 2006).

#### 2.3.4. Production de la protéase

Les bactéries lactiques possèdent des protéases localisées à l'extérieur de la membrane plasmique, liées à la paroi et capables d'hydrolyser la caséine. Cette activité protéolytique est favorisée par les ions calcium et les pH acides. De plus, les bactéries lactiques ont une activité protéolytique marquée et produisent des composés azotés de faible poids moléculaire à partir des protéines complexes. De nombreuses protéases intracellulaires sont caractérisées telles que les métallo-protéases chez *Lactococcus* et *Enterococcus* (Hols et al., 2005; Atlan et al., 2008; Salminen et al., 2012).

L'activité protéolytique des bactéries lactiques est un facteur influençant leur développement dans le lait et la production d'acide. Par ailleurs, il est également important de considérer l'impact de ces protéases sur les propriétés des produits laitiers fermentés pour améliorer la qualité des fromages et maintenir les caractéristiques organoleptiques favorables (Corrieu et luquet, 2008 ; Maldonado et al., 2011).

### 2.4. Le genre *Enterobacter*

#### 2.4.1. Caractéristiques générale

Les espèces du genre *Enterobacter* sont des bacilles droits à Gram négatif, de 0.6-1.0 µm de diamètre sur 1.2-3.0 µm de longueur, présentées de manière isolées, groupées ou en courtes chainettes, mobiles par des flagelles péritriches (généralement de 4-6) et asporogènes (Grimont et Grimont, 2002; Lehner, 2011).

Leur culture est établie sur des milieux classiques utilisés pour l'isolement des entérobactéries, ils se développent en aéroanaérobiose à des températures mésophiles (de 30-37°C) et forment après 18-24 heures des colonies rondes, de 2-3 mm de diamètre, légèrement irisées ou mates, sèches ou mucoides avec des contours irréguliers (Lehner, 2011).

Les *Enterobacter* présentent les mêmes caractères biochimiques des entérobactéries, telles que la fermentation du glucose, la production d'acide et de gaz, réaction négative au rouge méthyl, oxydase négatives, catalase positives et Voges-Proskauer positive.

Les espèces de ce genre sont rencontrées dans les environnements naturels tels que le sol, l'eau, la végétation et une vaste gamme de produits alimentaires (Lehner, 2011).

En milieux hospitaliers les espèces d'*Enterobacter* sont isolées comme des polluants communs de diverses surfaces inertes, des équipements de préparation et du matériel médicochirurgical (Grimont et Grimont, 2006; Lehner, 2011).

### 2.4.2. Taxonomie et classification

Selon le manuel de Bergy, le genre *Enterobacter* proposé par **Hormaeche et Edward** en (1960) appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, l'ordre *Enterobacteriale*, la classe des *Gamma Proteobacteria*, phylum *Proteobacteria*, et domaine des *Bacteria* (**Grimont et Grimont, 2002 ; Grimont et Grimont, 2006**). En effet, la classification des espèces dans le genre *Enterobacter* a fait l'objet de différents ajustements car de nombreuses études ont rapporté sur de nouvelles espèces pendant la dernière décennie (**Kampfer et al., 2005 ; Lehner, 2011 ; Gu et al., 2014 ; Duan et al., 2015**).

**Tableau 7:** Les différents genres appartenant aux *Enterobacteriaceae*  
(**Leclerc et al., 2001 ; Delarras, 2003 ; Joly et Reynaud, 2003**)

Genres traditionnels	Genres rares ou récemment décrits
<i>Escherichia, Shigella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Hafnia, Proteus, Providencia, Yersinia, Erwinia, Morganella</i>	<i>Cedecea, Ewingella, Pantoea, Rahnella, Budvicia, Buttiauxella, Kluyvera, Leclercia, Tatumella, Moellerella, Trabulsiella, Yokenella, Edwardsiella, Leminorella, Pragia, Photorhabdus, Xenorhabdus, Obesumbacterium, Arsenophorus, Groupes entériques</i>

### 2.4.3. Croissance et métabolisme

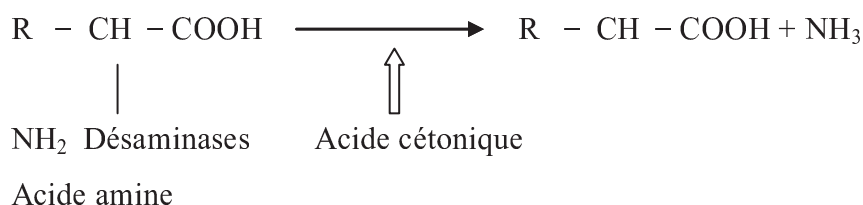
Les espèces du genre *Enterobacter* sont des germes mésophiles et neutrophiles avec une croissance optimale à des pH au voisinage de 5,5-8, assez tolérantes aux variations de la pression osmotique et poussent facilement sur des milieux de culture ordinaires pendant 18 heures. L'exigence nutritionnelle est d'une manière générale très réduite et la plupart des *Enterobacter* se multiplient en milieu synthétique avec une source de carbone simple comme le glucose (**Pilet et al., 1979 ; Carbonnelle et al., 1987**).

#### 2.4.3.1. Catabolisme des protéines

*Enterobacter* assimile et dégrade les acides aminés selon deux voies métaboliques: La désamination et la décarboxylation (**Pilet et al., 1979 ; Carbonnelle et al., 1987**).

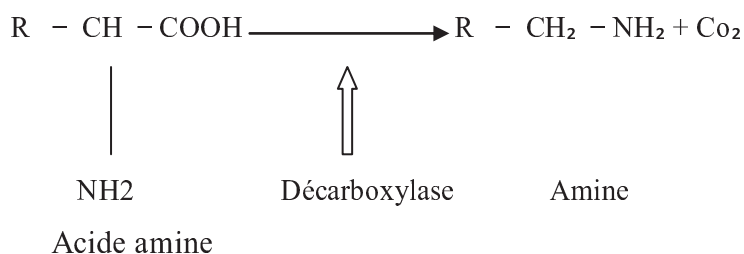
### ➤ La désamination

La désamination contribue à l'élimination du groupement aminé par des désaminases bactériennes qui agissent sur les acides aminés et entraînent la formation des acides cétoniques correspondants, selon la réaction suivante :



### ➤ La décarboxylation

Elle est réalisée par des décarboxylases bactériennes qui libèrent le groupement carboxyle et forme l'amine correspondante suivant cette réaction :



La recherche des décarboxylases de l'ornithine, de la lysine, et de l'arginine forment trois tests biochimiques utiles dans le diagnostic différentiel des *Enterobacter* (Lavigne et al., 2013).

- ❖ L'ornithine décarboxylase (ODC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine et donne production de la putriscine qui alcalinise le milieu de culture.
- ❖ La lysine décarboxylase (LDC) est une enzyme qui libère le groupement carboxyle de l'acide aminé lysine et donne production de la cadavérine qui alcalinise le milieu de culture.
- ❖ L'arginine dihydrolase (ADH) est une enzyme qui dégrade l'arginine en libérant de l'ammoniac et des amines qui alcalinisent le milieu de culture.

#### 2.4.4. Production de la protéase

Les serinesprotéases autotransporteurs (SPATE) forment une grande famille de protéases sécrétées par les Enterobacteriaceae notamment, *Escherichia coli*, *Shigella* et *Enterobacter* (Nathalie, 2010). Ces SPATE ont présenté deux activités protéolytiques distinctes (Nathalie, 2010). Le site catalytique C-terminal déclenche un clivage intramoléculaire qui libère la partie N-terminale de ces protéines dans le milieu extracellulaire. Ensuite, les domaines N-terminaux sécrétés des SPATE sont des protéases, dont chacun contient un site catalytique de

sérine protéase canonique. Certaines de ces protéases sécrétées sont des toxines, provoquant divers effets sur les cellules de mammifères (Otto et *al.*, 2002).

# **CHAPITRE III.**

---

## **MATERIEL**

## **ET METHODES**

### 1. Objectifs de recherche

L'objectif de ce présent travail est l'isolement d'une large gamme de bactéries à partir des sols riches en protéines, situés dans la région de l'Ouest Algériens, la caractérisation et la sélection de bactéries productrices de la protéase.

Les points principaux tracés pour la réalisation de ce travail sont :

- ✓ L'isolement et le screening d'une large gamme de bactéries productrices de la protéase on utilisant les sols riches en protéines comme substrat de fermentation.
- ✓ La sélection des souches protéolytiques par la mesure des diamètres des zones d'hydrolyses formées sur un milieu de culture solide.
- ✓ La caractérisation phénotypique des souches hyper-productrices.
- ✓ L'optimisation de quelques paramètres impliqués dans la production de la protéase.
- ✓ L'identification des souches sélectionnées productrices de la protéase par l'amplification et le séquençage des fragments ADN de la région ARN 16S.

### 2. Constitution d'une collection de souches

#### 2.1. Origine des échantillons

Dix échantillons de sols riches en protéines, sont prélevés à partir de différents sites de la région de l'Ouest Algériens (Chlef). A cet effet, les prélèvements sont effectués à partir d'un ensemble de localité, caractérisées par leur richesse en déchets protéiques (**Tableau 8**), afin de pouvoir augmenter la possibilité d'isoler des bactéries productrice de la protéase.

**Tableau 8:** Présentation des différents sites de prélèvement et leur codification.

Origine de prélèvement	Codification	Poids prélevé
Laiterie de Rahmoune de Chlef	Y	100g
Laiterie d'Eldjamousse de Chlef	H <sub>1</sub>	100g
Laiterie Abdeli de Boukader	AH <sub>2</sub>	100g
Centre de collecte de Giplait (ARIB) de Chlef	T	100g
Station d'épuration deseaux usées d'Oued Fodda	Xg	100g
Station d'épuration deseaux usées de Ténés	E <sub>3</sub> S	100g
Oued Chlef	NB(op)	100g
Société Sendjasni pour l'alimentation du bétail SARL de Chlef	LV	100g
Abattoir d'Echettia	TB(op)	100g
Abattoir d'Oued fodda	P(op)	100g





**Figure 13 :** Présentation du site de prélèvement(Y) effectué à partir des sols riches en protéines de la laiterie de Rahmoune.



**Figure 14:** Présentation du site de prélèvement (NB) effectué à partir des sols riches en protéines de l'oued de Chlef.



**Figure 15 :** Présentation du site de prélèvement (Xg) effectué à partir des boues d'épuration de la STEPE d'Oued Fodda.



**Figure 16 :** Présentation du site de prélèvement (E<sub>3</sub>S) effectué à partir des sols riches en protéines de la STEPE de Ténès.

## 2.2. Prélèvement

Les échantillons sont prélevés dans des conditions d'asepsie. En utilisant une spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol, caractérisés par une dégradation remarquable des déchets protéiques sont éliminés et une pesée de 100 g de sol est effectuée à une profondeur de (5-15 cm) dans des sachets stériles avec étiquetage, et transportés directement au laboratoire (Cheesbough, 2001).

## 3. Stratégie d'isolement

### 3.1. Screening primaire

Dans le but d'isoler les bactéries productrices de la protéase, une quantité d'environ 1 g de chaque échantillon est prélevée aseptiquement à l'aide d'une spatule et introduite dans 9 ml d'eau physiologique, ensuite des dilutions décimales sont préparées à partir de cette solution mère (de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) (Todorov et Dicks, 2009). Afin de s'orienter vers les germes ayant la faculté de sporuler une sélection par thermisation de l'ensemble des suspensions a précédé l'étape de l'ensemencement, les tubes à essai sont d'abord soumis à un choc thermique dans un bain marie à une température de 80°C pendant 10 min (Lynn et al., 1999). L'isolement sélectif des souches protéolytiques est réalisé par étalement de 0,2 ml de chaque dilution (avant et après thermisation) sur un milieu de culture gélosé ou TGEA à 1% de lait écrémé (Annexe A). Les boîtes inoculées sont ensuite incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures. Une lecture positive de la production des protéases est manifestée par l'apparition d'une zone de dégradation autour de la colonie, observée à l'aide d'un binoculaire (Facklam et al., 1989).

### 3.2. Purification des souches protéolytiques

Les colonies productrices de la protéase sont repiquées sur gélose nutritive additionnée au lait écrémé stérile, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures. L'ensemencement des boîtes est réalisé en surface par la méthode des cadrant (stries serrées) pour la mise en évidence de l'aspect des colonies et l'élimination de toute éventuelle contamination (**Yilmaz et al., 2005**). Des repiquages successifs 3 à 4 fois sont effectués afin d'obtenir des colonies pures.

### 3.3. Identification phénotypique des souches (screening primaire)

L'identification préliminaire du genre est basée essentiellement sur l'étude des caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la réaction à la catalase, le test d'oxydase, la présence ou l'absence des spores, le type respiratoire et la mobilité.

#### 3.3.1. Critères morphologiques

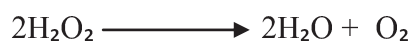
L'aspect macroscopique des colonies productrice de la protéase, isolées sur gélose nutritive, est effectué par la détermination de la taille de colonie, pigmentation, contour, aspect, odeur, opacité, consistance....(**Marchal, 1987**).

#### 3.3.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram et l'observation microscopique ont permis l'étude morphologique des cellules telle que (la taille, la forme, le mode de regroupement et le nombre de colonies par champ microscopique) et la distinction entre deux grands groupes bactériens: les bactéries à Gram négatives, colorées en rose et les Gram positives qui sont apparues violettes (**Guiraud, 2003 ; Hariri et al., 2009**).

#### 3.3.3. Réaction à la catalase

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Le test est révélé en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes. Une réaction positive est traduite par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (**Lévy et al., 1992**).

#### 3.3.4. Test d'oxydase

L'oxydase est recherchée sur papier filtre selon la technique de **Kovacs (1956)**, lors de l'étalement d'une colonie sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. Une réaction positive est interprétée par

l'apparition d'une couleur rouge violacée au bout de 10 secondes (Holt *et al.*, 1994 ; Bossis *et al.*, 2000).

### 3.3.5. Détermination du type respiratoire

La détermination du type respiratoire est effectuée sur la gélose viande foie semi-solide à 0,6% avec une valeur de pH de 7,6. Le milieu régénéré au bain-marie, refroidi à une température de 45°C, coulé dans des tubes à essai stériles est inoculé à l'aide d'une pipette boutonnée et incubé à une température de 30°C pendant 24 heures (Prescott, 2002) (Figure 17).

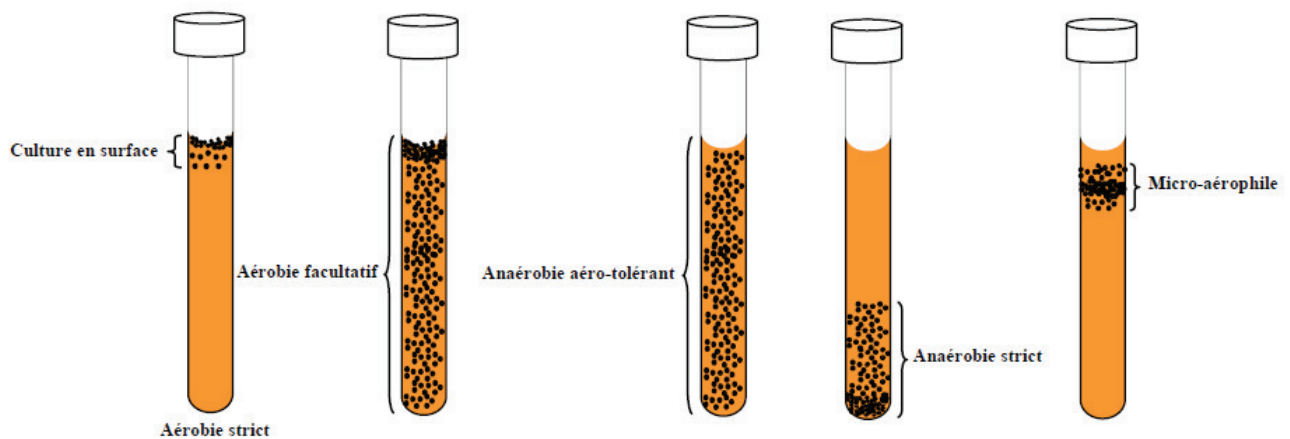


Figure 17: Détermination du type respiratoire (Prescott, 2002).

### 3.3.6. Mobilité

La mobilité des bactéries est mise en évidence par observation microscopique à l'état frais d'une culture en phase de croissance dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle, et confirmé par repiquage de la colonie sur milieu de culture spécifique: mannitol-mobilité (Claus et Barkely, 1986).

## 3.4. Conservation des souches isolées

### ➤ Conservation à courte durée

La conservation à courte durée des souches pures, productrices de la protéase est procédée sur gélose inclinée, incubée à une température de 30°C pendant 24 heures. Les cultures sont ensuite maintenues à 4°C et repiquées toutes les 4 semaines (Badis *et al.*, 2005).

### ➤ Conservation à longue durée

La conservation des souches isolées, productrices de la protéase à longue durée est effectuée sur bouillon BHIB glycérolé à 30%, inoculé à partir des pré-cultures jeunes âgées de 18 heures préalablement purifiées et incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.

Les cultures sont ensuite conservées en suspension dense dans des Eppendorfs à (-20°C) (Gallagher et Wiley, 2008).

### 3.5. Le screening secondaire des souches productrices de la protéase

Le criblage secondaire des souches isolées, productrices de la protéase est effectué par mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse formée autour des colonies sur un milieu de culture solide et l'évaluation de l'activité enzymatique par la méthode d'hydrolyse de la caséine sur un milieu de culture liquide (Kunitz 1947).

#### 3.5.1. Mesure de la zone d'hydrolyse sur milieu de culture solide

L'étude du pouvoir protéolytique moyen de trois essais de l'ensemble des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase est effectuée sur des cultures jeunes âgées de 18 heures par la méthode de diffusion sur plaque (Thanh 1978). A cet effet, les milieux de culture gélose nutritive et/ ou TGEA additionnées au lait écrémé sontensemencées par strie ou par spot.

L'activité protéolytique est évaluée après 24-48 heures d'incubation à 30°C par la mesure du diamètre des zones d'hydrolyse formées autour de la colonieensemencée (Facklam, 1989). Les souches montrant des zones d'hydrolyse maximales sont sélectionnés pour la suite des études.

$$\text{L'activité protéolytique} = \frac{D(\text{Zone}) - D(\text{Colonie})}{D(\text{Zone})}$$

D : diamètre

#### 3.5.2. Détermination de l'activité protéolytique sur milieu de culture liquide

L'activité protéolytique est estimée à partir de l'effet de la protéase sur la caséine par la méthode de Kunitz (1947). Lors de l'hydrolyse de la caséine en présence de la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. La quantité de tyrosine libérée est déterminée par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

##### 3.5.2.1. Préparation de l'inoculum

###### a) Milieu de production de la protéase

Le milieu de culture préconisé pour la production de la protéase est préparé dans un Erlenmeyer d'un volume de 500 ml et contient les ingrédients suivants: 1 g/l glucose, 1 g/l caséine, 10 g/l peptone, 0,2 g/l extrait de levure, 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 0,1 g/l CaCl<sub>2</sub> et 0,5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Le pH du milieu est ajusté à une valeur de 7 et stérilisé à 121°C pendant 15 minutes (Qadar et al., 2009).

**b) Préparation de pré-culture**

A partir d'une culture de chaque souche, une suspension de 9 ml d'eau distillée stérile est préparée, ajustée à des intervalles de temps réguliers (1 heure), pour atteindre une concentration finale de 0,5 Mc Farland, qui correspond à une population bactérienne de  $10^6$ - $10^8$  UFC/ml, mesurée par absorption à une longueur d'onde de 600 nm. Ensuite, 1 ml de la suspension bactérienne standardisée est inoculé dans un volume de 100 ml du milieu de culture de production à raison de 1%, incubé avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C, pendant 24 heures. Les pré-cultures sont par la suite vérifiées au microscope afin de s'assurer de la bonne croissance des souches dans le milieu.

**c) Culture en batch**

Un volume de 2 ml de chaque pré-culture est inoculé dans un volume de 100 ml du milieu de culture de production, incubé avec une agitation de 130 rpm à une température de 30°C, pendant 48 heures. Pour chaque expérience, 3 cultures en batch sont préparées dans des Erlenmeyers de 500 ml de capacité.

**d) Cinétique de croissance**

La détermination de la croissance bactérienne est réalisée sur le même milieu de production par mesure de la densité optique des suspensions bactérienne à des intervalles de temps de 3 heures à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, à une longueur d'onde de 275 nm, en utilisant une micro-cuvette en verre de 1 cm de chemin optique (**Annexe B**).

**3.5.2.2. Mesure de l'activité protéolytique**

Un volume de 2 ml d'une suspension bactérienne de chaque culture en batch est prélevé dans un Eppendorf stérile, centrifugé à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 mn à 4°C. Ensuite, le surnageant récupéré est dilué dans le tampon borate et ajusté à un pH de 8,2 (**Calik et al., 2000b**) (les préparations des solutions se trouvent à l'**annexe C**). La réaction enzymatique est effectuée en ajoutant 1 ml de la solution enzymatique à tester à 5 ml de la solution de caséine (1,2% dans le tampon borate à pH 8,2) (**Beg et al., 2002**). Le mélange caséine-protéase est maintenu à 37°C pendant 10 minutes, avec faible agitation constante, dans un bain-marie shaker. Après cette période, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique (TCA). Le mélange est réincubé à 37°C durant 30 minutes afin de s'assurer de la précipitation totale de la caséine non hydrolysée. Parallèlement aux échantillons, des blancs sont préparés par l'ajout de 5 ml de TCA à un volume de 5 ml de caséine et incubés à une température 37°C pendant 10 minutes. Par la suite, les échantillons et les blancs sont filtrés

sur papier Whatman et analysés au spectrophotomètre UV-Visible à 275 nm (**Drouin, 2005 ; Beg et al., 2002**).

### **3.5.3. Influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la protéase**

#### **3.5.3.1. Etude de l'effet de la durée d'incubation sur la production de la protéase**

L'effet du temps d'incubation sur l'activité protéolytique des souches isolées, sélectionnées est mis en évidence sur un milieu de culture de production. Le milieu de culture synthétique est inoculé avec 2 ml de chaque culture en batch et incubée à 30°C avec agitation de 130 rpm à des intervalles de temps de (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120 heures). A la fin de chaque période, le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, l'activité protéolytique est évaluée par mesure de l'absorbance à 275 nm (**Calik, 2002**).

#### **3.5.3.2. Etude de l'effet de la température sur l'activité et la stabilité de la protéase**

Afin d'évaluer l'effet de la température sur la réaction enzymatique et la production de la protéase, un volume de 2 ml est prélevé dans des Eppendorfs à partir des cultures en batch âgée de 48 heures et incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 mn à 4°C. Ensuite l'activité protéolytique est évaluée par la méthode décrite précédemment avec la variation de la température de 25-55°C. L'activité enzymatique est déterminée directement par mesure de l'absorbance à 275 nm (**Chaari, 2012**).

#### **3.5.3.3. Etude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase**

L'influence du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées, est mise en évidence sur un milieu de culture de production après le prélèvement d'un volume de 2 ml de chaque culture en batch âgée de 48 heures et incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C. Le surnageant est récupéré par centrifugation à une vitesse de 8000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. L'activité protéolytique est évaluée après l'ajustement du pH à différentes valeurs de 5-8,5. La mesure de l'activité enzymatique est établie par lecture de l'absorbance à 275 nm (**Calik et al., 2004 ; Chaari, 2012**).

### **3.6. La sélection des souches productrices de la protéase**

La sélection des souches productrices de la protéase est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyse formées autour des coloniesensemencées sur un milieu de culture solide et par évaluation de l'activité enzymatique lors de l'hydrolyse de la caséine sur un

milieu de culture liquide. Les souches sélectionnées productrices de la protéase présentant les diamètres les plus larges ainsi qu'une importante activité protéolytique sont retenues pour l'identification avec le système API, l'optimisation des conditions de production et ont fait par la suite l'objet d'une analyse phylogénique du gène 16S rDNA.

### 3.7. L'identification de l'espèce par le système API

L'appartenance des souches sélectionnées productrices de la protéase à certain genres bactérien est basée sur l'étude de quelques tests biochimiques à l'aide des galeries API (**Figure 18**). Ces dernières sont inoculées par des colonies prélevées et mise en suspension dans 5 ml d'eau distillée stérile (0,5Mac Farland), selon les recommandations du fabricant et incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

Les résultats obtenus sont interprétés à l'aide d'un catalogue analytique et des matrices d'identification (**Matoub, 2000**). La base de données fournie sous forme d'un tableau (**voir Annexe D**), est conçu pour chaque taxon et caractère, sa probabilité d'être positif (**Joffin et Leyral, 2006**).



**Figure 18** : Aspect de la galerie API 20 E avant l'inoculation avec les souches sélectionnées, productrices de la protéase.

## 4. L'identification moléculaire

### 4.1. Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN est réalisée par la méthode PCI (Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique). Les 15 souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2</sub> op, T<sub>2</sub>' , AH<sub>2</sub> (-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2</sub> op, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub> (-6), NB<sub>1</sub> op, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> IBN et P<sub>1</sub>op) sont cultivées dans un bouillon nutritif, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30 ± 2°C pendant une nuit. L'extraction de l'ADN est effectuée selon la méthode décrite par **Sambrook et Russel (2001)** avec quelques modifications. Cette technique consiste à introduire un volume de 1,5 ml d'une suspension bactérienne dans des Eppendorfs stériles. La biomasse bactérienne est récupérée par centrifugation à une vitesse 5000 rpm (4100g) pendant 10 minutes tandis que les surnageant sont éliminés. Le culot est remis en suspension dans 200 µl de tampon de lyse (200 µl de triton 200%, 1000 µl de SDS 1%, 200 µl de NaOH à 100



mM, 100 µl de Tris à 10 Mm, 20 µl d'EDTA, et 6,68 ml de H<sub>2</sub>O). Ensuite, une pesée de 0,3 g des billes en verre est ajoutée dans les tubes contenant le lysat afin de provoquer l'éclatement de la paroi des bactéries à Gram positive. Un volume de 200 µl de la solution (Phénol: Chloroforme: Alcool isoamylique) est ajouté au lysat, homogénéisé à l'aide d'un vortex et centrifugé à une vitesse de 13000 rpm à une température de 4°C pendant 5 min. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml. Par la suite, 20 µl d'acétate de sodium [3M, pH 4,8, 4°C] et 600 µl d'éthanol absolu froid sont ajoutés avec un mélange approprié et maintenus à (-20°C) pendant 1 heure (**Queipo et al., 2007**).

La solution de l'ADN est récupérée par centrifugation de 13000 rpm pendant 5 min à 4°C. L'ADN obtenu est lavé dans un volume de 1 ml d'éthanol à une concentration de 70% (-20°C) et centrifugé à 13000 rpm pendant 5 min à 4°C, le surnageant est ensuite éliminé, l'ADN est séché à l'air pendant 10 mn et le culot est resuspendu dans un volume de 50 µl d'eau distillée stérile pour être conservé pendant 30 min à température ambiante (**Sambrook et Russel 2001 ; Afia et Shahida, 2010**).

Pour le traitement à l'ARNase: un volume de 1 µl d'ARNase est ajouté dans chaque tube contenant l'ADN génomique et incubé à une température de 37°C pendant 20 min.

#### **4.2. Dosage de l'ADN au Nanodrop**

L'ADN extrait est quantifié à l'aide du Nanodrop 2000. Cet appareil permet la réalisation d'un dosage spectrophotométrique par l'utilisation d'une faible quantité de l'échantillon.

Un témoin négatif est préparé avec un volume de 1 µl d'H<sub>2</sub>O. Par la suite, 1 µl de chaque échantillon est déposé sur la cellule de l'appareil. L'utilisation d'un système d'aimant permet la formation d'une colonne liquide entre les deux surfaces de lecture pour la mesure du spectre (**Figure20**). Les mesures effectuées sont enregistrées automatiquement dans un ordinateur. L'absorbance de l'acide nucléique est à 260 nm, celle des protéines est à 280 nm et les composés organiques comme le phénol absorbent à 230 nm. Le calcul des rapports de l'absorbance 260nm/280nm et 260nm/230nm a donné une information sur la pureté des échantillons. En théorie un ratio en dessous de 2,2 et 1,8 respectivement, est accepté comme pure (**Prieur et al., 2004; Michoud, 2014**).



**Figure 19 :** Nanodrop 2000/2000c

### 4.3. Amplification du gène codant l'ADN 16S par PCR

Le gène codant la sous unité 16S rDNA constitue un outil fondamental d'identification génétique et le traçage de la phylogénie (Emmanuel *et al.*, 2009).

#### 4.3.1. Choix des amorces

Un couple d'amorces (W001/W002) est choisi en basant sur la séquence du gène 16S rDNA,

**W001 :** AGA GTT TGA TCM TGG CTC (Amorce sens).

**W002 :** GNT ACC TTG TTA CGA CTT (Amorce anti sens).

#### Principe de la méthode :

L'amplification des fragments d'ADN avec les amorces (W001 et W002) et leur séquençage par l'utilisation des oligonucléotides dégénérés (W002, W007, W012) de l'ADN, codant la région 16S rRNA. Ensuite, l'identification du genre, de l'espèce et de la sous espèce des bactéries est effectuée par la comparaison des séquences sur le site « Ribosomal Database Project »



**W007:** CTC GTT GCG GGA CTT AAC

**W012:** TAC GCA TTT CAC CKC TAC A

#### 4.3.2. Préparation du pré-mix PCR

La réaction est réalisée dans des tubes PCR, par l'introduction du mélange réactionnel, contenant de l'ADN polymérase, du tampon, les quatre désoxyribonucléases (dNTP) et les amorces selon les quantités indiquées dans le (Tableau 9).

**Tableau 9:** Composition du mélange réactionnel.

Réactifs	Concentration	Volume unitaire ( $\mu\text{l}$ )
Eau	/	40,75
Tampon 5 prime	10X	5 $\mu\text{l}$
dNTP	10 mM	1 $\mu\text{l}$
Amorce sens	50 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Amorce anti sens	50 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Taq 5 prime	5 U / $\mu\text{l}$	0,25 $\mu\text{l}$
ADN	100 ng	2 $\mu\text{l}$
Volume final	/	50 $\mu\text{l}$

Un volume de 48  $\mu\text{l}$  de ce mix est introduit dans un tube PCR, additionné d'un volume de 2  $\mu\text{l}$  d'ADN. Le témoin négatif est composé de 48  $\mu\text{l}$  du mix PCR et 2  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$ . Les tubes sont déposés dans un thermocycleur et le programme adapté est lancé (**Arzu et al., 2011**).

#### 4.3.3. Amplification

L'amplification est programmée comme suit :

- ✓ Dénaturation initiale : 96°C pendant 4 minutes  $\longrightarrow$  1 cycle
  - ✓ Dénaturation : 96°C pendant 10 secondes
  - ✓ Hybridation: 50°C pendant 30 seconde 35 cycles
  - ✓ Extension : 72°C pendant 45 secondes
  - ✓ Extension finale : 72°C pendant 2 minutes  $\longrightarrow$  1 cycle
- } 30 cycles

#### 4.4. L'électrophorèse sur gel d'agarose

La présence d'ADN et la détermination de la taille des fragments des produits PCR est réalisée par une électrophorèse sur gel d'agarose (**Fukushima, 2002**). Pour ce faire, dans un Erlenmeyer, 1,2 g d'agarose sont mélangés avec 100 ml de tampon TAE 1X (préparation d'une solution d'agarose à 1,2 %). Le mélange est chauffé au micro-onde jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Avant de couler le liquide dans la cuve contenant un peigne, 4  $\mu\text{l}$  du Bromure d'éthidium (BET) sont ajoutés pour 100 ml de gel. Une fois le gel est polymérisé, le peigne est retiré, ce qui forme des puits pour les dépôts. Un volume de 5  $\mu\text{l}$  du marqueur de taille (1 Kb ladder invitrogen) est déposé sur le premier puits afin d'évaluer la taille des fragments migrés. Ensuite les échantillons sont préparés comme suit :

$$\left\{ \begin{array}{l} 5\mu\text{l de chaque produit de PCR} + \\ 5\mu\text{l d}'\text{H}_2\text{O} + \\ 2\mu\text{l du Bleu de charge (Bleu de bromophénol)} \end{array} \right.$$



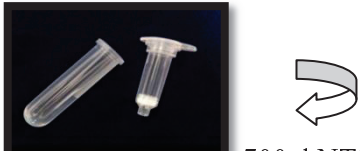
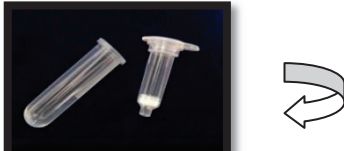

---

Un dépôt de la totalité du volume est réalisé. Par la suite, une migration est effectuée à 110 V pendant 10-15 minutes. Cette migration est arrêtée lorsque le témoin de migration atteint les trois-quarts de la longueur du gel pendant 30 minutes. Du à la présence du phosphate, les ADN sont chargés négativement et migrent vers le pôle positif. Le BET introduit précédemment dans le gel a permis la visualisation de cette migration. En effet, en tant qu'agent intercalant, celui-ci va s'insérer au sein de la double hélice d'ADN et devient fluorescent sous excitation ultra-violette. La révélation des gels est réalisée grâce à un transilluminateur, cet appareil a permis de visualiser la taille des amplicons. Par ailleurs, des contrôles négatifs sont réalisés avec de l'eau pour vérifier sa stérilité.

#### **4.5. Purification de l'ADN à partir d'un produit PCR**

L'ADN produit par PCR est purifié selon les recommandations apportées par le kit (Nucleo Spin Gel and PCR Claeu Up). L'ADN est en solution dans 55 µl d'eau pur. (**Tableau 10**).

**Tableau 10:** Purification des produits de la PCR par le Nucleo Spin Gel and PCR Claen Up.

Purification des produits de la PCR	
1-Ajustement des conditions de liaison de l'ADN	 <p>100 <math>\mu</math>l PCR( 45<math>\mu</math>l produit de PCR+55<math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O) 200 <math>\mu</math>l NTI</p>
2- Liaison de l'ADN	 <p>11000 rpm /30s</p>
3-Lavage de la membrane de silice	 <p>700<math>\mu</math>l NT3 11000 rpm/30s</p> <p><b>2<sup>ème</sup> lavage :</b></p> <p>700<math>\mu</math>l NT3 11000 rpm/30s</p>
4-Séchage de la membrane de silice	 <p>11000 / 1min</p>
5-Elution de l'ADN	 <p>15-30 <math>\mu</math>l NE</p> <p>Incubation 1 min / Température ambiante 11000 rpm / 1 min</p>

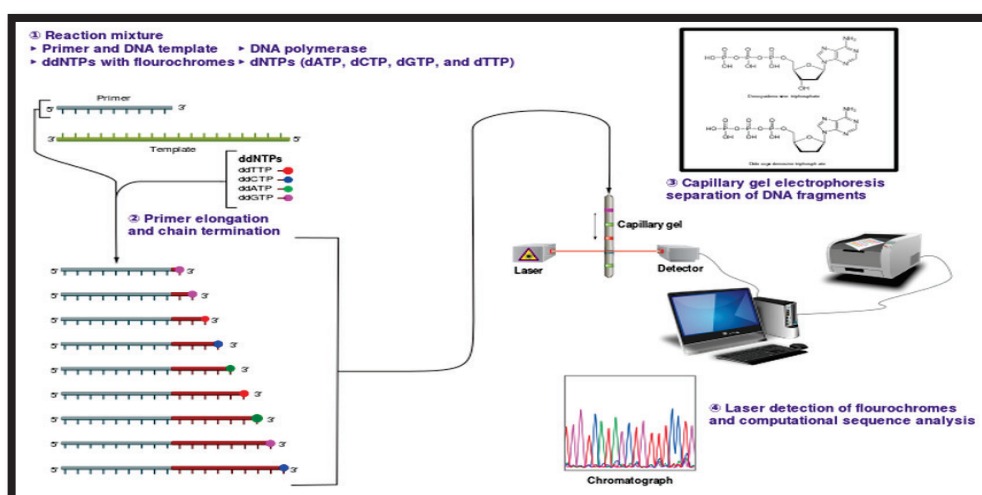
#### 4.6. Le séquençage des gènes amplifiés (16S rDNA)

Le séquençage des produits de PCR est effectué par la méthode de Sanger par le laboratoire Beckman Coulter Genomics (UNITED KINGDOM). La réaction de séquençage est procédée en présence de réactifs suivants: les fragments d'ADN amplifiés par PCR, les amorces,

l'ADN polymérase, les quatre nucléotides (A, T, C, G) (dNTP) et les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Dans un premier temps le mélange est chauffé pour que les deux brins d'ADN se séparent. Lorsque la température descend l'amorce s'hybride sur sa séquence complémentaire. L'ADN polymérase est fixé à l'extrémité 3'OH de l'amorce pour synthétiser le brin d'ADN en intégrant les nucléotides complémentaires. Aléatoirement un didésoxyribonucléotide est incorporé, ce qui va provoquer l'arrêt de la synthèse. En effet, en l'absence de groupement hydroxyle à l'extrémité 3', la liaison du nucléotide suivant est impossible. Dans ce cas le brin synthétisé peut être terminé à des positions aléatoires. L'échantillon contenant plusieurs millions de fragment d'ADN, cela permet d'avoir un ensemble de fragment de longueur variable, ce qui permet l'obtention d'une séquence complète. Par la suite les produits de réaction de séquençage sont élués à travers un gel capillaire traversé par un courant électrique. Pendant la migration les fragments se déplacent en fonction de leur taille, et sont captés par un laser. Les différents types de ddNTP émettant une lumière à une longueur d'ondes caractéristique sont enregistrés dans un logiciel.

L'electrophorégramme permet la visualisation des pics de couleurs correspondant à une lettre de la séquence (A, T, C, G) et la reconstitution de la séquence complète (Joung, 2001).

Pour cette étude, trois amorces sont utilisées pour le séquençage, W002, comme pour la PCR et deux autres amorces W007 et W012, choisis pour leur position d'hybridation. De plus, dans la méthode de Sanger, 800 pb sont séquencés en une étape. Or, la taille de la séquence ciblée ici est de 1500 pb, il est donc préférable d'utiliser une troisième amorce pour obtenir la séquence complète (Figure 20).



**Figure 20:** Schéma récapitulatif des étapes de séquençage selon la méthode de Sanger (Rowland, 2003).

#### 4.7. Assemblage et correction des séquences

Les séquences brutes fournies par le séquenceur sont analysées pour l'élimination de toutes éventuelles erreurs de la Taq polymérase et les séquences des amorces insérées de part et d'autre des deux brins d'ADN. Le programme CLUSTAL W est utilisé pour l'alignement des séquences brutes. Après correction des erreurs, les deux brins sont assemblés pour former une séquence consensus (**Higgins et al.,1996**).

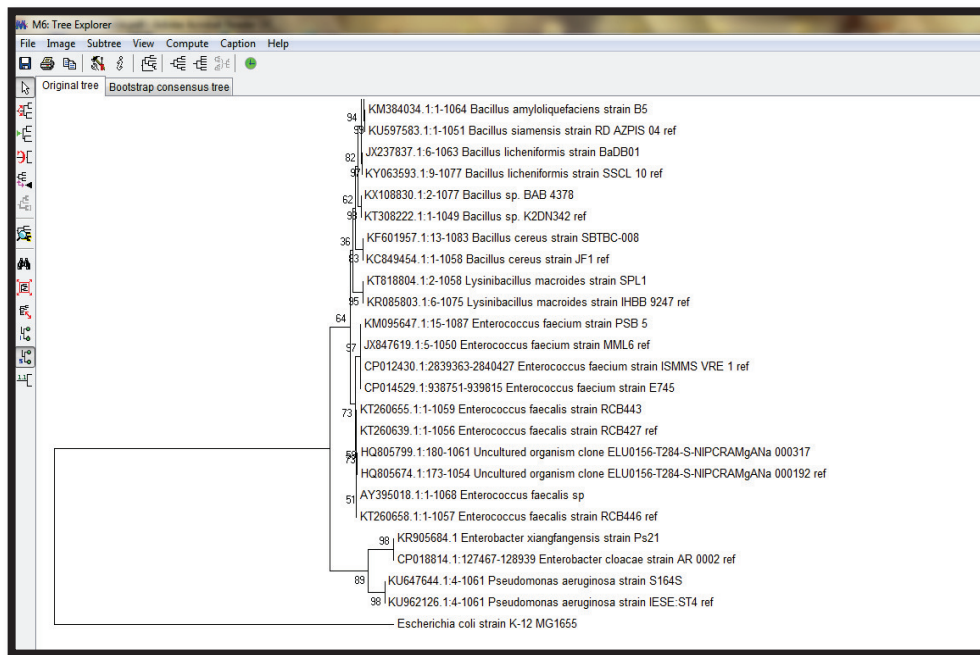
#### 4.8. Soumission des séquences à la base de données Genbank

Après l'assemblage, la correction des séquences brutes et l'obtention des séquences consensus de chaque souche sélectionnée, les séquences sont publiées dans la base de données Genbank à NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) afin d'obtenir des numéros d'accèsion, considérés comme des codes identifiants de la séquence génétique. Ensuite, chaque séquence est comparée avec l'ensemble des gènes codant la sous unité 16S rRNA, disponibles dans la base de données NCBI afin de connaître le degré de similarité et déterminer l'identité la plus exacte de chaque souche.

#### 4.9. Analyse phylogénétique des souches sélectionnées

RDP Project et BLAST sont des algorithmes utilisés pour l'alignement d'une nouvelle séquence par rapport à une base de données. Ce qui consiste à faire la comparaison de cette séquence requête avec les génomes existants dans les banques de données pour y déceler les séquences homologues. Des tests statistiques ont permis de décider si l'alignement obtenu est significatif et les résultats fournis sont classés par ordre de fiabilité (**Driks 2004**).

Ensuite, des alignements multiples sont performés par le CLUSTAL W program (**Higgins et al., 1996**) afin de générer un fichier téléchargeable et exploitable par les logiciels d'analyse phylogénétique. Dans cette étude le programme MEGA 6.0 software (**Tamura et al., 2013**) est utilisé pour construire un arbre phylogénétique interactif et estimer la distances évolutive en se basant sur le principe de neighborjoining method (**Weisburg et al., 1991**)(Figure22).



**Figure 21:** Capture d'écran du programme MEGA 6 Software lors de la construction de l'arbre phylogénétique.

## 5. Optimisation des paramètres de production de la protéase

La production de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées sur milieu de culture de production est optimisée par l'étude de différents paramètres tels que la source d'azote et de carbone, la concentration de caséine et la concentration de l'inoculum.

### 5.1. Effet des différentes concentrations de caséine

La présence des substrats protéiques dans le milieu de culture à une certaine concentration peut influencer la production de la protéase. Dans cette optique, l'effet de la concentration en caséine est mis en évidence par l'ajout de différentes concentrations de (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 0,6%). Les cultures bactériennes sont incubées avec agitation de 130 rpm à la température convenable pour chaque souche pendant 48 heures dans un milieu de culture de production contenant les ingrédients suivants :

- Caséine : La variable
- Source d'azote optimale retenue : 10g/l (1% poids/ volume)
- Source de carbone : 1g/l
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  :0,5g/l
- $\text{Mg So}_4$  :0,1g/l
- $\text{Ca Cl}_2$  : 0,1g/l



L'activité protéolytique est mesurée à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

### **5.2. Effet de la source d'azote**

Afin d'explorer la source d'azote adéquate impliquée dans la production de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées, les composés suivants : peptone, tryptone et extrait de viande sont ajoutés séparément au milieu de culture synthétique contenant une concentration de 1g/l de caséine additionné à des sources d'azotes telles que,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :0,5g/l,  $\text{MgSO}_4$ : 0,1g/l,  $\text{CaCl}_2$ : 0,1g/l. Les cultures bactériennes sont incubées avec agitation de 130 rpm à la température convenable pour chaque souche pendant 48 heures dans un milieu de culture de production, l'activité protéolytique est mesurée à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

### **5.3. Effet des différentes sources de carbone**

L'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase est mis en évidence. Divers éléments tels que le glucose, l'amidon et le saccharose à une concentration de 0,1% sont utilisés. Les cultures bactériennes sont incubées à la température convenable pendant 48 heures avec une agitation de 130 rpm dans un milieu de culture de production après l'ajout de 0,1% de source de carbone et 1% de peptone comme source d'azote. L'activité protéolytique est mesurée à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible.

### **6.4. Effet de l'inoculum**

Afin de déterminer l'influence du volume d'inoculum sur la production de la protéase, une suspension bactérienne d'une densité de 0,5 Mc Farland préparée à partir de chaque culture en batch, est inoculée dans un volume de 100 ml de milieu de culture optimisé. Les concentrations d'inoculum de (1, 2, 3, 4,5, 6, 7 et 8 %) sont testées. Ensuite, les culturesensemencées avec les différentes concentrations de la biomasse bactérienne sont incubées avec agitation de 130 rpm à la température convenable pendant 48 heures. L'activité protéolytique est ensuite mesurée par lecture directe de l'absorbance au spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 275 nm.

## **6. SDS-PAGE et analyse de la protéase**

### **6.1. Extraction des protéines totales**

La procédure de purification et d'extraction complète des protéines est effectuée à une température de 4°C. Un volume de 5 µl d'une culture de nuit est centrifugé à 4000 rpm pendant 5 min. Le culot ainsi formé est remis en suspension dans 500 µl de tampon de lyse

LSDB 500Mm (**Annexe E**) et laissé 10 mn dans la glace. Une lyse mécanique est réalisée par l'ajout des billes en verre pendant 2 min en vortex à une vitesse maximale. Ensuite, le lysat est concentré à 1400 rpm pendant 10 min à 4°C. Après cela, le surnageant contenant les protéines solubles est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf, un volume de 100 µl du bleu SDS 2X est rajouté sur le culot contenant les protéines non solubles (**Annexe E**). Enfin les protéines solubles et insolubles sont conservées à (-80°C) (**Afia et Shahida, 2010**).

### 6.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines total issus de chaque étape de purification est déterminée par la méthode de Bradford Assay (BECKMAN COULTER AD 340S) avec l'utilisation du sérum albumine bovin (BSA 1  $\alpha$ ) comme standard. Une lecture de l'absorbance est effectuée par spectrophotomètre à la longueur d'onde 570 nm. Une courbe linéaire obtenue à partir de la série de points correspondant aux échantillons testés permet la détermination de la concentration en protéines. Les échantillons sont préparés en duplicata avec la prise en considération des dilutions pour le calcul de la concentration finale en protéines (**Annexe E**) (**Schmidt et al., 1988 ; Chen et al.,2000**).

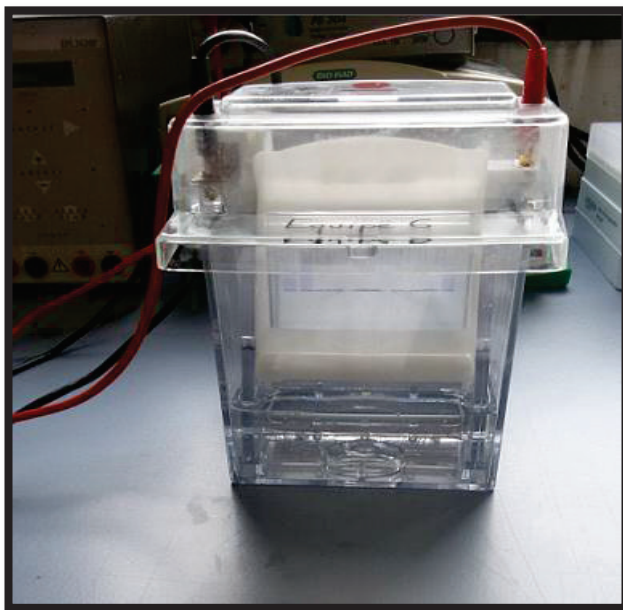
### 6.3. Electrophorèse par SDS-PAGE

Un volume de 40 µl d'une solution de bleu (préparation des échantillons, solution de bleu et ajustement des concentrations ce trouvent à l'**annexe E**) est ajouté sur un volume 119 µl de chaque échantillon ajusté (protéines extraites), une dénaturation par la température est effectuée à 95°C pendant 5 mn. La séparation des protéines est réalisée par une électrophorèse sur un gel pré-coulé (NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels), en présence d'un détergent anionique SDS suivant la méthode de **Laemmli (1970)** modifiée par **Payne et al., (1979)**. Les ponts disulfures sont rompus par l'action du DTT et les liaisons faible sont détruites par le SDS, aboutissant à la formation d'un complexe SDS- protéine dénaturée, (le SDS est un agent dénaturant, qui masque la charge des protéines par une charge négative, annule le fractionnement en fonction de la charge électrique et permet la séparation des protéines en fonction de leur taille, leur conformation et leur masse moléculaire).

### 6.4. La migration

Le bac supérieur qui porte les deux plaque est rempli de tampon de migration (**Annexe E**) à un niveau qui a dépassé celui des gels (2 gels sont utilisés pour cette analyse), placé dans la cuve d'électrophorèse où le bac inférieur rempli au paravent d'une solution de tampon, de tel sorte que les faces inférieurs des gels soient immergée. Afin de vérifier les bandes protéiques, un volume de 45 µl de chaque échantillon est déposé dans les puits du gel, puis 8 µl du

marqueur de taille (Dual Color Biorad) est posé dans le premier et le dernier puits. Après, la cuve d'électrophorèse est maintenue à une température constante à 10°C grâce à un système de refroidissement. Le gel est ensuite soumis à une tension de 160 V pendant 1 heure (**Figure 22**). Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur poids moléculaire. La migration est arrêtée généralement après la sortie du front coloré (**Anjum et al 2007**).



**Figure 22:** Migration électrophorétique des protéines sur gel d'acrylamide.

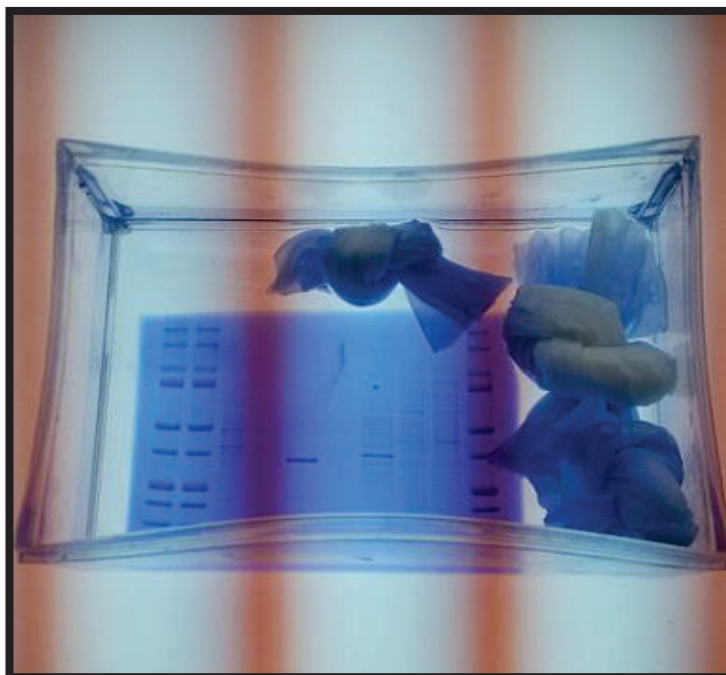
### 6.5. Coloration et décoloration des gels

Les gels sont recouverts d'une solution de coloration contenant le bleu de comassie R250 (**Annexe E**), soumis à une agitation de 50 rpm pendant 24 heures (**Figure 23**).



**Figure 23 :** Coloration du gel au bleu de comassie.

Les gels sont ensuite décolorés avec l'eau de robinet, introduit dans une solution de décoloration, contenant l'acide acétique à une concentration de 10% et le méthanol à une concentration de 20%, soumis à une agitation de 50 rpm pendant un intervalle d'une heure jusqu'à décoloration total (**Figure 24**). Ensuite, les gels sont séchés et conservés pour la visualisation des bandes sous une lampe à UV (**Anjum et al., 2007**).



**Figure 24 :** Décoloration du bleu de comassie.

**PARTIE IV.**

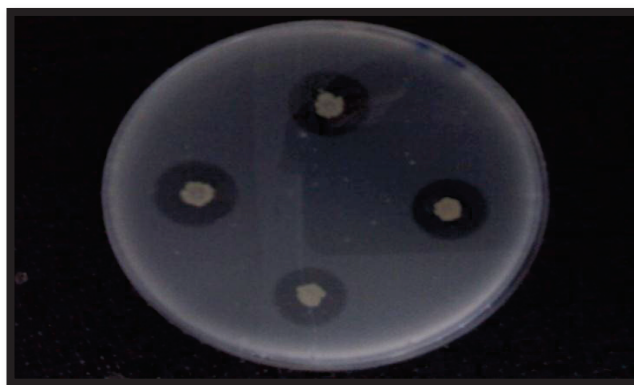
---

**RESULTATS**

1. La stratégie d'isolement

1.1. Le screening primaire

Le criblage primaire des bactéries isolées sur milieu de culture gélosé et même TGEA, additionné d'une concentration de 1% de lait écrémé a permis l'isolement de 115 souches productrices de la protéase. Une réaction positive de l'activité protéolytique se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie (Figure 25) (Facklam et al., 1989).



**Figure 25:** L'illustration des zones d'hydrolyses formées autour des colonies productrices de la protéase, inoculées sur gélose nutritive additionnée à une concentration de 1% de lait écrémé, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures.

Les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase purifiées par des repiquages successifs sur gélose nutritive, ont montré des propriétés morphologiques et biochimiques différentes (Figures 26, 27, 28) (Tableau 11).

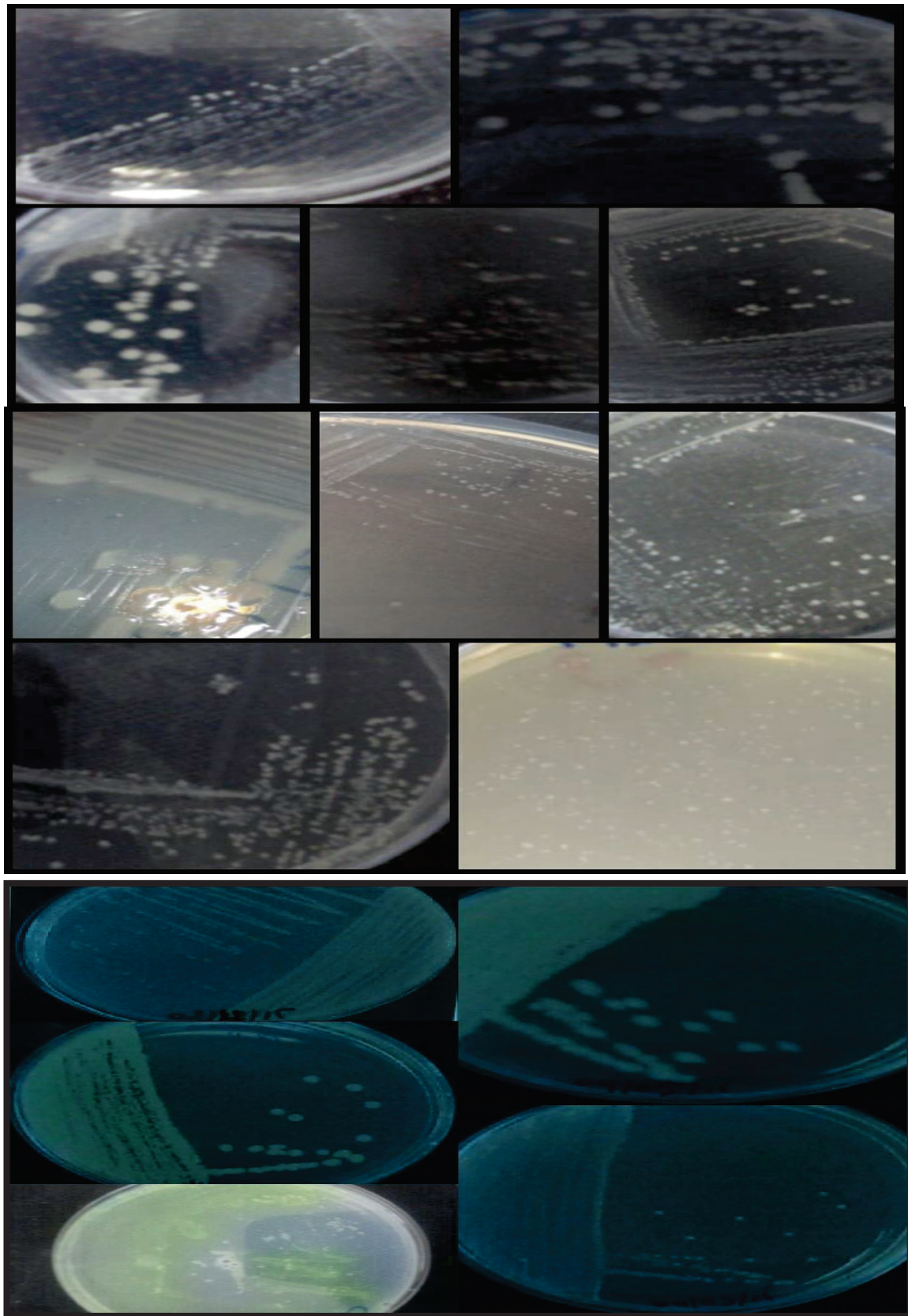
**Tableau 11:** Présentation des propriétés morphologiques et biochimiques lors de l'identification préliminaire des isolats.

Isolats	Aspect	Regroupement	Gram	Catalase	Oxydase	Respiration	Mobilité
TB <sub>1</sub> op	Colonies visqueuse, opaques, légèrement bombées, non sporulées, Productrices de pigments jaune vert ou bleu vert avec odeur caractéristique.	Bacilles fins et droits, en diplocoque				Aérobie strict	+++
TB <sub>2</sub> op							
TB <sub>3</sub> op							
TB <sub>6</sub> op							
TB <sub>7</sub> op							
TB <sub>8</sub> op							
TB <sub>9</sub> op							
TB <sub>13</sub> op							
TB <sub>14</sub> op							
TB <sub>15</sub> op							
TB <sub>4</sub> op							
TB <sub>5</sub> op							
TB <sub>10</sub> op							
TB <sub>11</sub> op							
TB <sub>12</sub> op							

H <sub>1</sub> (-1)	Colonies fines, blanchâtres, à bord régulier, et non sporulés.	Bacilles fines // // allongés, en chaîne. en paire.	+	-	-	Anaérobies facultatives, sur un milieu pauvre en O <sub>2</sub> .	-							
H <sub>1</sub> (-2)														
H <sub>1</sub> (-3)														
H <sub>1</sub> (-4)														
H <sub>1</sub> (-5)														
H <sub>1</sub> (-6)														
H <sub>1</sub> (-7)														
H <sub>1</sub> (-8)														
H <sub>1</sub> (-9)														
H <sub>1</sub> (-10)														
T <sub>2</sub> '	Colonies rugueuses, à bord irrégulier, jaunâtre, non sporulés	Bacilles droits, groupés en courte chaîne.	-	+	-	anaérobie facultatives	+++							
T <sub>1</sub>	Colonies, opalescentes blanchâtres, à bord régulier, non sporulés.	coques groupés en chaîne.	+	-	+	Anaérobies facultatives	-							
T <sub>2</sub>														
T <sub>3</sub>														
T <sub>4</sub>														
T <sub>2op</sub>														
T <sub>5</sub>														
T <sub>6</sub>														
T <sub>7</sub>														
T <sub>8</sub>														
T <sub>9</sub>														
T <sub>10</sub>														
NB <sub>1op</sub>								coques groupés en diplocoque.		+	-	+	//	-
NB <sub>2op</sub>														
NB <sub>3op</sub>														
NB <sub>4op</sub>														
NB <sub>5op</sub>														
NB <sub>6op</sub>														
y <sub>1</sub>														
y <sub>2</sub>														
y <sub>3</sub>														
y <sub>4</sub>														
Y <sub>5</sub>								coques groupés en diplocoque ou en chaîne.		+	-	+	//	-
Y <sub>6</sub>														
Y <sub>7</sub>														
Y <sub>8</sub>														
Y <sub>9</sub>														
Y <sub>10</sub>														
Y <sub>11</sub>														
Y <sub>12</sub>														
NB <sub>7op</sub>														
NB <sub>8op</sub>														
NB <sub>9op</sub>														
NB <sub>10op</sub>														
Xg <sub>1</sub>	Colonies blanchâtres, visqueuses bombés, à bord régulier, sporulés.	bacilles en chaînettes.  Bâtonnet en chaîne.	+	+	-	Aérobie strict	+							
Xg <sub>2</sub>														
Xg <sub>3</sub>														
Xg <sub>4</sub>														
Xg <sub>5</sub>														
Xg <sub>6</sub>														

Xg <sub>7</sub>	//	Grand bacilles isolés.	+	+	-	Aérobie facultative.	+	
Xg <sub>8</sub>								
Xg <sub>9</sub>								
Xg <sub>10</sub>								
LV <sub>1</sub>	Colonies moyennes, oranges, jaunâtres, pâles, lisses, à bord régulier, sporulés.	Bacilles isolés en forme de tige.				Aérobie strict		
LV <sub>2</sub>								
LV <sub>3</sub>								
LV <sub>4</sub>								
LV <sub>5</sub>		Bacilles isolés.	+	+	-			-
LV <sub>6</sub>								
LV <sub>7</sub>		Bacilles isolés en chaînette.						
LV <sub>8</sub>								
LV <sub>14</sub>								
LV <sub>15</sub>								
LV <sub>9</sub>								
LV <sub>10</sub>								
LV <sub>11</sub>								
LV <sub>12</sub>								
LV <sub>13</sub>	Colonies sèches, jaunâtres, plates, muqueuses, à bord irrégulier, sporulés.	Bâtonnets droits à bout arrondi.	+	+	-	Aérobie strict	+	
AH <sub>2</sub> (-1)								
AH <sub>2</sub> (-2)								
AH <sub>2</sub> (-3)								
AH <sub>2</sub> (-4)		Bacilles isolés.				Aéroanaérobie		
AH <sub>2</sub> (-5)								
AH <sub>2</sub> (-6)								
AH <sub>2</sub> (-7)								
AH <sub>2</sub> (-8)								
AH <sub>2</sub> (-9)								
AH <sub>2</sub> (-10)	Colonies, bombé, irrégulière, métallique, asporogènes.	Bacilles fins, et droits, isolés.	-	+	+	Aérobie strict	+++	
E <sub>3</sub> S <sub>1</sub> IBN								
E <sub>3</sub> S <sub>2</sub> IBN								
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> IBN	Grande colonies, blanches ou jaunâtre, sèches, à bord irrégulier, sporulées.	Petit bacille en Chainette	+	+	-	Aérobie strict	+	
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P								
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> IBN								
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P								
E <sub>3</sub> S <sub>6</sub> P		Grand bacille en chaînette.	+	+	-	Aéroanaérobie	+	
E <sub>3</sub> S <sub>5</sub> IBN								
E <sub>3</sub> S <sub>5</sub> p								
E <sub>3</sub> S <sub>6</sub> IBN								
P <sub>1</sub> op	Grandes colonies, blanches, granuleuses, sporulées.	Grand bacilles groupés en paires.	+	+	-	Aéroanaérobie	+	
P <sub>2</sub> op								
P <sub>3</sub> op								
P <sub>4</sub> op								
P <sub>5</sub> op								
P <sub>6</sub> op	Colonies blanches ou transparentes, à bord régulier ou ramifiées.	Grand bacilles groupés en chaîne.	+	+	+	Aérobie strict	+	



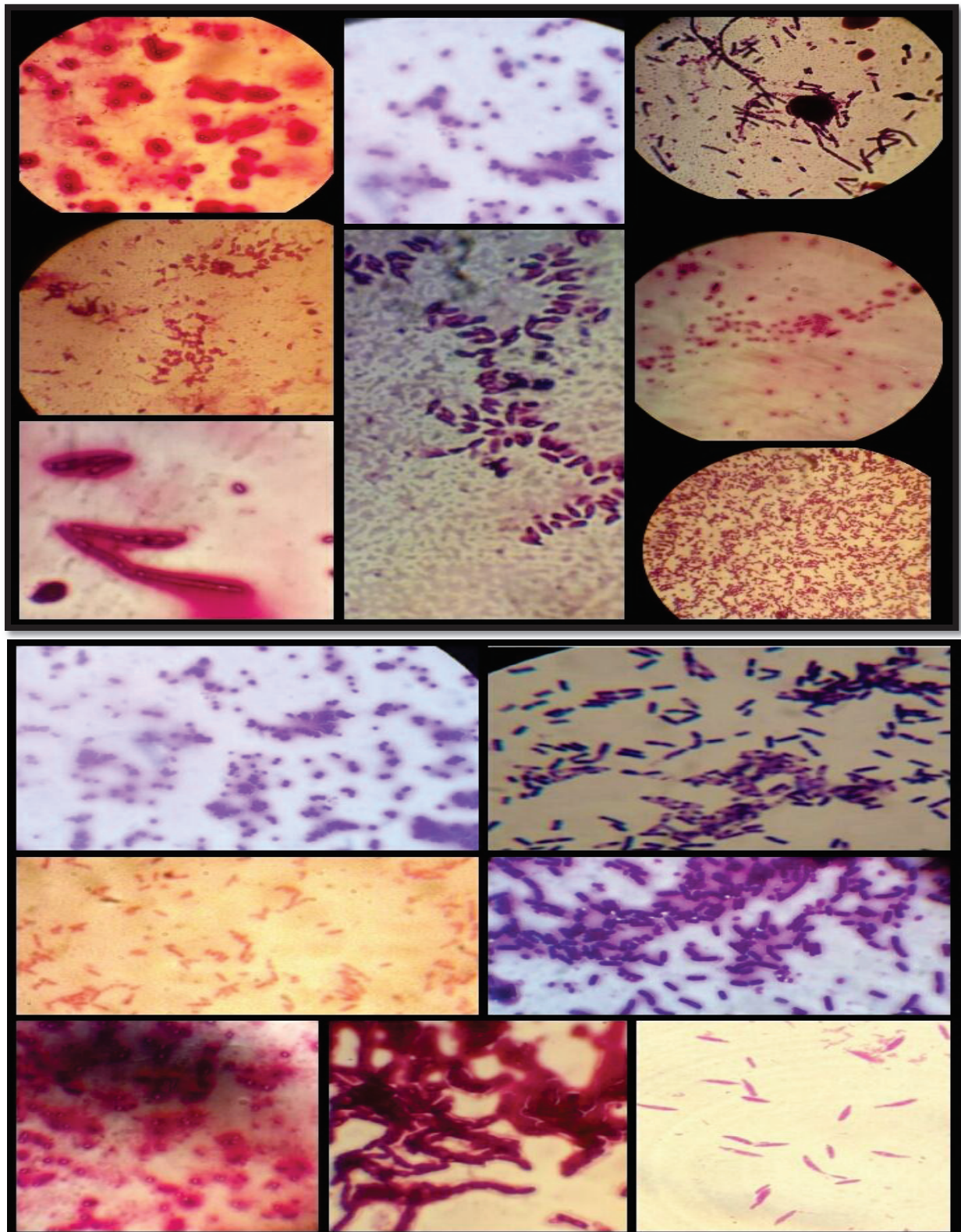


**Figure 26:** Diversité des aspects macroscopiques des colonies isolées, sélectionnées productrices de la protéase.



**Figure 27:** La mise en évidence du test de la catalase chez quelques souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.





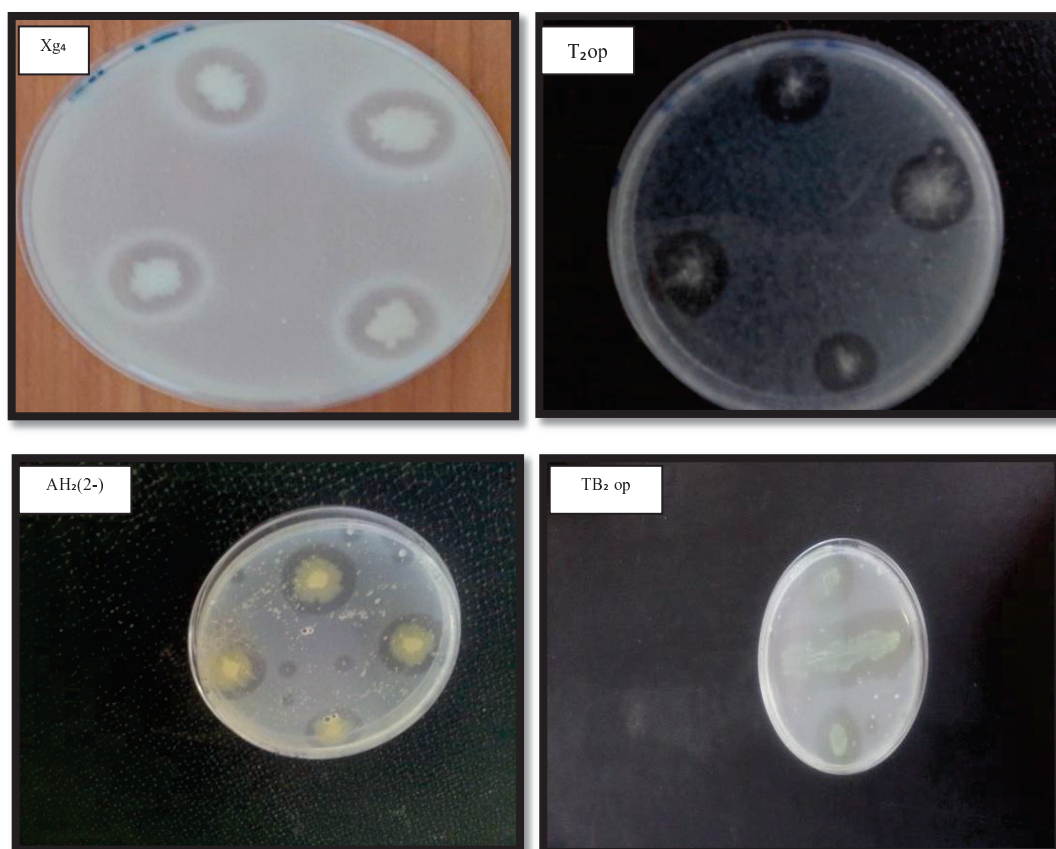
**Figure 28:** Coloration de Gram et observation microscopiques des souches isolées sélectionnées productrices de la protéase (grossissement  $\times 100$ ).

## 1.2. Screening secondaire des souches productrices de la protéase

Le criblage secondaire des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase a permis la sélection de 15 isolats, dotées d'une excellente activité.

### 1.2.1. Etude de l'activité protéolytique sur milieu de culture solide

La mise en évidence de l'activité protéolytique est effectuée par mesure des diamètres des zones d'hydrolyse claire formées autour des colonies ensemencées par stries ou par spots sur la surface des milieux de culture gélosé et TGEA, additionnés d'une concentration de 1% de lait écrémé, incubées à une température de 30°C pendant 24 heures (**Figure 29**) (**Thanh, 1978**). La mesure des diamètres de la zone d'hydrolyse de la caséine a permis le calcul de l'index d'activité protéolytique des souches sélectionnées productrices de la protéase (**Tableau 12**).



**Figure 29:** Illustration de la zone d'hydrolyse formée autour des colonies, sélectionnées productrices de la protéase (Xg<sub>4</sub>, T<sub>2</sub>op, AH<sub>2</sub> (-2) et TB<sub>2</sub>op), ensemencées par spot /et ou strie, incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

**Tableau 12** : Calcul de l'index d'activité protéolytique des souches isolées, productrices de la protéase, inoculées sur milieu de culture gélosé / et ou TGEA, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 24 heures.

La souche	L'index d'activité protéolytique	La souche	L'index d'activité protéolytique	La souche	L'index d'activité protéolytique
TB <sub>1</sub> (op)	1,1	T <sub>1</sub>	0,99	Y <sub>1</sub>	1,12
TB <sub>2</sub> (op)	<b>2,90</b>	T <sub>2</sub>	<b>2,48</b>	Y <sub>2</sub>	1,25
TB <sub>3</sub> (op)	1,05	T <sub>3</sub>	0,97	Y <sub>3</sub>	1,35
TB <sub>4</sub> (op)	1,01	T <sub>4</sub>	0,98	Y <sub>4</sub>	<b>2,33</b>
TB <sub>5</sub> (op)	1,04	T <sub>2</sub> Op	0,94	Y <sub>5</sub>	1,56
TB <sub>6</sub> (op)	1,12	T <sub>5</sub>	1,1	Y <sub>6</sub>	1,58
TB <sub>7</sub> (op)	1,22	T <sub>6</sub>	1,05	Y <sub>7</sub>	1,61
TB <sub>8</sub> (op)	1,31	T <sub>7</sub>	0,89	Y <sub>8</sub>	1,46
TB <sub>9</sub> (op)	1,33	T <sub>8</sub>	1,02	Y <sub>9</sub>	1,53
TB <sub>10</sub> (op)	1,05	T <sub>9</sub>	1,31	Y <sub>10</sub>	1,36
TB <sub>11</sub> (op)	1,03	T <sub>10</sub>	0,96	Y <sub>11</sub>	1,28
TB <sub>12</sub> (op)	1,15	NB <sub>1</sub> op	<b>2,30</b>	Y <sub>12</sub>	1,34
TB <sub>13</sub> (op)	1,6	NB <sub>2</sub> (op)	1,00	Xg <sub>1</sub>	0,63
TB <sub>14</sub> (op)	1,17	NB <sub>3</sub> (op)	0,99	Xg <sub>2</sub>	0,89
TB <sub>15</sub> (op)	1,09	NB <sub>4</sub> (op)	0,99	Xg <sub>3</sub>	0,99
H <sub>1</sub> (-1)	1,56	NB <sub>5</sub> (op)	0,98	Xg <sub>4</sub>	<b>2,78</b>
H <sub>1</sub> (-2)	1,20	NB <sub>6</sub> (op)	0,96	Xg <sub>5</sub>	1,10
H <sub>1</sub> (-3)	1,35	NB <sub>7</sub> (op)	0,94	Xg <sub>6</sub>	1,15
H <sub>1</sub> (-4)	1,29	NB <sub>8</sub> (op)	0,99	Xg <sub>7</sub>	0,86
H <sub>1</sub> (-5)	1,3	NB <sub>9</sub> (op)	0,95	Xg <sub>8</sub>	1,45
H <sub>1</sub> (-6)	<b>2,10</b>	NB <sub>10</sub> (op)	0,97	Xg <sub>9</sub>	1,38
H <sub>1</sub> (-7)	1,16	LV <sub>1</sub>	1,25	Xg <sub>10</sub>	1,5
H <sub>1</sub> (-8)	1,03	LV <sub>2</sub>	<b>2,75</b>	E <sub>3</sub> S <sub>1</sub> (IBN)	<b>2,80</b>
H <sub>1</sub> (-9)	1,08	LV <sub>3</sub>	1,39	E <sub>3</sub> S <sub>2</sub> (IBN)	1,33
H <sub>1</sub> (10)	1,05	LV <sub>4</sub>	1,65	E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> (IBN)	1,23
T <sub>2</sub> '	<b>2,05</b>	LV <sub>5</sub>	1,48	E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> (P)	<b>2,88</b>
AH <sub>2</sub> (-1)	1,40	LV <sub>6</sub>	1,47	E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> (IBN)	1,28
AH <sub>2</sub> (-2)	<b>2,85</b>	LV <sub>7</sub>	1,10	E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> (P)	<b>2,83</b>
AH <sub>2</sub> (-3)	1,32	LV <sub>8</sub>	1,05	E <sub>3</sub> S <sub>5</sub> (IBN)	1,25
AH <sub>2</sub> (-4)	0,99	LV <sub>9</sub>	1,02	E <sub>3</sub> S <sub>5</sub> (p)	1,11
AH <sub>2</sub> (-5)	1,05	LV <sub>10</sub>	0,99	E <sub>3</sub> S <sub>6</sub> (IBN)	0,99
AH <sub>2</sub> (-6)	1,03	LV <sub>11</sub>	0,96	E <sub>3</sub> S <sub>6</sub> (p)	0,86
AH <sub>2</sub> (-7)	1,01	LV <sub>12</sub>	1,12	P <sub>1</sub> (op)	<b>2,55</b>
AH <sub>2</sub> (-8)	0,98	LV <sub>13</sub>	0,95	P <sub>2</sub> (op)	<b>2,68</b>
AH <sub>2</sub> (-9)	0,97	LV <sub>14</sub>	0,89	P <sub>3</sub> (op)	1,65
AH <sub>2</sub> (-10)	0,94	LV <sub>15</sub>	1,01	P <sub>4</sub> (op)	1,75
/	/	/	/	P <sub>5</sub> (op)	1,35
/	/	/	/	P <sub>6</sub> (op)	1,15
/	/	/	/	P <sub>7</sub> (op)	1,10
/	/	/	/	P <sub>8</sub> (op)	1,12
/	/	/	/	P <sub>9</sub> (op)	1,18
/	/	/	/	P <sub>10</sub> (op)	0,98
/	/	/	/	P <sub>11</sub> (op)	0,97

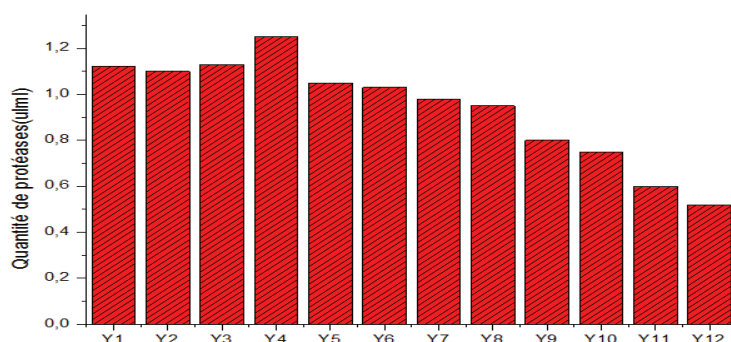


Les résultats obtenus lors du calcul de l'index d'activité protéolytique chez les souches sélectionnées productrices de la protéase (TB<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, AH<sub>2</sub>(-2), E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> IBN, Xg<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, P<sub>2op</sub>, P<sub>1op</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, Y<sub>4</sub>, NB<sub>1op</sub>, H<sub>1</sub>(-6) et T<sub>2</sub>') ont donné des valeurs maximales de (2,90, 2,88, 2,85, 2,83, 2,80, 2,78, 2,75, 2,68, 2,55, 2,48, 2,45, 2,33, 2,30, 2,10 et 2,05) respectivement par rapport aux autres souches (Tableau 12 ).

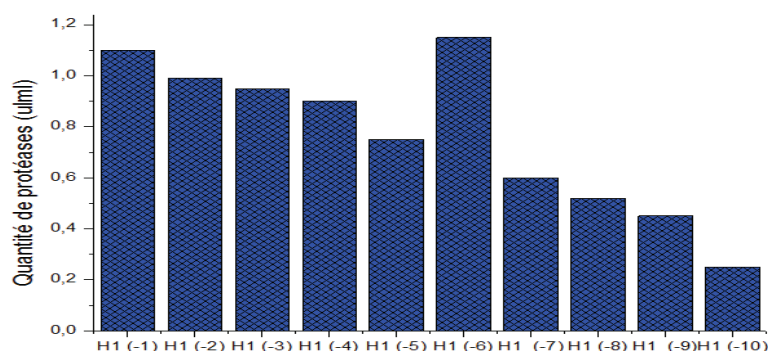
### 1.2.2. Etude de l'activité protéolytique sur milieu de culture liquide

L'étude de l'activité protéolytique des souches isolées, productrices de la protéase, inoculées sur milieu de production liquide est évaluée par la détermination de la quantité de caséine hydrolysée, mesurée à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (kunitz 1947).

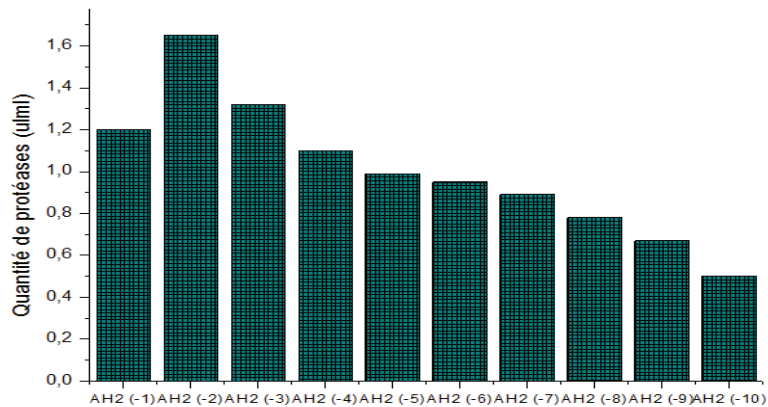
Les résultats obtenus, exprimés en (Unité/ml) des souches isolées de différents sites (Y, H<sub>1</sub>, AH<sub>2</sub>, T, Xg, E<sub>3</sub>S, NBop, LV, TBop, et P) sont illustrés dans les (Figures 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 40).



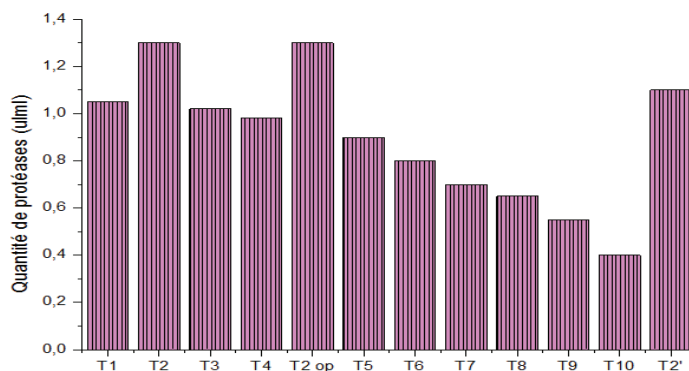
**Figure 30:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (Y) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



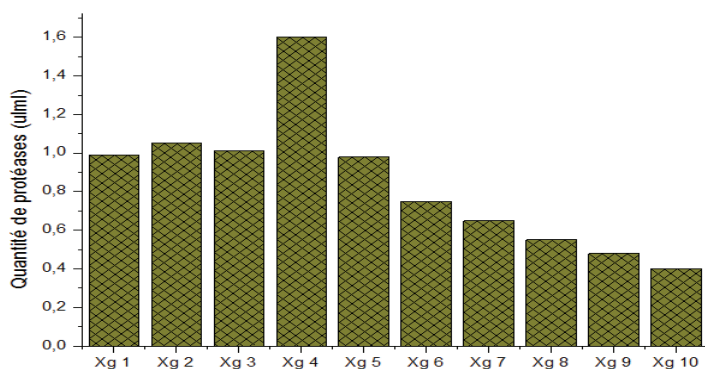
**Figure 31:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (H<sub>1</sub>) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



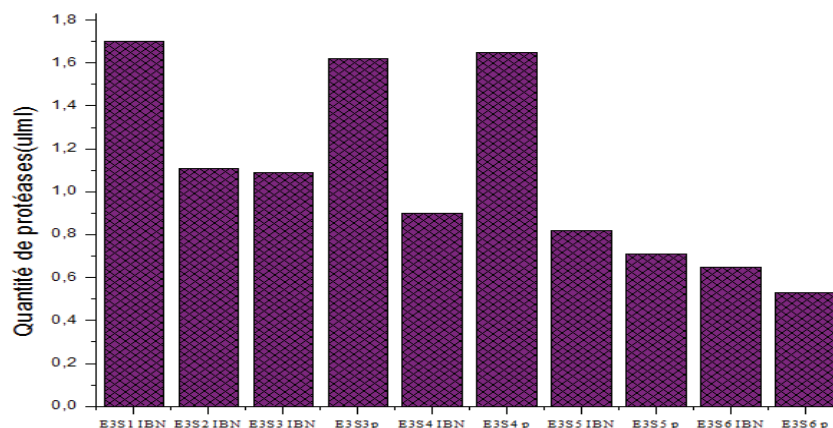
**Figure 32:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (AH<sub>2</sub>) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



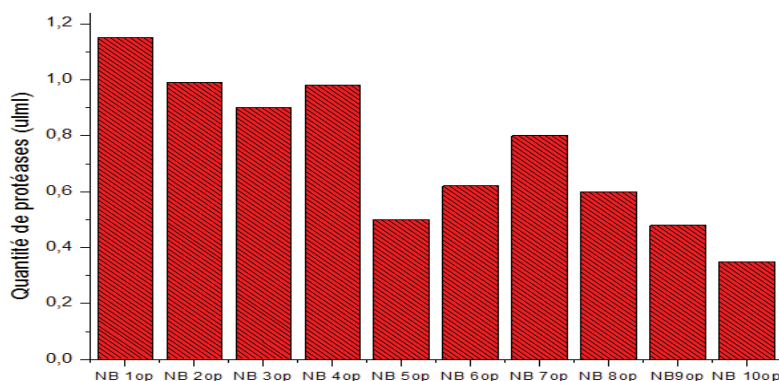
**Figure 33:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (T) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



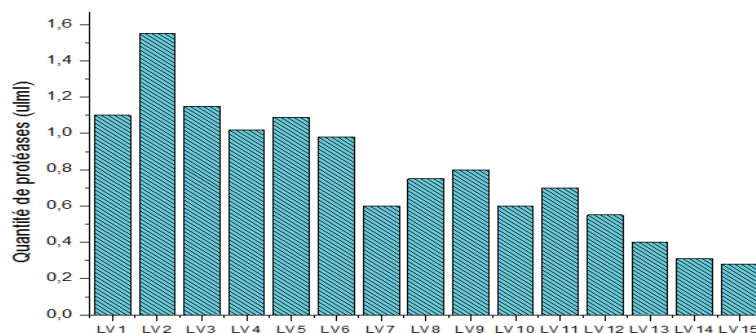
**Figure 34:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (Xg) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



**Figure 35:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (E<sub>3</sub>S) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

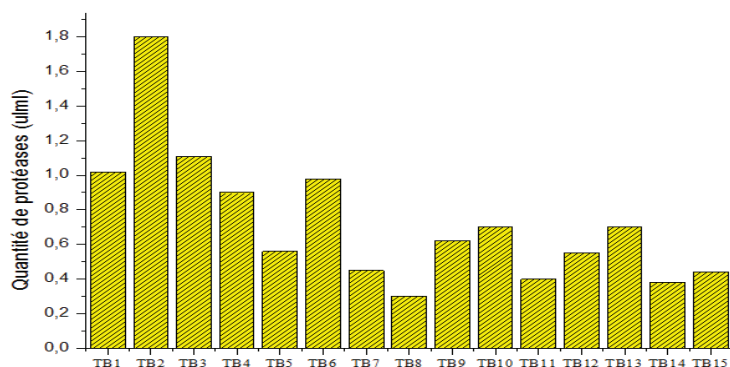


**Figure 36:** Estimation de la production de protéases chez les souches isolées à partir du site (NBop) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

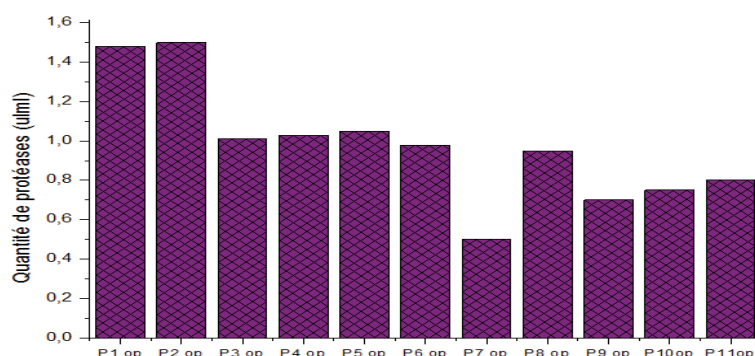


**Figure 37:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (LV) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.





**Figure 38:** Estimation de la production de protéases chez les souches isolées à partir du site (TBo) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



**Figure 39:** Estimation de la production des protéases chez les souches isolées à partir du site (P) incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

La comparaison des résultats obtenus chez les souches  $Y_4$ ,  $H_1$  (-6),  $NB_{1op}$ ,  $AH_1$ (-2),  $E_3S_4P$ ,  $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $T_2'$ ,  $E_3S_3P$ ,  $E_3S_1IBN$ ,  $LV_2$ ,  $TB_{2op}$ ,  $P_{1op}$ ,  $P_{2op}$  et  $Xg_4$ , a montré une variabilité de la quantité de la protéase produite, avec des taux de production maximales de (1,25, 1,15, 1,15, 1,65, 1,65, 1,30, 1,30, 1,10, 1,62, 1,7, 1,55, 1,80, 1,48, 1,50 et 1,60 U/ml) respectivement.

## 2. Etude de la cinétique de croissance

L'étude du suivi de la cinétique de croissance bactérienne des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase est effectuée sur un milieu de culture de production contenant: 1g/l glucose, 1g/l amidon, 1g/l caséine et 1% peptone, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C, pendant 120 heures.

La croissance est déterminée par mesure de la densité optique des suspensions bactériennes à une longueur d'onde de 275 nm. Les prélèvements (1 ml) sont effectués à des intervalles de

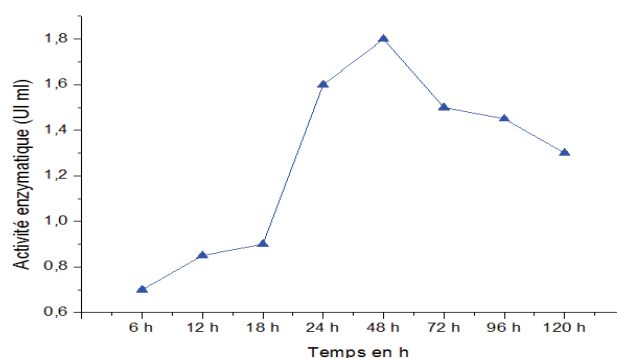
temps de 3 heures et les courbes de croissance en fonction du temps sont données en (Annexe B). L'état stationnaire est atteint après 28 heure de fermentation où la production de la protéase a progressé et un maximum d'activité de (0,8, 0,7, 0,65, 0,58, 0,72, 0,61, 0,6, 0,7, 0,5, 0,85, 0,7, 0,55, 0,5, 0,66 et 0,55 U/ml) est distingué à la fin de cette phase (39heure) pour les souches ( $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $T_{B2op}$ ,  $T_2'$ ,  $AH_2(-2)$ ,  $Xg_4$ ,  $P_{2op}$ ,  $E_3S_3P$ ,  $H_1(-6)$ ,  $NB_{1op}$ ,  $Y_4$ ,  $LV_2$ ,  $E_3S_4p$ ,  $E_3S_1IBN$  et  $P_{1op}$ ) respectivement.

### 3. Influence des différents paramètres physicochimiques sur la production de la protéase

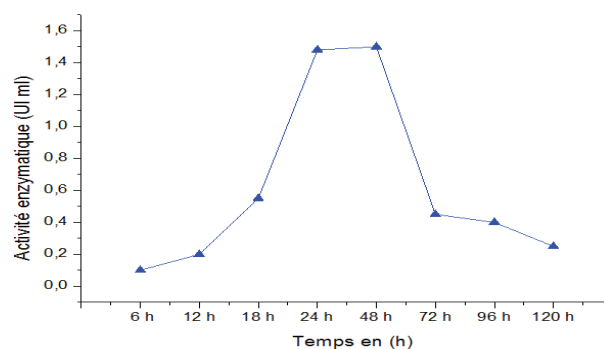
#### 3.1. Etude de l'effet de la durée d'incubation sur la production de la protéase

L'étude de l'influence de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase dans un milieu de culture de production, incubées avec une agitation de 130 rpm à une température de 30°C à des intervalles de temps de (0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 et 120 heures).

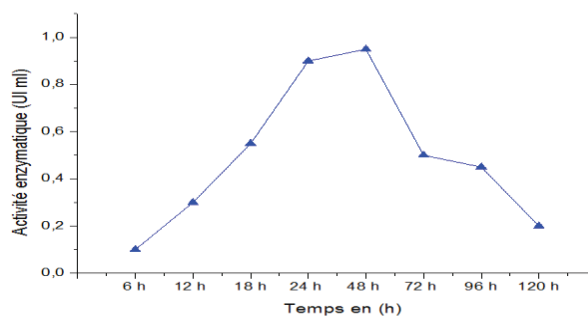
Les résultats obtenus de l'effet de la durée d'incubation sur la production de la protéase chez les souches ( $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $T_{B2op}$ ,  $T_2'$ ,  $AH_2(-2)$ ,  $Xg_4$ ,  $P_{2op}$ ,  $E_3S_3P$ ,  $H_1(-6)$ ,  $NB_{1op}$ ,  $Y_4$ ,  $LV_2$ ,  $E_3S_4p$ ,  $E_3S_1IBN$  et  $P_{1op}$ ) ont montré une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) respectivement. Cependant, le taux de production de la protéase a diminué considérablement après 72 heures d'incubation (Figures 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48).



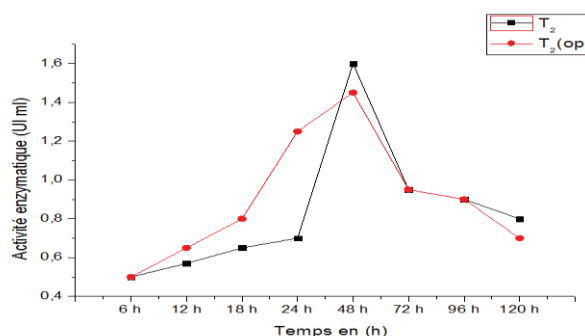
**Figure 40:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée ( $T_2'$ ), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



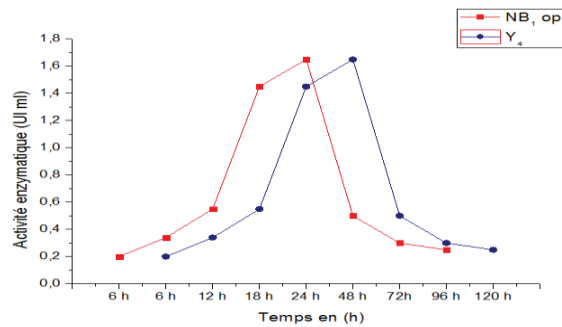
**Figure 41:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $H_1$  (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



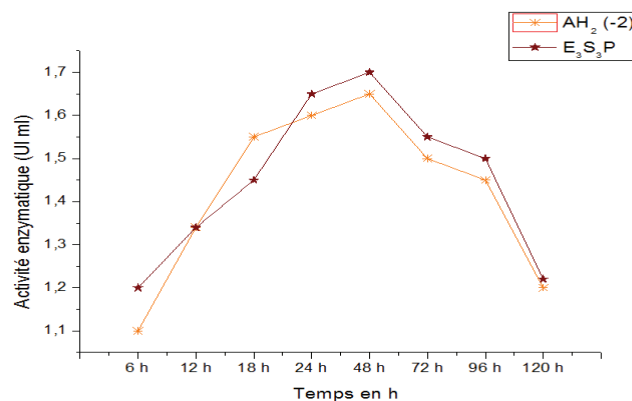
**Figure 42:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $LV_2$ , inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



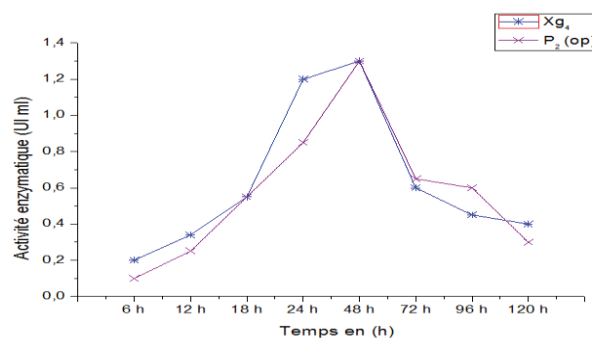
**Figure 43:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées  $T_2$  et  $T_{2op}$ , inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



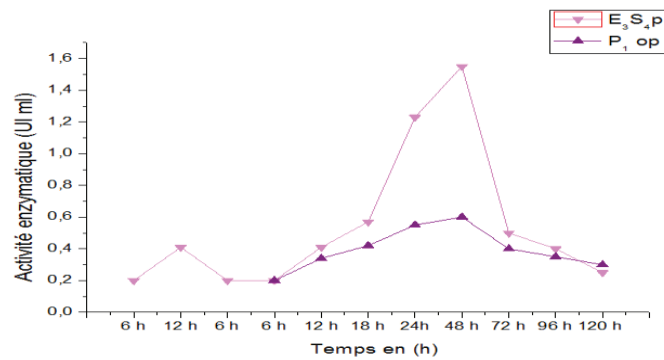
**Figure 44:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées NB<sub>1op</sub> et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



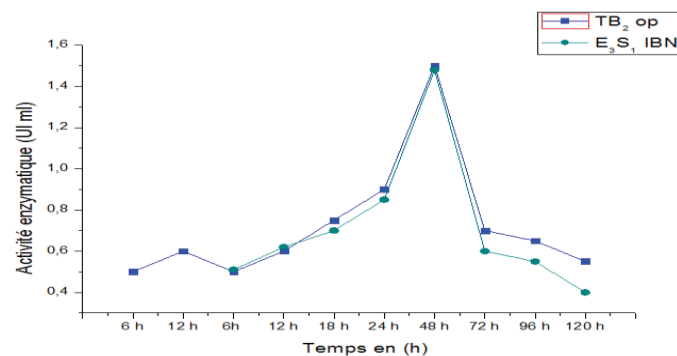
**Figure 45:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub>(-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



**Figure 46:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et p<sub>2op</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.



**Figure 47:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

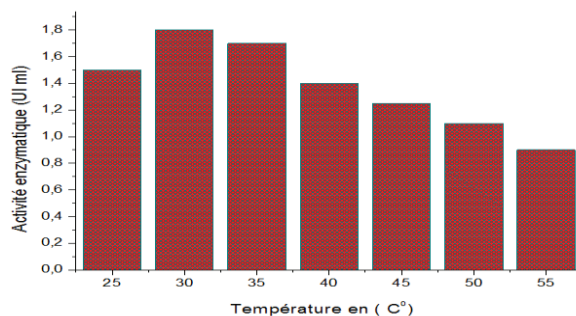


**Figure 48:** Etude de l'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 120 heures.

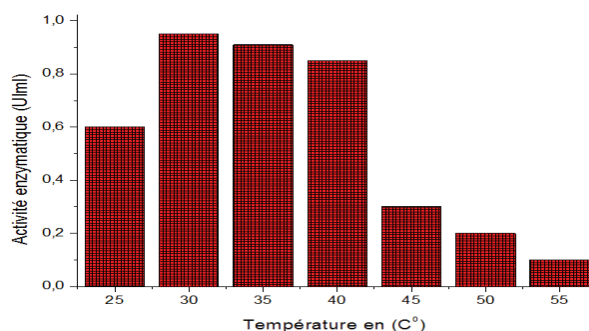
### 3.2. Etude de l'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase

L'étude de l'influence de la température sur l'activité protéolytique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase est effectuée sur un milieu de culture de production, incubées avec une agitation de 130 rpm à différentes températures (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C) pendant 48 heures.

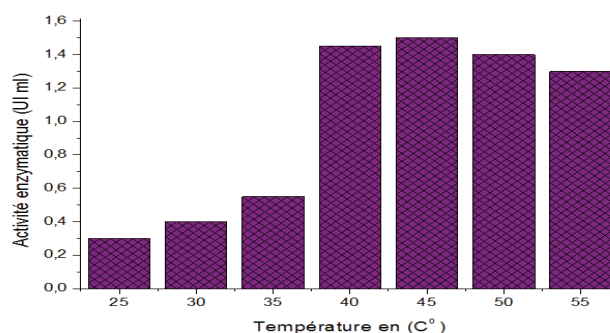
Les résultats obtenus de l'effet de la température d'incubation sur la production de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées (T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, TB<sub>2</sub>op, T<sub>2</sub>', AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>op, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1</sub>op, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et P<sub>1</sub>op) ont montré à des températures de (30, 35 et 45°C) une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) respectivement (Figures 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55).



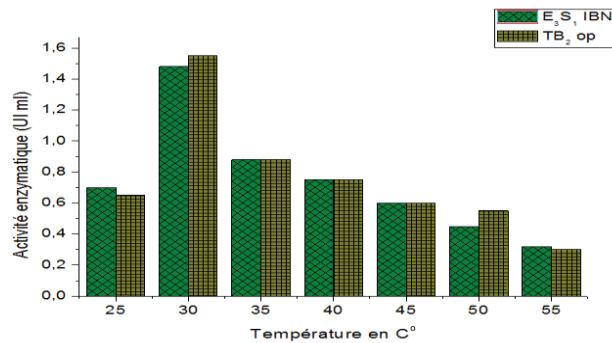
**Figure 49 :** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.



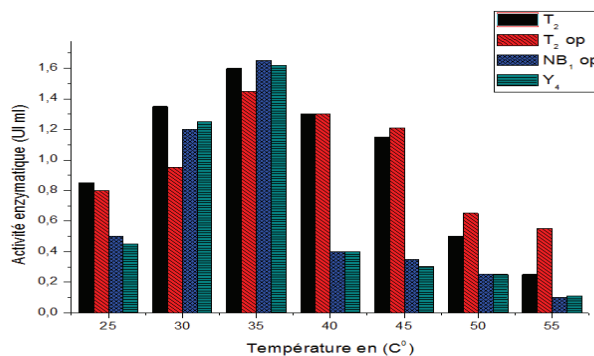
**Figure 50:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.



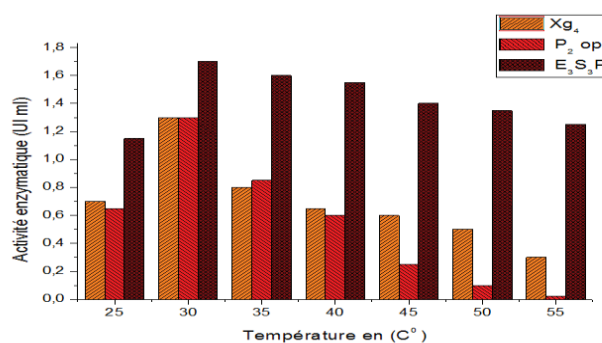
**Figure 51:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.



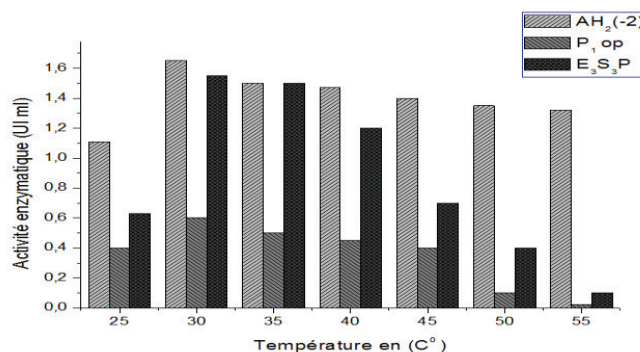
**Figure 52:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et TB<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.



**Figure 53:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.



**Figure 54:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

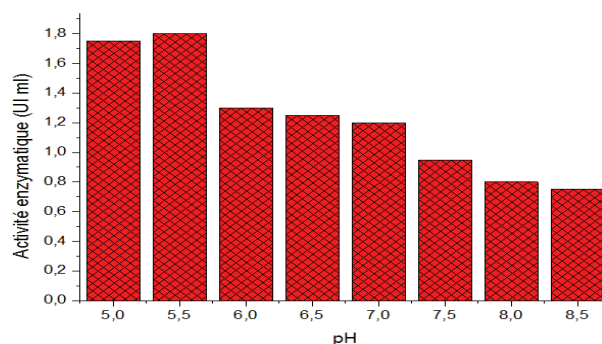


**Figure 55:** Etude de l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub>(-2), P<sub>1op</sub> et E<sub>3S3P</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm pendant 48 heures à différentes températures.

### 3.3. Etude de l'effet du pH sur l'activité et la stabilité de la protéase

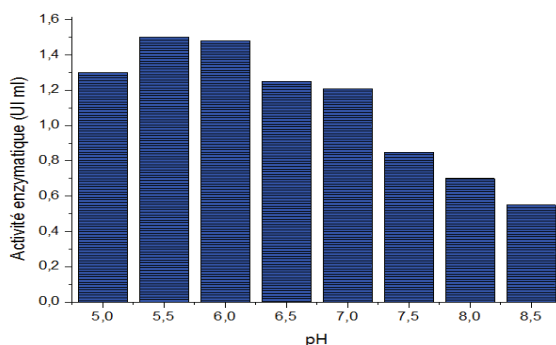
L'étude de l'influence de la valeur du pH sur l'activité protéolytique est étudiée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase dans un milieu de culture de production à différentes valeurs de pH (5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8 et 8,5), incubées avec une agitation de 130 rpm pendant 48 heures à la température convenable.

Les résultats obtenus de l'effet du pH sur la production de la protéase chez les souches (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2</sub>', AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3S3P</sub>, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3S4P</sub>, E<sub>3S1IBN</sub> et P<sub>1op</sub>) ont montré à des valeurs de pH de (5, 5,5, 6, 7, 7,5 et 8) une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI /ml) respectivement (Figures 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64).

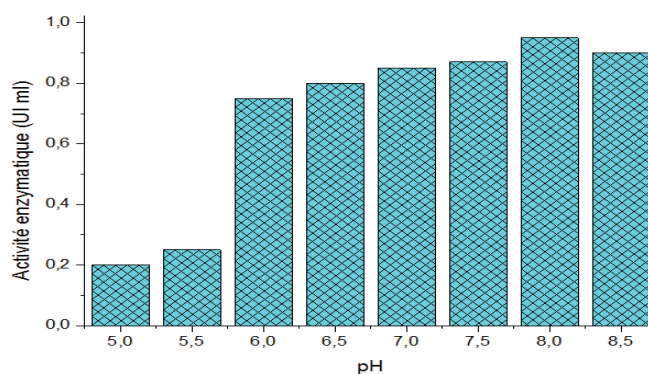


**Figure 56:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 30 °C pendant 48 heures.

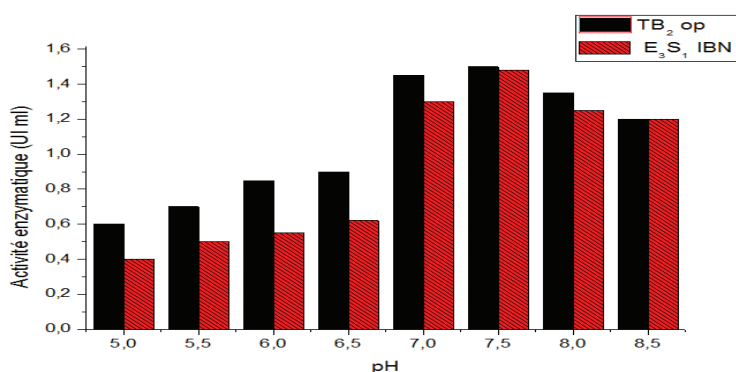




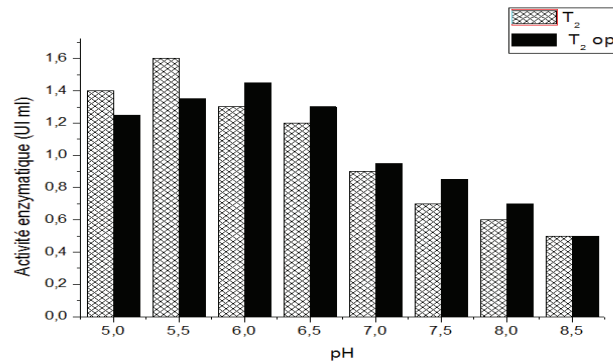
**Figure 57:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 45°C pendant 48 heures.



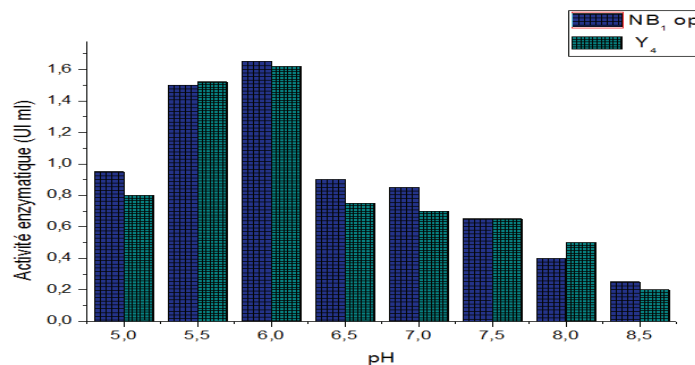
**Figure 58:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production à différents pH, incubée avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



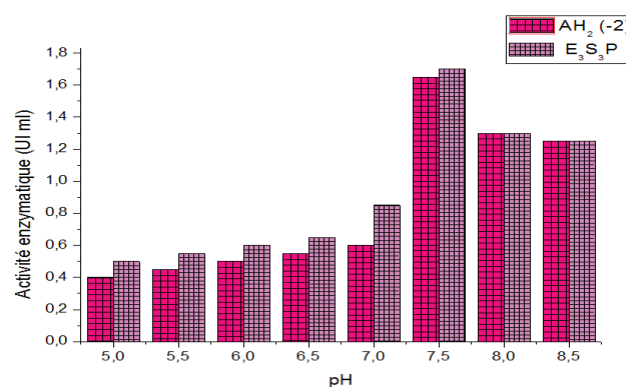
**Figure 59:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2op</sub> et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



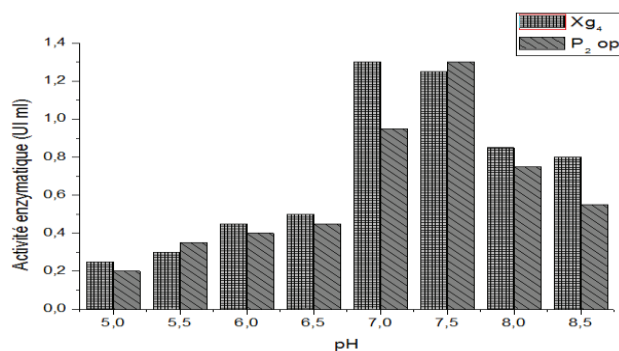
**Figure 60:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub> et T<sub>2op</sub> inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 35 °C pendant 48 heures.



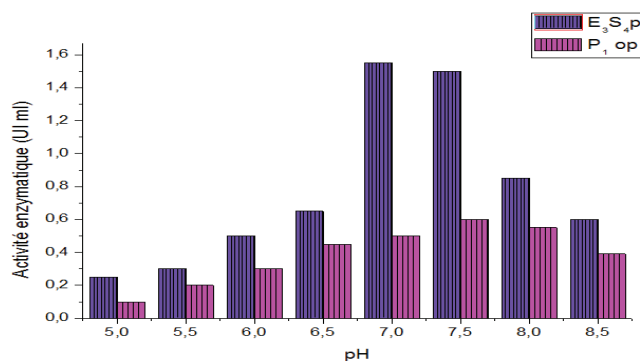
**Figure 61:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées NB<sub>1op</sub> et Y<sub>4</sub> inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 35°C pendant 48 heures.



**Figure 62:** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.



**Figure 63 :** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30 °C pendant 48 heures.



**Figure 64 :** Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op inoculées sur milieu de production à différents pH, incubées avec agitation de 130 rpm à 30°C pendant 48 heures.

#### 4. Identification des souches performantes par galeries API

Les résultats obtenus des profils biochimiques des souches isolées sélectionnées productrices de la protéase, inoculées sur des galeries API (**Figure 65, Tableau 13**), incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures sont exprimés par l'utilisation des indices (+, -) et interprétés en se référant à un tableau d'interprétation ou un catalogue analytique (**Annexe E**).



**Figure 65 :** Aspect des galeries biochimiques inoculées par les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase, incubées à une température de 30°C pendant 24-48 heures.

**Tableau 13 :** Illustration des profils biochimique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase, incubées à une température de 30°C pendant 24heures.

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	Citrate	H <sub>2</sub> S	Urée	TDA	Indole	VP	Gélatinase	Glucose
AH <sub>2</sub> (-2)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P <sub>1</sub> (op)	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
P <sub>2</sub> (op)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
Xg <sub>4</sub>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
LV <sub>2</sub>	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+/-
T <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
T <sub>2</sub> op	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
NB <sub>1</sub> op	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
Y <sub>4</sub>	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
H <sub>1</sub> -6	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
TB <sub>2</sub> op	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E <sub>3</sub> S <sub>1</sub> IBN	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
T <sub>2</sub> '	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+

Souches	Manitol	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Saccharose	Melibiose	Amygdaline	Arabinose
AH <sub>2</sub> (-2)	-	-	+	-	+	-	+	-
P <sub>1</sub> op	-	-	-	+	+	-	-	-
P <sub>2</sub> op	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-
Xg <sub>4</sub>	+	+/-	+/-	+	+	+	+	-
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P	-	-	+	-	+	-	+	-
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P	+	+	+	+	+	+	+	-
LV <sub>2</sub>	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-
T <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	+	+	+
T <sub>2</sub> op	+	-	-	-	-	+	+	+
NB <sub>1</sub> op	+	-	+	+	-	-	+	-
Y <sub>4</sub>	+	-	+	+	-	-	+	-
H <sub>1</sub> (-6)	-	-	-	-	-	-	-	-
TB <sub>2</sub> op	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-
E <sub>3</sub> S <sub>1</sub> IBN	-	-	-	-	-	+/-	-	+/-
T <sub>2</sub> '	+	+	-	+	+	+	+	+

## 5. Identification moléculaire des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase

### 5.1. Quantification de l'ADN au Nanodrop

La quantification de l'ADN extrait, par Nanodrop consiste en une mesure spectrophotométrique de la quantité des rayons ultraviolets absorbés par les bases. A cet effet, l'ADN est éluée par l'H<sub>2</sub>O bidistillée et sa concentration est mesurée à une longueur d'onde de 260 nm contre un blanc (H<sub>2</sub>O). La détermination de la pureté de l'ADN est effectuée lors du calcul

d'un ratio A260/A280. D'après les résultats indiqués dans le (Tableau 14), ce ratio est au voisinage de 1,8 ce qui confirme la pureté de nos échantillons. Les courbes de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde sont illustrées en (Annexe F).

**Tableau14** : Détermination de la quantité d'ADN bactérien à l'aide d'un Nanodrop.

N° du tube	[c] ng/ul	260/280	260/230	A260	A280
1	216,5	1,77	1	4,329	2,43
2	272,5	1,56	0,94	5,45	3,5
3	151	1,62	0,86	3,026	1,872
4	145,2	1,5	0,65	2,9	1,93
5	117,2	1,45	0,71	2,34	1,61
6	205,5	1,61	0,88	4,11	2,54
7	414,9	1,56	0,77	8,29	5,33
8	461,8	1,78	1,22	9,23	5,2
9	75,2	1,44	0,57	1,5	1,046
10	308,6	1,55	0,88	6,17	3,98
11	413,7	1,51	0,75	6,17	3,98
12	414,5	1,74	1,17	9,09	5,219
13	502,5	1,9	1,51	10,05	5,06
14	1148,2	1,76	1,72	22,96	13,06
15	440,7	1,88	1,34	8,81	4,68
16	673,1	1,92	1,36	13,46	7,01

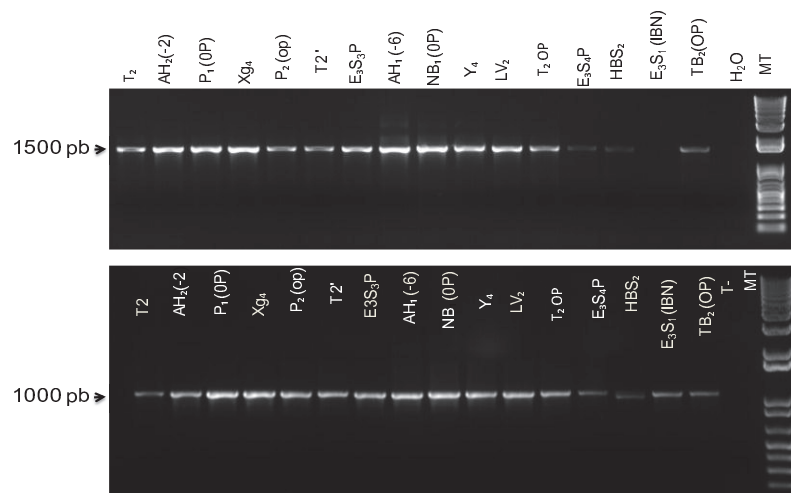
La première colonne informe sur la concentration d'ADN contenu dans chaque tube afin de définir la dilution de l'échantillon avant de réaliser la PCR (Tableau 15) (Prieur et al., 2004).

**Tableau15** : Valeurs des dilutions de l'ADN bactérien

Tubes n°	Concentration (ng/ul)	Volume ADN	Volume H <sub>2</sub> O
1	216,5	4,6	15,4
2	272,5	3,7	16,3
3	151	6,6	13,4
4	145,2	6,9	13,1
5	117,2	8,5	11,5
6	205,5	4,9	15,1
7	414,9	2,4	17,6
8	461,8	2,2	17,8
9	75,2	13,3	6,7
10	308,6	3,2	16,8
11	413,7	2,4	17,6
12	454,5	2,2	17,8
13	502,5	2	18
14	1148,2	0,9	19,1
15	440,7	2,3	17,7
16	673,1	1,5	18,5

### 5.2. Profils d'amplification des souches isolées sélectionnées productrices de la protéase

Les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase (**T<sub>2</sub>**, **T<sub>2</sub>op**, **TB<sub>2</sub>op**, **T<sub>2</sub>'**, **AH<sub>2</sub>(-2)**, **Xg<sub>4</sub>**, **P<sub>2</sub>op**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **H<sub>1</sub>(-6)**, **NB<sub>1</sub>op**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub> p**, **E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN** et **P<sub>1</sub>op**) sont retenues pour une éventuelle identification moléculaire. A cet effet, le fragment d'ADN, codant la sous unité ribosomale 16S est amplifié par PCR. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les résultats obtenus lors de l'amplification des fragments d'ADN par la technique de la PCR en présence d'un couple d'amorces (W001/W002) et (W001 /W007) et leur séparation par électrophorèse sur gel d'agarose ont montré la présence de bandes de tailles de 1000 et 1500 pb, caractéristique du gène codant la région 16s ARN (**Figure 66**).



**Figure 66** : Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments d'ADN amplifiés par PCR en présence d'un couple d'amorces (W001/W002) et (W001 /W007).

- **MT** : Marqueur de poids moléculaire : 1 Kb ladder invitrogen
- **T** : Témoin négatif (H<sub>2</sub>O)

### 5.3. Purification de l'ADN amplifié

Les résultats obtenus de la détermination de la concentration des fragments d'ADN amplifiés par la technique de la PCR en présence des amorces (W001/W002) et (W001 /W007) sont illustrés dans le (**Tableau 16**). L'ADN extrait est élué avec un tampon de faible concentration ionique (NE). La concentration de l'ADN est mesurée à l'aide d'un Nanodrop, à une longueur d'onde de 260 nm contre un Blanc (Tampon NE).



**Tableau 16 :** Dosage des fragments d'ADN purifiés, amplifiés par PCR en présence des amorces (W001/W002) et (W001 /W007), par le Nanodrop2000.

Echantillon	[c] ng/ul	260/230	260/280	A <sub>260</sub>	A <sub>280</sub>
1	52,9	1,98	1,63	1,058	0,536
2	76,5	1,91	1,71	1,531	0,802
3	104,5	1,89	1,47	2,091	1,108
4	88,9	1,9	1,8	1,778	0,936
5	47,5	1,89	1,42	0,95	0,503
6	35,6	1,98	1,05	0,712	0,359
7	57,9	1,95	1,9	1,158	0,595
8	84,7	1,86	1,31	1,694	0,911
9	96,5	1,89	1,67	1,93	1,019
10	108,8	1,85	1,38	2,176	1,179
11	53	1,97	1,82	1,061	0,539
12	44,4	1,98	1,65	0,889	0,448
13	13,6	2,08	0,57	0,272	0,13
14	12,6	2,1	0,94	0,252	0,12
16	25,9	2,04	0,97	0,518	0,254

#### 5.4. Séquençage, correction et assemblage des gènes amplifiés

L'amplification des régions d'ADN codant la sous unité ribosomale 16s et le séquençage, ont permis l'identification moléculaire des souches. Ainsi, les séquences brutes de la région d'ADN codant la sous unité ribosomale 16s sont corrigées et assemblées afin d'obtenir un consensus. Les séquences consensus des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase sont illustrées dans les figures (67, 68, 69, 70,71, 72, 73, 74, 75, 76, 77,78, 79).

```
TTTAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAAAG
CATCTCTGCGTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAC
GAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTT
TAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGC
CACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCC
AGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTAC
ACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTC
CCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTT
TACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGG
ACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGATGAGGTTATTAAC
CTTATCGCCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATAC
ACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCTACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAG
ACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCC
ATCTGGGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCTTTGGTCTTGCGA
GTTACCGTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCAGT
GAGATAACACACACTACTA
```

**Figure 67:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche T<sub>2</sub>'.



```

TTGTACGACACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTATCT
CTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGT
CTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGG
GGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT
ATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGA
GAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACG
TGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCGCCAGTTTCCAATGACCCTCCC
CGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTTA
CGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTTCGAA
CGGTACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTC
ACGCGGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAG
GTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCG
CCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGC
GGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTAC
AGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCAGGAGCAGCTC
CCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGA
CGCGGGAAAAAAACTACATAAA

```

**Figure 68:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **AH<sub>2</sub> (-2)**.

```

TTCTAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCC
TATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTT
CAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACT
AAAGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGAC
CAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACTGCGCGCGC
TTTACGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTC
AACTAGCACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCGAAAGCCTTCATC
ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC
TGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
CGACGCGGGTCCATCCATAAGTGACAGCCGAAGCCGCCTTTCAATTCGAACCAT
GCGGTTCAAATGTTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTT
ATGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACTTCATAAGAGCA
AGCTCTTAATCCATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGCACGCCGCCAGCGTTCATCT
GACGCGGGTAAAAACAACACTAATA

```

**Figure 69:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **P<sub>1</sub> op.**

```
GACGTAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCC
CTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTA AACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
TCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCAC
TAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGA
CCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTCACCGCA
CACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCC
TTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCG
GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTAC
TCTCGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC
TCACGCGGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
AGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCCACTAGCTAATG
CGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTGAACCAT
GCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTT
ACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTAACATCCGGGAGCAG
CTCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGCACGCGCAGCGTCTGCTG
CGGGGGTAACACACCATATATTTATA
```

**Figure 70:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **Xg<sub>4</sub>**.

```
AAAGTGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCC
TATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTA AACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT
AAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTCACCGCTA
CACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCC
TTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCGCCCTATT
GAACGGCACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATC
ACTCACGCGGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC
TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
CAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTCTGAACCA
TGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGGAGTTATCCAGT
CTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCCGCGCTACATCAGGAGCA
AGCTCCCATCTGTGCTCGACTTGCATGTATTAGCACGCGCAGCGTTCGTCTGACA
GCGAAAAAAACCTAATA
```

**Figure 71:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **P<sub>2</sub> op.**

```

TGAGTGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTC
TATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTC
GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT
GAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTA
CACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGC
TTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTA
CTCTCATCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCA
CTCACGCGGGCTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCT
GCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCCGATCACCTCTC
AGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
CACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCAT
GCGGTTTCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTA
TGGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCCACTCCTCTTTTTTTCGGTGGG
CAGCTCTGTGAAAAGAGCGTTCGACTTGCATGTTATTAGCACGCGCAGCGTTCT
CCTGACTAGAGAGTACACAAAACCTTCTAA

```

**Figure 72:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **T<sub>2</sub>**.

```

AGAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCCGAAGGGGACGTCCTA
TCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCA
ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA
GTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAA
GGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG
GTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCA
GAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACA
CGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCCTC
CCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTT
TACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCG
AACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCA
CTCACGCGGGCTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCT
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
CAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCA
TGCGGTTCAAACAACCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCT
TACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTTCCGCCGCTAACATCAGGAGCAA
GCTCCCATCTGTCGCTCGACTTGCATGTTATTAGCACGCCGCCAGCGTCGCTCTG
ACGCGAATAAAACAACCTATATAA

```

**Figure 73:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**.

```

ACGTAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCAC TTTGTCCCCAGAAGGGAAAGC
TCTATCTCTAGAGATTGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCT
TCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT
TTCAACCTTGCGGTTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCCT
GAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTA
CACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGC
TTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCT
GGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATA CCGTCAAGGGGACGTTTCAGTTA
CTAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCA
CTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCT
GCCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
CAGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
GCACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTTCACTCTTATGCC
ATGCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTATCCCCCTC
TGATGGGTAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCCTCTTTCCGAAT
TGAGTGCCAGCACTCGGCGAGGAAAGATGCGTTCGACTTGCATGTATTAGCACGC
CGCAGCGTCGTCCCTGACGAAAAATATCTATATAAA

```

**Figure 74:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **NB<sub>1</sub> op.**

```

GGGAGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCAC TTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTC
TATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTG
AATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTC
AACCTTGCGGTTCGTA CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTG
AAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACC
AGAGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCCGCTAC
ACATGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCT
CCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCTCGCT
TTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATA CCGTCAAGGGGACGTTTCAGTTAC
TAACGTCCTTGTTCTTCTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTTCAC
TCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTG
CCTCCCGTAAGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTC
AGGTCGGCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
CACCGCGGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTTCACTCTTATGCCAT
GCGGCATAAACTGTTATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTATTATCCCCCTCTG
ATGGGTAGGTTACCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCCTCTTCCGAATGAGTG
CCAGCACTCGGGAGAAAGAGCGTTCGACTTGCATGTATAGCACGCGCAGCGTCGT
TCTGACAGAATATTATCTAATA

```

**Figure 75:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **Y<sub>4</sub>.**

```

GTGGCGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACCGTTGCCCCCGAAGGGGAAACT
ATATCTCTACAGTGGTCAACGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTAC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCG
ACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGA
AACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCG
CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCAAATCTCTACGCATTTACCGCTACACTTGGAAT
TCCACTTTCTCTTCTGCACTCAAGTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTG
AGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGGACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCA
ATAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTAATAAGGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACTGTACT
TGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGC
GTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA
GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCT
ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGG
CCCATCCTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTCTTTCACCATGAAGCAAAA
GAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAACCTATAGGGTAG
GTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTAACGTCAAAGGAGCAGCTCCTTTT
CTGTTGCTCGACTTGCATGTATTAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGACAGGGAT
CACACAAACTATATA

```

**Figure 76:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **LV<sub>2</sub>**.

```

AGTGCTGACGACACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCCCCCGAAGGGGAAGCTCTA
TCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCA
ATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCA
CCTTGCGGTCTGACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAA
GGGCGGAAACCTCCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
AGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACAA
TGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACCCTCCC
CGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAAGAAACCGCCTGCGCTCGCTTTC
CGCCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCC
GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGATACCGTCAAGGGATGAACAGTTACTCTT
CCTTGTTCTTCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGC
GGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCAATGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCG
GCTATGCATCGTGGCCTTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCACCGC
GGGTCCATCCATCAGCGACACCCGAAAGCGCCTTTCAAATCAAACCATGCGGTT
TCGATTGTTATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTGATGGGC
AGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCACTCTCTTTTTTTCAGTGAGCAGCTCG
TGAAAAGAGCGTTCGACTGCATGTATTAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCTAGGA
AACCAACTCCT

```

**Figure 77:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **T<sub>2</sub> op.**

```

GGGGGGCTGACGACACCATGCACCACCTGTC ACTCTGCCCCGAAGGGGAAGCC
CTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTC
GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT
CAGTCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACT
AAAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCA
GGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTA
CACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGC
TTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGTGCTG
GCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTC
GAACGGTACTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATC
ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGC
TGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTC
CAGGTCCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAAT
GCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCTAAAAGCCACCTTTTATAATTGAACC
ATGCGGTTCAATCAAGCATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGT
CTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCGCTGAACATCAGGAG
CAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAGCACCGCCGCCAGCGTTCGT
CCTGAGCAGTGAAATAACCAACTTCATAGGTG

```

**Figure 78:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P**.

```

AGGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATC
CATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTC
GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTT
TAACCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGTCGACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACT
AAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAG
GGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCC
AGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTAC
ACAGGAAATTCCACCACCCTTACCGTACTCTAGCTCAGTAGTTTTGGATGCAGTT
CCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCAACCTTGCTGAACCACCTACGCGCGCT
TTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGG
CACGAAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTTGGTAACGTCAAAACAGCAAGGTATTAA
CTTACTGCCCTTCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCACC
ACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGA
CCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGA
CCTAGGCTCATCTGATAGCGTGAGGTCCGAAGATCCCCACTTTCTCCCTCAGGA
CGTATGCGGTATTAGCGCCCGTTTCCGGACGTTATCCCCACTACCAGGCAGATT
CCTAGGCATTACTCACCCGTCCGCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCCCTTCATCC
GCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCTGGAATTC
AAACCTCCTAGGA

```

**Figure 79:** La composition en paires de bases de la séquence consensus du gène codant la sous unité ribosomale 16s de la souche **TB<sub>2</sub> op**.

Les séquences consensus des souches identifiées sont publiées et interrogées dans deux bases de données: RDP Project (**Tableau 17**) et Genbank. La comparaison des séquences des souches identifiées avec les séquences nucléotidiques indexées dans la base de données NCBI, a permis d'établir l'identité des souches sélectionnées et l'indication du degré d'homologie. Les numéros d'accèsion, l'identité et le pourcentage de similarité sont illustrés dans le (**Tableau 18**).

**Tableau 17** : L'insertion des séquences des souches identifiées dans la base de données RDP Project.

Souches	RDP Project
T <sub>2</sub> '	Domaine : <u>Bacteria</u> Phylum : <u>Proteobacteria</u> Classe : <u>Gammaproteobacteria</u> Ordre : <u>Enterobacteriales</u> Famille : <u>Enterobacteriaceae</u> Genre : <u>Enterobacter</u>
AH <sub>2</sub> (-2)	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre Bacillus
P <sub>1</sub> op	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
Xg <sub>4</sub>	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
P <sub>2</sub> op	Domaine: Bacteria Phylum :Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
T <sub>2</sub>	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Lactobacillales Famille: Enterococcaceae Genre: Enterococcus
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
H <sub>1</sub> (-6)	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Lactobacillales Unclassified Lactobacillales

NB <sub>1</sub> op	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Lactobacillales Famille: Enterococcaceae Genre: Enterococcus
Y <sub>4</sub>	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Lactobacillales Famille: Enterococcaceae Genre: Enterococcus
LV <sub>2</sub>	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Planococcaceae Genre: Lysinibacillus
T <sub>2</sub> op	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Lactobacillales Famille: Enterococcaceae Genre: Enterococcus
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P	Domaine: Bacteria Phylum: Firmicutes Classe: Bacilli Ordre: Bacillales Famille: Bacillaceae Genre: Bacillus
TB <sub>2</sub> op	Domaine: Bacteria Phylum: Proteobacteria Classe: Gammaproteobacteria Ordre: Pseudomonadales Famille: Pseudomonadaceae Genre: Pseudomonas

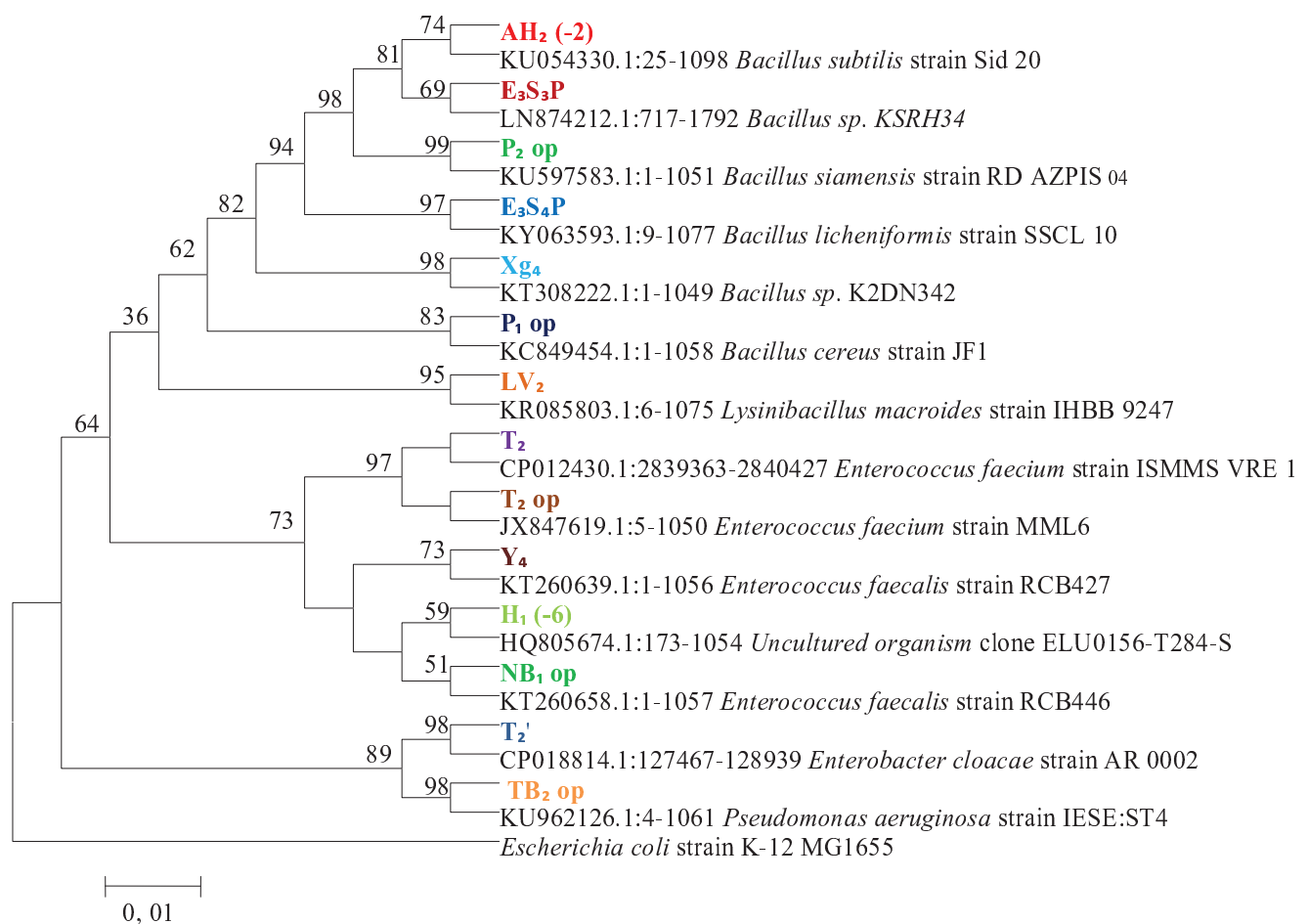
**Tableau 18 :** Présentation des numéros d'accèsion, le pourcentage de similarité et l'identité des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.

La souche	Numéro d'accèsion	Identité de la souche	Similarité
T <sub>2</sub> '	KR905684	<i>Enterobacter xiangfangensis</i> strain Ps21	99%
AH <sub>2</sub> (-2)	KF601955	<i>Bacillus subtilis</i> strain SBT-014	99%
P <sub>1</sub> op	KF601957	<i>Bacillus cereus</i> strain SBTBC-008	99%
Xg <sub>4</sub>	KX108830	<i>Bacillus sp.</i> BAB 4378	99%
P <sub>2</sub> op	KM384034	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain B5	99%
T <sub>2</sub>	CP014529	<i>Enterococcus faecium</i> strain E745	99%
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P	KT308223	<i>Bacillus sp.</i> K2DN343	99%
H <sub>1</sub> (-6)	HQ805799	Uncultured organism clone ELU0156-T284-S-NIPCRAMgANa_000317	89%
NB <sub>1</sub> op	AY395018	<i>Enterococcus faecalis sp</i>	99%
Y <sub>4</sub>	KT260655	<i>Enterococcus faecalis</i> strain RCB443	99%
LV <sub>2</sub>	KT818804	<i>Lysinibacillus macroides</i> strain SPL1	99%
T <sub>2</sub> op	KM095647	<i>Enterococcus faecium</i> strain PSB 5	98%
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P	JX237837	<i>Bacillus licheniformis</i> strain BaDB01	99%
TB <sub>2</sub> op	KU647644	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S164S	99%



### 5.5. Phylogénie et construction de l'arbre phylogénétique

Cette analyse purement bioinformatique se repose sur l'utilisation des logiciels d'alignements multiples des séquences consensus des souches isolées, sélectionnées productrice de la protéase avec les espèces apparentées dotées d'un pourcentage d'homologie élevé. L'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme MEGA 6, selon la méthode Neighbor-joining, basée essentiellement sur la substitution des paires de base et le calcul de la distance évolutive entre les taxons (**Figure 80**).



**Figure 80** : Arbre phylogénétique présentant la distance évolutive entre les souches sélectionnées productrice de la protéase et les souches de référence par l'utilisation de la méthode Neighbor-joining.

➤ La barre indique: 0.01 substitutions par position de nucléotide.

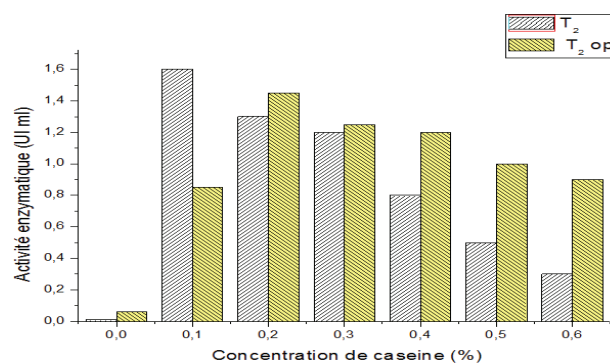
## 6. Optimisation des paramètres impliqués dans la production de la protéase

### 6.1. Etude de l'effet des différentes concentrations de caséine

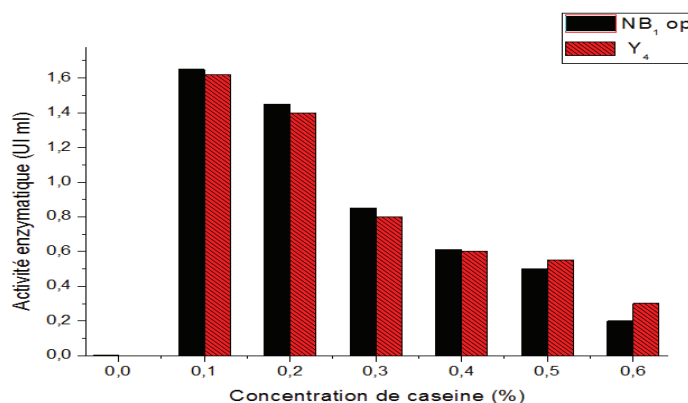
L'étude de l'influence de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase dans un

milieu de culture de production à différentes concentrations de caséine, incubées avec une agitation de 130 rpm pendant 48 heures à la température convenable pour chaque souche.

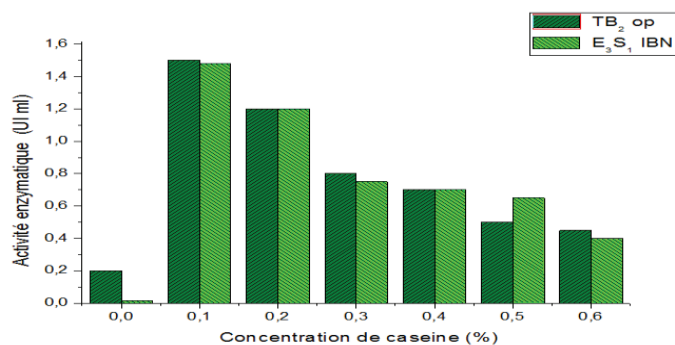
Les résultats obtenus de l'effet de la concentration de caséine sur la production de la protéase chez les souches ( $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $TB_{2op}$ ,  $T_2'$ ,  $AH_2(-2)$ ,  $Xg_4$ ,  $P_{2op}$ ,  $E_3S_3P$ ,  $H_1(-6)$ ,  $NB_{1op}$ ,  $Y_4$ ,  $LV_2$ ,  $E_3S_4p$ ,  $E_3S_1IBN$  et  $P_{1op}$ ) lors de l'utilisation d'une concentration de 0,1% de caséine, ont montré une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) respectivement (Figures 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89).



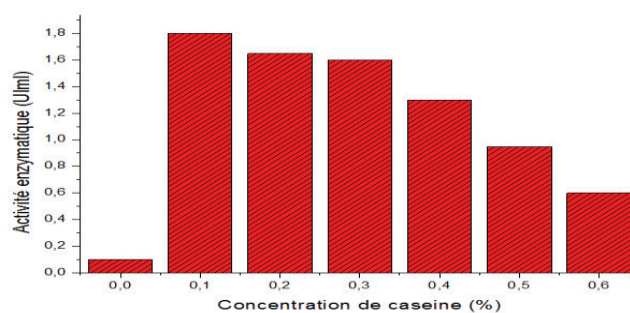
**Figure 81:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées  $T_2$  et  $T_{2op}$ , inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.



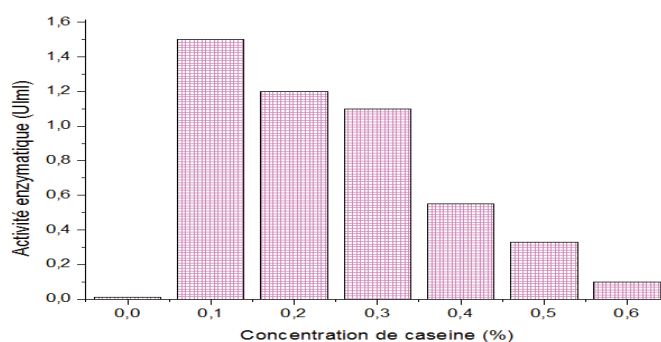
**Figure 82:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées  $Y_4$  et  $NB_{1op}$ , inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.



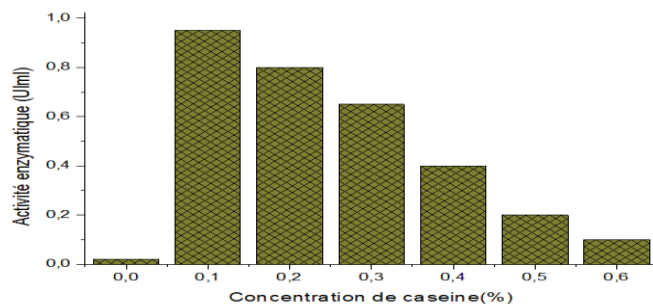
**Figure 83:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



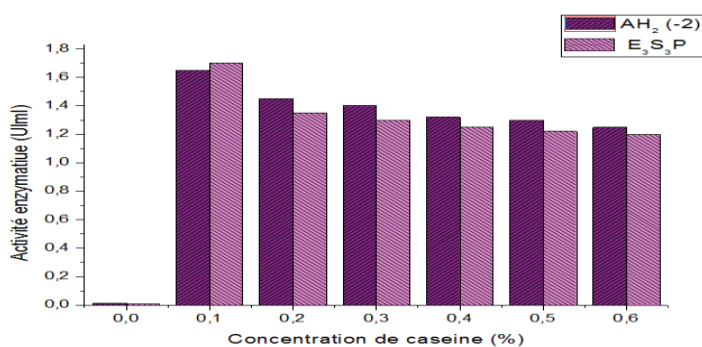
**Figure 84:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2</sub>', inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



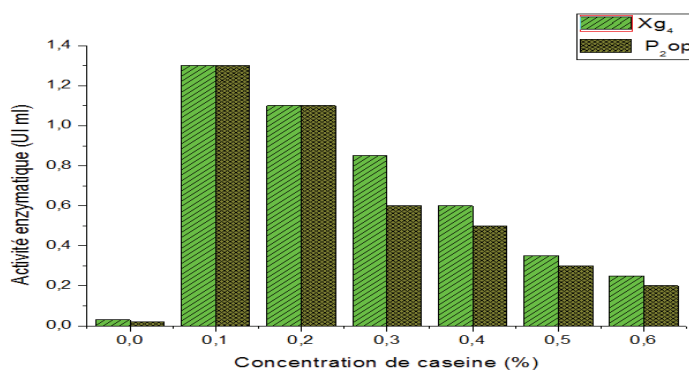
**Figure 85:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.



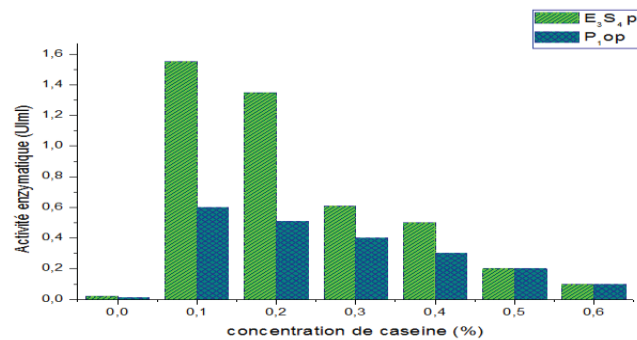
**Figure 86:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



**Figure 87:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub>(-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



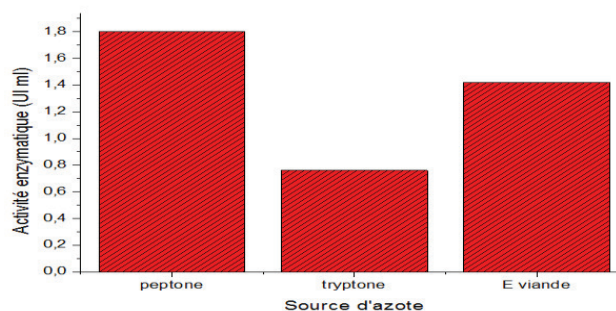
**Figure 88 :** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



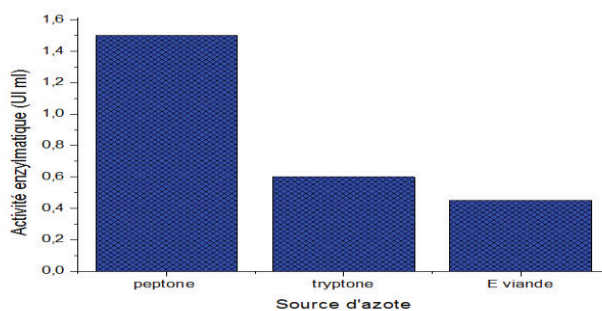
**Figure 89:** Etude de l'effet de la concentration de caséine sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1op</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

### 6.2. Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique

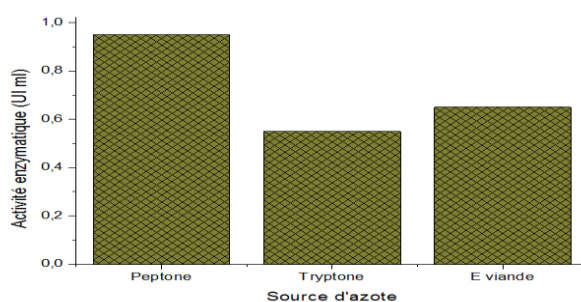
L'étude de l'influence de la source d'azote sur l'activité protéolytique est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase dans un milieu de culture de production contenant séparément les composants suivants: peptone, tryptone et extrait de viande, incubées avec une agitation de 130 rpm à la température optimale pour chaque souche pendant 48 heures. Les résultats de l'effet de la source d'azote sur la production de la protéase chez les souches (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et P<sub>1op</sub>) lors de l'utilisation du peptone ont montré une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI /ml) respectivement (Figures 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96).



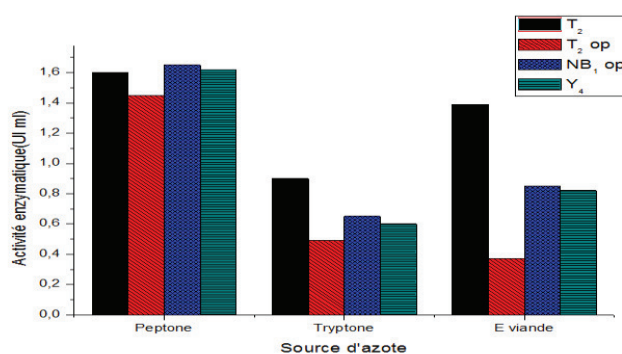
**Figure 90:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée T<sub>2'</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



**Figure 91:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée H<sub>1</sub> (-6), inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

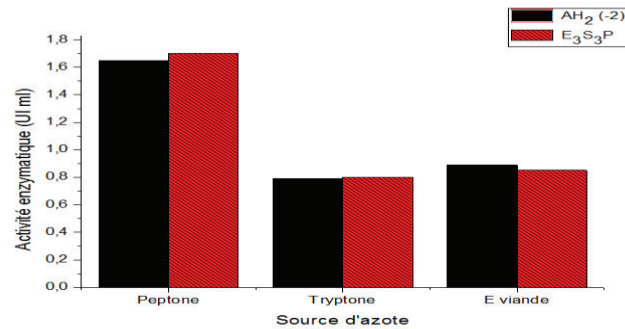


**Figure 92:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

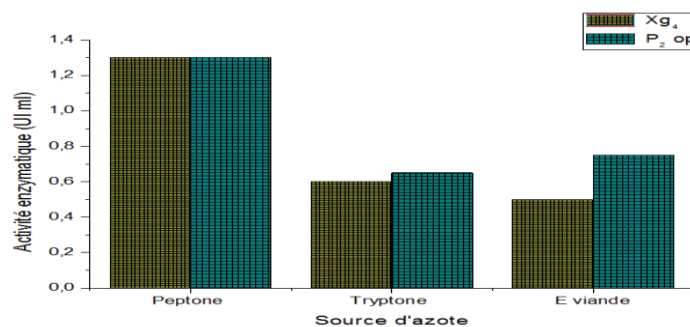


**Figure 93:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées (T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>), inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.

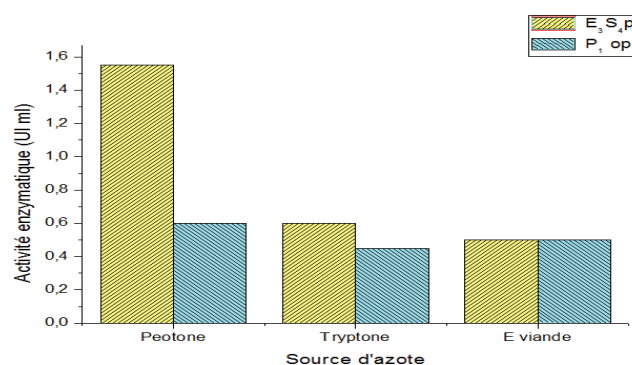




**Figure 94:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



**Figure 95:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

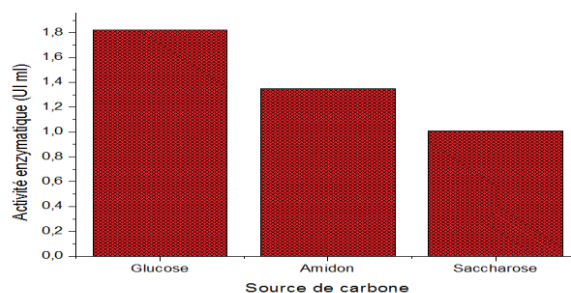


**Figure 96:** Etude de l'effet de la source d'azote sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

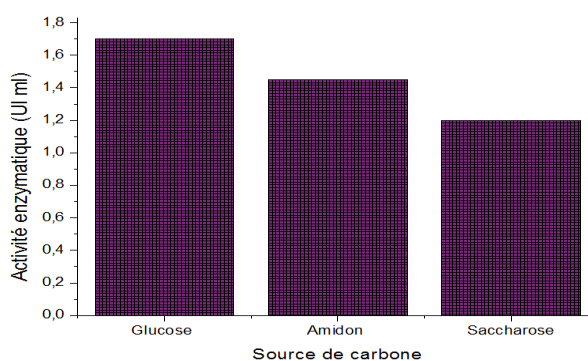
### 6.3. Etude de l'effet des différentes sources de carbone sur l'activité protéolytique

L'étude de l'influence de la source de carbone sur l'activité protéolytique est effectuée lors de l'inoculation des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase dans un milieu de culture de production contenant séparément, le glucose, l'amidon et le saccharose, incubées avec une agitation de 130 rpm à la température optimale pour chaque souche pendant 48 heures.

Les résultats de l'effet de la source de carbone sur la production de la protéase chez les souches ( $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $TB_{2op}$ ,  $T_2'$ ,  $AH_2(-2)$ ,  $Xg_4$ ,  $P_{2op}$ ,  $E_3S_3P$ ,  $H_1(-6)$ ,  $NB_{1op}$ ,  $Y_4$ ,  $LV_2$ ,  $E_3S_4P$ ,  $E_3S_1IBN$  et  $P_{1op}$ ) lors de l'utilisation du glucose et d'amidon ont montré une production maximale de (1,69, 1,43, 1,55, 1,82, 1,66, 1,30, 1,40, 1,68 1,70, 1,44, 1,35, 0,85, 1,4, 1,51 et 0,85 UI/ml) respectivement (Figures 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104).

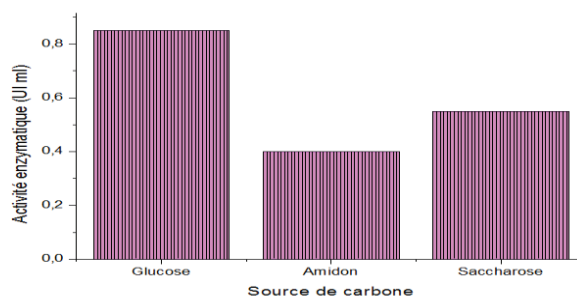


**Figure 97:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $T_2'$ , inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

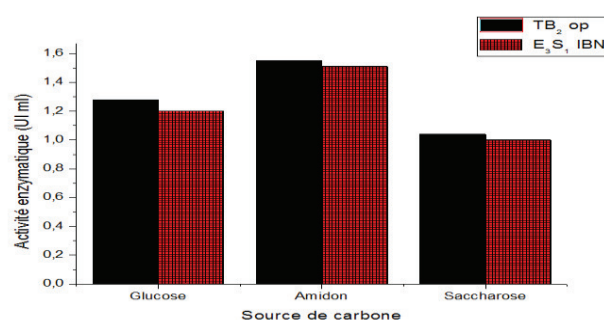


**Figure 98:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $H_1(-6)$ , inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.

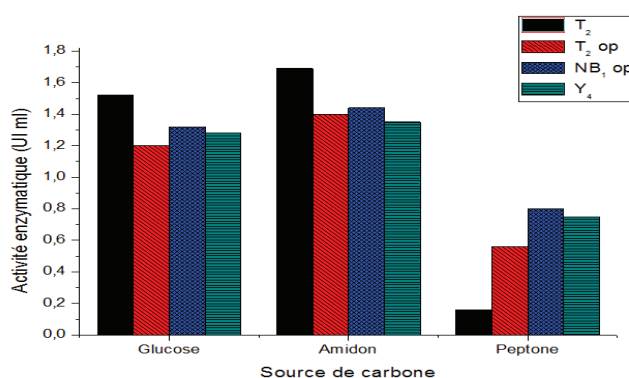




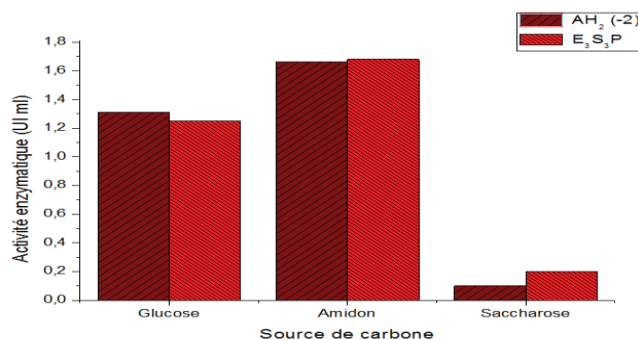
**Figure 99:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique la chez souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.



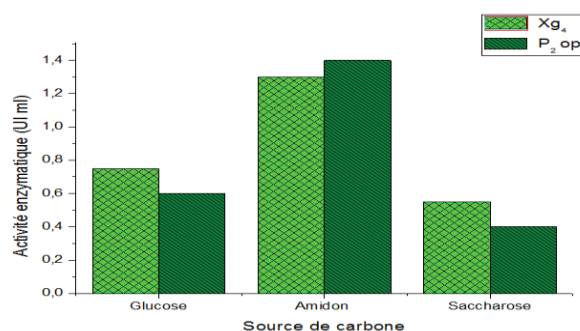
**Figure 100:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



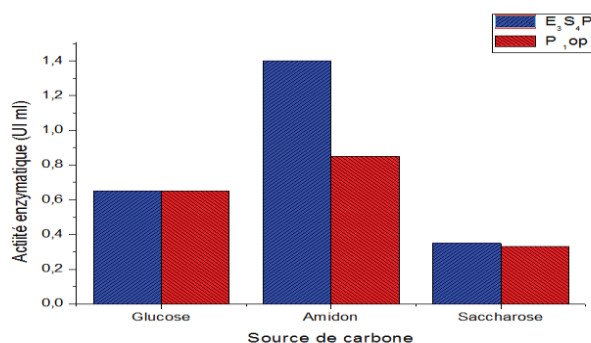
**Figure 101:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées (T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>), inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.



**Figure 102:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



**Figure 103:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

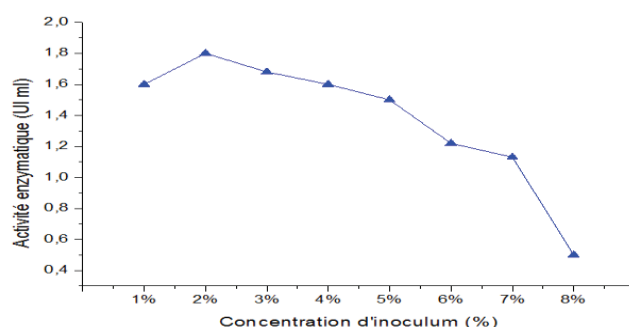


**Figure 104:** Etude de l'effet de la source de carbone sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

#### 6.4. Etude de l'effet de l'inoculum sur l'activité protéolytique

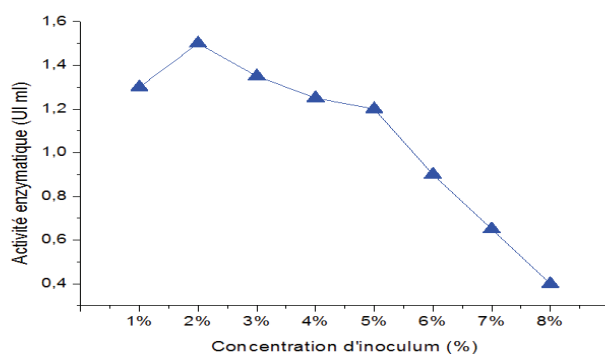
Dans le but d'optimiser la quantité de protéases produite dans le surnageant, les souches isolées, sélectionnées sont inoculées dans un milieu de production à différentes concentrations d'inoculum, incubées avec une agitation de 130 rpm à la température optimale pour chaque souche pendant 48 heures.

Les résultats obtenus de l'effet de la concentration d'inoculum sur la production de la protéase chez les souches ( $T_2$ ,  $T_{2op}$ ,  $TB_{2op}$ ,  $T_2'$ ,  $AH_2(-2)$ ,  $Xg_4$ ,  $P_{2op}$ ,  $E_3S_3P$ ,  $H_1(-6)$ ,  $NB_{1op}$ ,  $Y_4$ ,  $LV_2$ ,  $E_3S_4p$ ,  $E_3S_1IBN$  et  $P_{1op}$ ) lors de l'utilisation d'une concentration de 2%, ont montré une production maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) respectivement (Figures 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112).



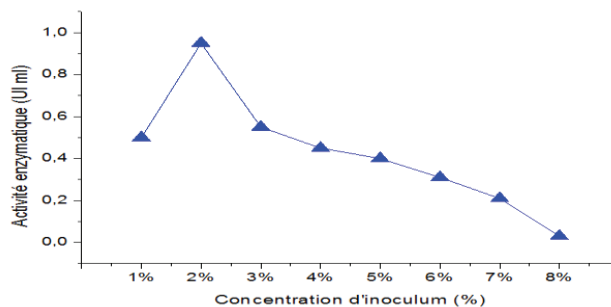
**Figure 105:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité

protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $T_2'$ , inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

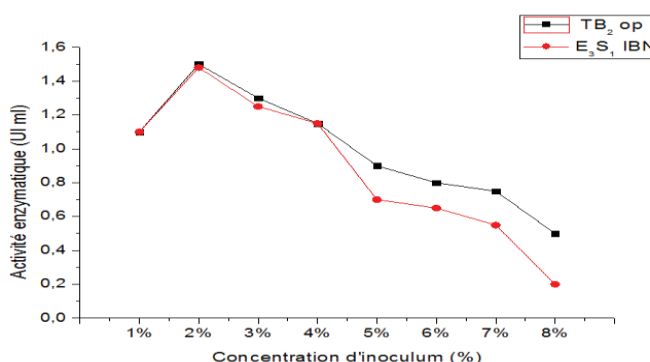


**Figure 106:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité

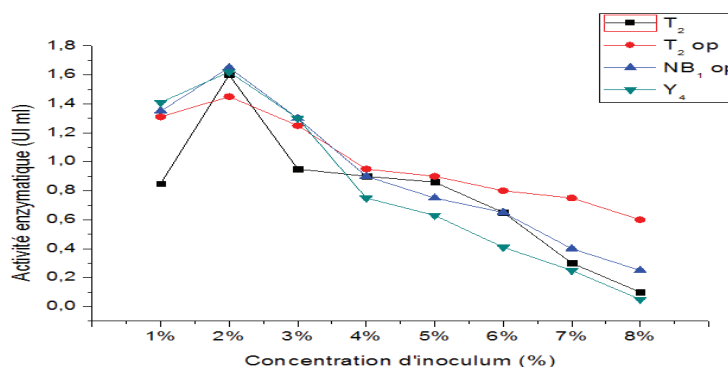
protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée  $H_1(-6)$ , inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 45°C pendant 48 heures.



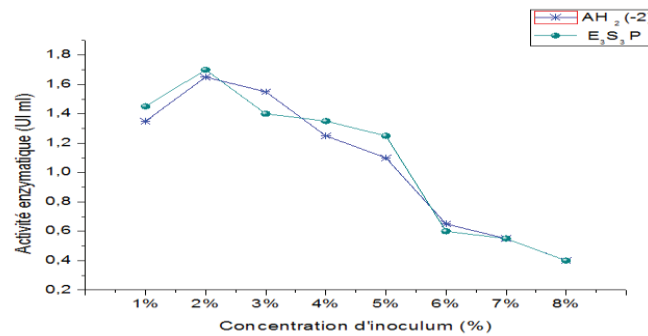
**Figure 107:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez la souche isolée, sélectionnée LV<sub>2</sub>, inoculée sur milieu de production, incubée avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



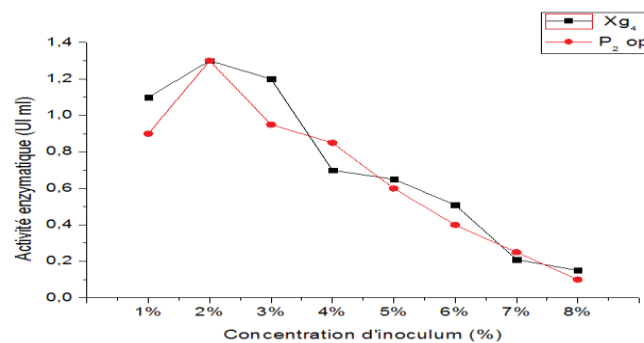
**Figure 108:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées TB<sub>2</sub>op et E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



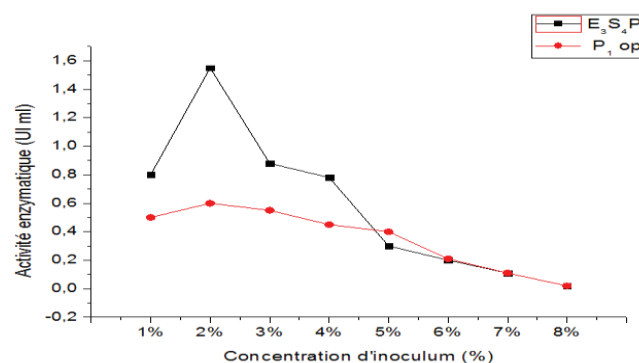
**Figure 109:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées T<sub>2</sub>, T<sub>2</sub>op, NB<sub>1</sub>op et Y<sub>4</sub>, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 35°C pendant 48 heures.



**Figure 110:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées AH<sub>2</sub> (-2) et E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.



**Figure 111:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées Xg<sub>4</sub> et P<sub>2</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

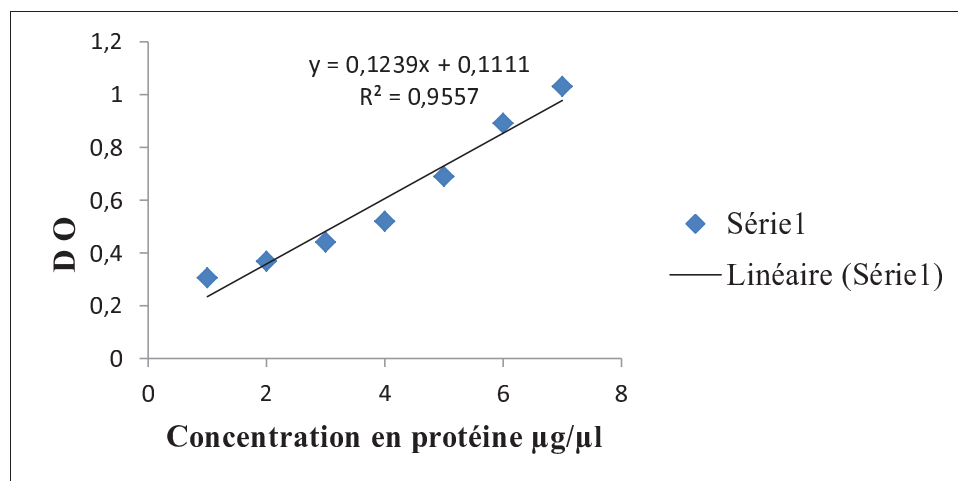


**Figure 112:** Etude de l'effet de la concentration d'inoculum sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées et E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et P<sub>1</sub>op, inoculées sur milieu de production, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures.

## 7. SDS-PAGE et analyse de la protéase

### 7.1. Dosage des protéines

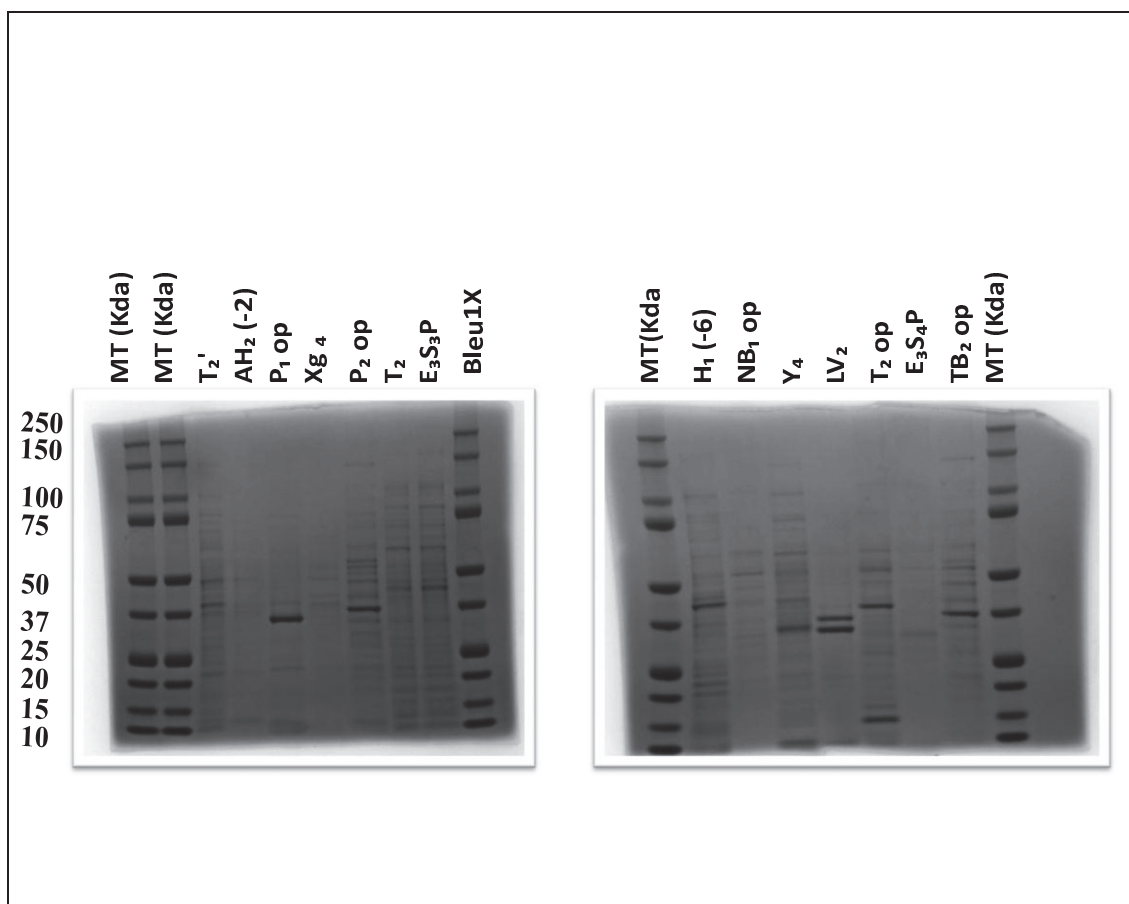
La courbe d'étalonnage est initialement préparée par l'utilisation du sérum albumine bovin (BSA 1  $\alpha$ ) comme standard, la formule de la droite obtenue est  $y = 0,094x + 0,324$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,995 dont : y est la DO à 570 nm et x est la concentration de la protéine recherchée (Figure 110).



**Figure 113:** Courbe d'étalonnage standard du dosage des protéines préparées par la méthode de Bradford avec l'utilisation du sérum albumine bovin (BSA 1  $\alpha$ ).

### 7.2. Electrophorèse par SDS-PAGE

L'homogénéité et le poids moléculaire des protéases produites par les souches isolées, sélectionnées, sont mis en évidence par SDS-PAGE. Les souches (**T<sub>2</sub>**, **T<sub>2op</sub>**, **TB<sub>2op</sub>**, **T<sub>2'</sub>**, **AH<sub>2</sub>** (-2), **Xg<sub>4</sub>**, **P<sub>2op</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **H<sub>1</sub>** (-6), **NB<sub>1op</sub>**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p** et **P<sub>1op</sub>**) ont montré différentes bandes protéiques correspondant à des poids moléculaires de (35, 37, 49, 45, 52, 37, 40, 38, 40, 50, 36, 42, 55 et 35 Kda) respectivement, présentant seulement une bande par électrophorèse sur gel suggérant que les protéines purifiées sont homogènes (Figures 111).



**Figure 114:** Représentation photographique du profil protéique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase. (Colonnes 1 et 2: Marqueur de taille (Dual Color Biorad), colonne 3: la souche  $T_2'$ , colonne 4: la souche  $AH_2(-2)$ , colonne 5: la souche  $P_{1op}$ , colonne 6: la souche  $Xg_4$ , colonne 7: la souche  $P_{2op}$ , colonne 8: la souche  $T_2$ , colonne 9: la souche  $E_3S_3P$ , colonne 10: BleuX, colonne 11: marqueur de taille, colonne 12: la souche  $H_1(-6)$ , colonne 13: la souche  $NB_{1op}$ , colonne 14: la souche  $Y_4$ , colonne 15: la souche  $LV_2$ , colonne 16: la souche  $T_{2op}$ , colonne 17: la souche  $E_3S_4P$ , colonne 18: la souche  $TB_{2op}$ , colonne 19: marqueur de taille).

# **DISCUSSION GENERALE**

---



### Discussion

L'objectif de cette présente étude est l'isolement et la caractérisation d'une large gamme de bactéries productrices de la protéase à partir des sols riches en protéines de la région de Chlef, située en Ouest de l'Algérie.

Les prélèvements effectués ont permis l'isolement de bactéries à Gram positif et négatif, sporulés et non sporulés capables de produire des protéases.

Différentes stratégies d'isolement sont effectuées pour la sélection des bactéries protéolytiques appartenant à différents genres. De nombreux travaux réalisés sont portés en grande partie sur la production d'enzymes à partir des bactéries à Gram positif, dont les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont les plus ciblées grâce à leur pouvoir protéolytique important.

Vu l'indisponibilité des milieux de culture sélectifs adéquats destinés pour l'isolement des bactéries sporulées, le choc thermique constitue une stratégie de base pour la sélection de ce groupe bactérien par l'élimination des formes végétatives et la stimulation du développement des spores (formes de résistance) (Lynn et al., 1999). A cet effet, les milieux de culture gélosés et TGEA, additionnés à une concentration de 1% de lait écrémé sont utilisés pour l'isolement des bactéries productrices de la protéase (Patel, 1985).

Le criblage primaire effectué selon la méthode décrite par (Facklam et al., 1989 ; Denizci et al., 2008; Mukhtar et Haq 2008; Olajuyigbe et Ajele 2008; Chekireb et al., 2009; Kalaiarasi et Sunita 2009), à partir de différents sols riches en résidus protéiques a permis l'isolement de 115 souches dotées d'un pouvoir protéolytique.

L'étude phénotypique et l'identification préliminaire du genre basée essentiellement sur la détermination des caractéristiques morphologiques, la coloration de Gram, la présence de catalase et d'oxydase, l'étude du type respiratoire, la mobilité et la sporulation ont révélé l'appartenance des souches isolées au genres, *Bacillus* (Emanuel et al., 2009), *Lysinibacillus* (Min et al., 2012), des souches de lactobacilles (Dellagio et al, 1994), *Enterococcus* (Facklam et al., 1989), *Enterobacter* (Stets et al., 2013; Berrazeg et al., 2013), et *Pseudomonas* (Palleroni et al., 1984; Jacques, 1994; Bossis, 1995) (Tableau 11).

Les souches isolées, productrices de la protéase sont purifiées par des repiquages successifs, conservées dans un bouillon BHIB glycérolé à une concentration de 30% à (-20°C) (Badis et al., 2005; Gallagher et Wiley, 2008).

L'ensemencement des souches isolées par strie ou par spot sur la surface du milieu de culture gélosé, à base d'une concentration de 1% de lait écrémé a montré une importante activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées (**TB<sub>2op</sub>, Xg<sub>4</sub>, P<sub>1op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, AH<sub>2</sub>(-2), P<sub>2op</sub>, T<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, T<sub>2op</sub>, T<sub>2</sub>', H<sub>1</sub>(-6), LV<sub>2</sub>, NB<sub>1 op</sub> et Y<sub>4</sub>)** traduite par la formation des zones d'hydrolyse de diamètres de (**40, 40, 39, 39, 38, 38, 38, 38, 37, 36, 36, 36, 34, 32 et 32 mm**) respectivement.

La valeur du diamètre est un paramètre intéressant pour l'évaluation de la capacité des souches sélectionnées à produire des protéases sur milieu de culture solide (**Chantawannakul, 2002**).

Les résultats obtenus ont largement excédé les valeurs rapportées par **Olajuyigbe (2005)** qui a trouvé que sur dix-huit isolats de *Bacillus*, les souches *B. licheniformis* et *B. cereus* présentent un diamètre d'hydrolyse important de (45 et 41 mm) respectivement.

**Lakhal (1997)** a montré que le diamètre de dégradation entourant la colonie de *B. amyloliquefaciens* considérée comme souche hautement protéolytique, est de 36 mm ce qui concorde avec nos résultats.

Des études antérieures réalisées par **Ahmed et al., (2007)** ont rapporté que les espèces appartenant au genre *Lysinibacillus* sont capables de produire des protéases, dont le diamètre de la zone d'hydrolyse est de 28 mm. Par ailleurs, **Sharipova et ces collaborateurs (2000)** ont suggéré que *B. subtilis* K<sub>138</sub> a manifesté une excellente activité protéolytique avec une zone d'hydrolyse de 38 mm de diamètre.

**Sokol et ces collaborateurs (1979)** ont considéré que la souche *Pseudomonas aeruginosa* PKS-1 cultivée sur milieu de culture BHI, additionnée au lait écrémé, incubée à 30°C pendant 24 heures, est hautement protéolytique avec une zone d'hydrolyse de 35 mm de diamètre.

Des études antérieures réalisés par **Cano (2009)** ont rapporté que les serines protéases produites chez les espèces du genre *Enterobacter* ont contribué à la formation d'une zone d'hydrolyse d'un diamètre de 25 mm, cette valeur est inférieure à celle trouvée dans notre recherche.

Des études comparatives sur la protéolyse chez les genres *Enterococcus* et *Lactobacillus* ont montré une importante activité protéolytique, traduite par la formation des zones d'hydrolyse de 30-35 mm de diamètre (**McSweeney et Sousa, 2000**).

Ces comparaisons peuvent mettre en valeur les résultats trouvés, puisque le rapport de l'activité enzymatique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase à celle de

chacune des souches de la littérature est supérieure, ce qui laisse à conclure que nos souches sont performantes et que les milieux utilisés sont adéquats.

Le screening secondaire des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase est focalisé sur l'évaluation de l'activité enzymatique par la méthode d'hydrolyse de la caséine sur un milieu de culture liquide (**Kunitz, 1947**).

A cet effet, l'hydrolyse de la caséine des surnageants des cultures en batch, incubées avec agitation de 130 rpm à une température de 30°C pendant 48 heures par la protéase, a libéré une quantité de tyrosine et d'autres acides aminés, mesurée à une longueur d'onde de 275 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (**Drouin M, 2005**).

Les souches (**Y<sub>4</sub>, H<sub>1</sub>(-6) NB<sub>1op</sub>, AH<sub>1</sub>(-2), E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, LV<sub>2</sub>, TB<sub>2op</sub>, P<sub>1op</sub>, P<sub>2op</sub> et Xg<sub>4</sub>)** sont dotées d'une activité maximale de (**1,25, 1,15, 1,15, 1,65, 1,65, 1,30, 1,30, 1,10, 1,62, 1,7, 1,55, 1,80, 1,48, 1,50 et 1,60 U /ml**) respectivement.

Les résultats obtenus de l'activité protéolytique des souches isolées sélectionnées ont largement dépassé les valeurs de (0,85, 0,65, 0,40 et 0,56U/ml) publiées chez (*B.lycheniformis*, *B.amyloliquefaciens*, *B.subtilis* et *Lysinibacillus macroides*) respectivement (**Fijuwara et Yamamoto, 1987 ; Amoozegara et al., 2007 ; Malek, 1995 ; Coorevits, 2012**).

Par ailleurs, **Kalaiarasi et Sunitha (2009)** ont rapporté que la production de la protéase chez *Pseudomonas aeruginosa*, cultivée sur un milieu de culture minimal, a manifesté une activité protéolytique de (1,07 U /ml). **Stanier et al., (1966)** ont suggéré que lors de l'hydrolyse de la gélatine chez *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, la production des protéases extracellulaires est remarquable avec des taux de production de (1,45 et 1,21U /ml) respectivement. Par ailleurs, cette activité protéolytique est totalement absente chez *P. putida* (**Stanier et al., 1966**).

Des études antérieures réalisées par (**Nedjai et al., 2012**) ont révélé que *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter xiangfangensis*, cultivées sur un milieu de culture de production ont montré une activité protéolytique de (0,1 U /ml et 0,22 U /ml) respectivement.

L'activité protéolytique constitue également une caractéristique technologique importante chez les bactéries lactiques et favorise leur prolifération dans le lait. Une protéolyse relativement faible où la présence d'une quantité importante de souches présentant un phénotype protéase négatif chez des lactobacilles issus de fromages artisanaux ou de lait cru est également rapportée par **Centeno et al., (1996)** et **Estepar et al., (1999)** et la grande majorité des souches n'ayant démontré aucune activité protéolytique détectable. Cependant, **Ben Belgacem et ses collaborateurs (2010)** ont montré que la production des protéases chez

des souches d'*Enterococcus sp*, cultivées sur milieu de culture synthétique contenant une concentration de 1% de peptone, incubées à une température de 30°C pendant 48 heures a manifesté une importante activité protéolytique de 1,7 U /ml.

Le suivi de la cinétique de croissance et la production de la protéase des souches sélectionnées appartenant au genre *Bacillus*, ont montré un faible taux de production de l'enzyme dans les premières heures de la fermentation, la production de la protéase est initialement amorcée après 3 heures d'incubation, ce qui concorde avec les travaux rapportés par (**Kunitate et al., 1989 ; Malek, 1995**) chez *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sp*. De plus, **Nascimento et Mrtins (2003)** ont montré que *Bacillus sp* grandit très vite et la formation de la protéase commence à partir de 4 heures de la croissance.

**Ward (1985)** a rapporté que la production de la protéase chez *Bacillus sp* est maximale durant la fin de la phase exponentielle de croissance. Ensuite, une réduction considérable de la production est observée après 72 heures d'incubation, ce qui est expliqué par l'utilisation de cette enzyme durant le processus de sporulation. Cependant, **Debabov (1982)** et **An Coorevits et al., (2012)** ont rapporté sur l'existence d'une relation causale entre l'absence de sporulation et la déficience en protéases extracellulaires, due probablement à l'apparition d'une mutation dans le gène structural de la protéase alcaline.

**Ahmed et al., (2007)** ont attribué la faculté d'adaptation au changement de l'environnement chez *Lysinibacillus sp* à la variété des gènes régulateurs. **Lee et al., (2012)** ont établi que le système régulateur à 2 composés varie selon l'état nutritionnel de la bactérie, en effet, son expression est stimulée par une carence en acide aminés et en phosphore (**Malek, 1995**), alors qu'un excès en glucose peut réprimer cette expression (**Heyman et Kermazyn, 1973 ; Mesadek et al., 1993**). De même, **Miwa et al., (2009)** ont rapporté qu'un milieu contenant des composés d'azote et de carbone facilement assimilable réprime la synthèse des exoprotéases chez *Lysinibacillus sp*.

La production de la protéase chez *Pseudomonas sp* est notée après 4 heures de fermentation, cette production progresse au cours de la phase exponentielle. Ensuite, une réduction significative est observée après 72 heures d'incubation, due à la mort cellulaire pendant la phase de déclin.

**Shen et al., (2008)** ont rapporté que la production de la protéase chez *P. aeruginosa* est dépendante de la densité cellulaire, l'ajout d'un surnageant issu d'une culture en phase stationnaire, réprime l'expression des gènes de la protéase d'une culture en phase exponentielle.

**Duong et al., (2001)** ont montré que les souches de *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. fluorescens* produisent des protéases seulement en phase exponentielle de croissance.

**Baba Ahmed-Kazi (2013)** a suggéré que la production de la protéase chez *Enterobacter sp* est maximale durant la phase exponentielle de croissance, avec un taux de production supérieur à 0,7 U/ml, relativement stable au cours de la phase stationnaire, où la bactérie commence à synthétiser ces propres antibiotiques pour lutter contre la concurrence et accompagnée d'une réduction considérable pendant la phase de déclin (72 heures), ces données sont en concordance avec nos résultats.

**Abdel Baky et ces collaborateurs (1986)** ont rapporté qu'une production maximale de la protéase est observée après 24 heures d'incubation chez les lactobacilles, ce qui concorde avec nos résultats obtenus. En outre, (**Accolas et Auclair, 1970 ; Chamba et Prost, 1989**) ont montré qu'une activité protéolytique maximale est notée durant la phase exponentielle chez les lactobacilles, accompagnée avec des taux de croissance différents selon les espèces.

**Guerzoni et Suzzi (2001)** ont constaté que lors de l'évaluation de la croissance chez les souches d'*Enterococcus faecium* sur un milieu de culture à base de lait écrémé, le taux de production de la protéase est de (0,70 U/ml), valeur qui est proche de nos résultats.

Les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase, manifestant une excellente activité protéolytique, sont retenues pour une éventuelle identification à l'échelle de l'espèce par la galerie biochimique API Biomerieux.

L'utilisation d'un catalogue analytique et des matrices d'identification en se référant au tableur Excel, a révélé l'appartenance des souches (**NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, TB<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, AH<sub>1(-2)</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, P<sub>1op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, P<sub>2op</sub> et Xg<sub>4</sub>**) aux espèces (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *B.lycheniformis*, *B.amyloliquefaciens* et *Bacillus sp*) respectivement.

La caractérisation phénotypique est mise en œuvre pour l'identification et la classification des souches sélectionnées, productrices de la protéase par l'utilisation de certains critères morphologiques, physiologiques et nutritionnels. Cependant, l'utilisation des propriétés phénotypiques demeure inapte pour une identification taxonomique totale et précise, ce qui explique l'insuffisance des approches phénotypiques pour la caractérisation des souches sélectionnées productrices de la protéase H<sub>1(-6)</sub> et LV<sub>2</sub>. A cet effet, l'approche moléculaire reste la technique la plus recommandée pour une identification fiable et exacte.

Les quinze souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase sont retenues pour une éventuelle identification à l'échelle moléculaire et l'analyse phylogénétique.

A cet effet, toute manipulation réussite en biologie moléculaire doit tenir en compte, le bon choix de la technique d'extraction d'ADN, car cette étape reste déterminante et indispensable pour la fourniture d'un matériel génétique de bonne qualité (**Ahaotu et al., 2013**).

**Rowland (2003)** a rapporté que la diversité des kits disponible sur le marché et la présence de différentes techniques laborieuses, ont permis l'extraction de l'ADN génomique. Cependant, la fiabilité, le temps et le coût de la manipulation ont limité leurs applications.

L'utilisation de la méthode chimique d'extraction de l'ADN par phénol chloroforme constitue une technique pertinente notamment la qualité du génome extrait, la rapidité de sa mise en évidence et son faible coût (**Acinas et al., 2004**).

**Emanuel et al., (2009)** ont rapporté que le séquençage du gène codant la sous unité 16s RNA offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région est très stable et à l'abri des mutations. Egalement, **Amann et al., (1995)** ont accordé une importance particulière à l'identification génétique des bactéries.

Avec l'accumulation des données indispensables sur ce gène et leurs publications dans les banques de données, la notion des amorces universelles de la région 16s RNA est engendrée.

L'utilisation des amorces universelles (W001, W002, W007 et W012) pour l'amplification des fragments d'ADN codant la région 16s ARN, a révélé que lors des analyses bioinformatiques, ces amorces s'hybrident avec la majorité des membres du règne bactérien (**Casanova, 2001**).

Après l'amplification des gènes codant la sous unité ribosomale 16s par la technique de la PCR et la séparation des amplifias par électrophorèse sur gel d'agarose à une concentration de 1,2%, l'alignement précis des gènes amplifiés en présence d'un biomarqueur de taille d'un poids moléculaire de 1500 bp, a montré une concordance avec les résultats rapportés par (**Wu et al., 2006 et Adley et al., 2009 ; Arzu et al., 2011**). En effet, cette catégorie de gènes est caractérisée par un fragment d'ADN d'une taille située entre 1200-1550 bp (**Coenye, et Vandamme, 2003**).

Le séquençage des gènes amplifiés, a fournis des informations cruciales sur les quinze souches sélectionnées, productrices de la protéase.

Dans un premier temps, une attention particulière est portée sur l'identité des souches sélectionnées. La comparaison des séquences nucléotidiques acquises avec la totalité des gènes séquencés et publiés dans les bases de donnée Blast et RDP Project, a montré que les

souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase appartiennent aux genres: *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et un genre de lactobacille.

Dans un second temps, l'analyse bioinformatique des données issues du séquençage, a indiqué des taux de similitude élevés avec les souches de références (**Tableau 18**).

Après l'analyse fine des séquences brutes, l'assemblage et la correction des données, les séquences sont publiées dans la base de données NCBI.

L'utilisation du séquençage des gènes codant la sous unité ribosomale 16S a permis la mise en œuvre d'une étude phylogénétique, dont l'objectif principal se rattache forcément à la distance évolutive entre les différentes espèces bactériennes et la divergence des séquences nucléotidiques, qui se reflète sur le phénotype. La construction de l'arbre phylogénétique est fortement liée au type du gène à amplifier (**Fukushima, 2002**).

Les séquences nucléotidiques forment un groupe dit «Cluster ». De ce fait, la méthode Neighbor joining, choisie pour le calcul des distances évolutives séparant les séquences homologues, a permis la construction des arbres phylogénétiques sans racine à partir d'un indice d'écart (par exemple distance ou dissimilarités entre les séquences).

Cette approche est basée sur le principe, lorsque les deux séquences homologues sont différentes, la distance évolutive est grande. A l'opposé, lorsque les séquences sont divergées, les deux séquences homologues sont proches, plus la distance évolutive qui les sépare est faible (**Kumar et al., 2004**).

La physiologie de production de la protéase chez les bactéries est très complexe, car elle est influencée par une large panoplie de paramètres physicochimiques. L'influence de ces différents paramètres sur la production de la protéase est étudiée.

L'effet de la durée d'incubation sur l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase (**T<sub>2</sub>**, **T<sub>2op</sub>**, **TB<sub>2op</sub>**, **T<sub>2'</sub>**, **AH<sub>2(-2)</sub>**, **Xg<sub>4</sub>**, **P<sub>2op</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **H<sub>1(-6)</sub>**, **NB<sub>1op</sub>**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4p</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN** et **P<sub>1op</sub>**) est mise en évidence. Les résultats obtenus ont montré que la meilleure production de la protéase est obtenue après 48 heures d'incubation chez la totalité des souches avec des taux de production de (**1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48, et 0,60 UI /ml**) respectivement. **Qadar et ces collaborateurs (2009)** ont rapporté que la meilleure production de la protéase chez les souches de *Bacillus sp* est observée après 48 heures d'incubation avec un taux de production de 0,7 U/ml.

A l'opposé, nos résultats diffèrent des constatations de **Cholet (2006)** qui a montré qu'une activité protéolytique maximale chez des souches de *Lactobacillus* et *Enterococcus*, cultivées

sur un milieu de culture lait écrémé pendant 92 heures, est de (0,95 et 1,01 U/ml) respectivement. Par ailleurs, **Sutra et al., (2000)** et **Berget al., (2005)** ont suggéré que les *Pseudomonas spp* fluorescents, ont manifesté une bonne activité protéolytique après 48 heures d'incubation. Cette estimation est également décrites par (**Nielsen et al., 2000; Berg et al., 2005; Botelho et Mendonça-Hagler, 2006; Hardoim et al., 2008**).

Cependant, **Nielsen et al., (2000)** ont rapporté qu'une bonne activité protéolytique chez *E.coli*, *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter sp* est obtenue après 24 heures d'incubation avec des taux de production maximales de (0,82, 0,50 et 0,55 U/ml) respectivement.

La comparaison des résultats obtenus chez les souches isolées, sélectionnées productrice de la protéase avec les travaux rapportés par (**Gupta et Beg, 2003**) a montré que l'influence du temps d'incubation sur l'activité protéolytique vari de 24-120 heures.

Parmi l'ensemble des facteurs étudiés, la température a le moindre effet sur le système protéolytique chez les souches sélectionnées. Ce qui concorde avec la plupart des données bibliographique consultés.

**Fujiwara et Yamamoto, (1987)** ont rapporté que la température de 30°C, est optimale pour la production d'une importante quantité de protéases chez la souche acidophile de *Bacillus sp*, ce qui concorde avec nos résultats. De même **Fujiwara et al.,(1991)** ont rapporté que la température optimale de production de la protéase est de 55°C chez les souches thermophiles. **Haoet al., (1988)**, ont rapporté que la température élevée altère la membrane cytoplasmique, et empêche la libération des exoenzymes dont les protéases.

**Vahmaanpera et al ., (1987) et Castro et al., (1993)** ont montré que la production de la protéase chez *B. amyloliquefaciens* est optimale à une température de 37°C.

Par ailleurs, **An Coorevits et ces collaborateurs (2012)** ont montré que la production de la protéase chez *Lysinibacillus macroides* est optimale lors de l'incubation à une température de 60°C. A l'opposé, la production de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase appartenant à la même espèce est optimale à une température de 35°C.

**Stanier et al., (1966)** ont caractérisé une protéase neutre, élaborée par *P.aeruginosa* et *P. fluorescens*, incubée à une température de 32°C. Par ailleurs, **Ghorbel et al., (2003)** ont rapporté que le taux de production de la protéase à des températures élevées est l'un des facteurs responsables de l'inhibition de l'activité de cette enzyme.

Cependant, **Guerzoni et Suzzi, (2001)** ont constaté que l'activité protéolytique de certaines bactéries lactiques, est fortement liée à l'augmentation de la température d'incubation.



Par contre, l'activité protéolytique chez les souches isolées, sélectionnées d'*Enterococcus faecium* et *Enterococcus faecalis*, est optimale à une température de 35°C.

Des travaux antérieurs réalisés par (Raynod, 2006) ont montré que l'augmentation de la température chez des souches de lactobacilles, favorise leur activité par amélioration de la synthèse d'enzymes protéolytiques. Hugenholz et al., (1987) et Monnet et al., (1987) ont rapporté que l'activité protéolytique des souches appartenant au groupe des lactobacilles est fortement dépendante de la présence des protéases extracellulaires, dont la production est soumise à un système de régulation complexe.

De même, la production maximale de la protéase chez des souches d'*Enterobacter sp* est observée après 24 heures d'incubation à une température de 30°C, ce qui concorde avec nos résultats.

Hashemi et ses collaborateurs., (2010) ont rapporté que la résistance à la température, est l'un des principaux paramètres recherchés par les acteurs de l'industrie des enzymes, notamment les protéases. En outre, Shukla et Brett (2013) ont montré que ce critère de choix, a considérablement encouragé les chercheurs à isoler des microorganismes capables de produire des enzymes d'un grand intérêt industriels.

L'étude de l'effet de la valeur du pH des milieux de culture sur la production de la protéase chez les souches isolées, sélectionnées, a montré que les optimums de pH varient considérablement d'une souche à l'autre. Le meilleur taux de production est observé lors de l'inoculation des souches sur un milieu de culture synthétique à des pH de (5,5-6,6, 5,5, 8,7,5 et 7-7,5) chez les souches (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus macroides*, *Pseudomonas sp* et *Bacillus sp*) respectivement.

(Brafoed, 1981; Ward, 1983) ont rapporté que le pH module la production de la protéase, ainsi, un environnement alcalin favorise la production des protéases alcalines par des espèces alcalophiles, de même, un environnement neutre favorise la production des protéases neutres par les espèces qui exigent un pH neutre pour leur croissance.

Akelet al., (2009) ont établi que le pH optimal pour la production de la protéase chez les espèces du genre *Bacillus* est de 7,5, ce qui concorde avec nos résultats. Une étude antérieure réalisée par Naidu et Devi (2005) sur l'optimisation des protéases alcalines chez *Bacillus sp*, a montré que l'activité protéolytique atteint un maximum de 3,7 U/ml à pH 9. Ahmed (2007) a rapporté qu'un optimum d'activité protéolytique, est obtenu lorsque le milieu de production est ajusté à un pH de 8 chez les espèces du genre *Lysinibacillus*.

**Sutra et ses collaborateurs., (2000)** ont montré que la stabilité enzymatique chez des souches de *Pseudomonas sp* fluorescents, est dans une gamme de pH 7-7,5.

**Chun Tao Gu et ses collaborateurs., (2014)** ont rapporté sur des activités protéolytiques optimales à des valeurs de pH de 3,5-6,5, chez la souche d'*Enterobacter xiangfangensis sp*, de ce fait notre souche tient dans cet intervalle.

**Zourari et Desmazeaud (1991)** ont montré que les bactéries lactiques sont largement affectées par le pH et se développent dans une gamme de (5,5-6,2), les autres facteurs en interaction ont un effet quasiment nul.

Le pH a un impact positif sur l'activité protéolytique chez les souches des lactobacilles et *Enterococcus* isolées, sélectionnées, cela suppose que l'effet de ce facteur sur l'activité des enzymes protéolytiques, soit très important dans la régulation du métabolisme protéique.

Ces caractéristiques appréciables ont constitué une piste prometteuse pour la mise en application de telles auxiliaires dans de nombreux processus industriels telle que la production des détergents pour lessives, car cette industrie exige l'utilisation des protéases à des valeurs de températures très élevées et des pH alcalins (**Ward, 1985**).

L'optimisation des conditions de cultures comme: la source d'azote et de carbone, la concentration de caséine et la concentration de l'inoculum, pour une meilleure production de la protéase par les souches isolées, sélectionnées a constitué un objectif primordial dans cette étude.

L'effet des différentes sources de carbone sur la croissance et la production de la protéase chez les souches (**T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, AH<sub>2</sub> (-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN, et P<sub>1op</sub>**) dans un milieu de culture synthétique, a montré que le meilleur taux de production, est obtenu lors de l'utilisation d'amidon comme source de carbone à une concentration de (1g/l), avec des activités protéolytiques de (**1,69, 1,43, 1,55, 1,66, 1,30, 1,40, 1,68, 1,44, 1,35, 1,4, 1,51 et 0,85 UI /ml**) respectivement.

Par contre, l'activité protéolytique est maximale lors de l'utilisation du glucose à une concentration de (1g/l) chez les souches sélectionnées (**T<sub>2</sub>' , H<sub>1</sub>(-6) et LV<sub>2</sub>**), avec des taux de production maximales de (**1,82, 1,70 et 0,85 UI /ml**) respectivement.

(**Hanlon et al., 1982; Kole et al., 1988; Kole et al., 1988; Kaur et al., 2001**) ont rapporté que la production des protéases extracellulaires chez les microorganismes, est fortement influencée par la variation des éléments nutritifs tels que le rapport C/N, la présence des sucres facilement métabolisables comme le glucose (**Ferrero et al., 1996 ; Gupta et al., 2002**) et les ions métalliques ( **Varela et al., 1996**). En outre, (**Nehete et al., 1985; Hameed**

et *al.*, 1999 ; Oberoi et *al.*, 2001 ; Gupta et *al.*, 2002) ont montré que plusieurs autres facteurs tels que l'aération, la densité de l'inoculum, le pH, la température et le temps d'incubation peuvent interagir.

Ho et *al.*, (2005) ont établi que le phosphate d'ammonium et le cellobiose, induisent la production de la protéase chez *Enterobacter cloacae* lorsqu'ils sont utilisés comme source d'azote et de carbone, respectivement. Ce résultat concorde avec les constatations de (Kanekar et *al.*, 2002; Chi et Zhao., 2003 ; Beg et *al.*, 2003 ), qui ont montré que différentes sources de carbone influent la production d'enzymes extracellulaires d'une souche à l'autre.

Heyrman et *al.*, (2005) ont trouvé qu'une concentration de 0,1% de glucose est adéquate pour une bonne activité protéolytique (0,85 U/ml) chez une souche de *Lysinibacillus sp.*

L'ajout du saccharose est accompagné d'une faible production de la protéase (0,51 U/ml).

Arizcun et *al.*, (1997) ont trouvé que l'amidon et le glucose ont un effet positif sur la synthèse de la protéase chez des espèces du genre *Enterococcus*, cependant le saccharose et le lactose ont un effet moins important (Batish et Ranganathan,1984).

Par ailleurs, Tourneuret *al.*, (1972) ont rapporté que la meilleure source de carbone pour la production de la protéase chez les bactéries lactique, est le lactose.

Des études antérieures réalisées par Braudet *al.*, (2010) sur la production de la protéase chez *Pseudomonas fluorescens*, cultivée sur un milieu de culture synthétique, additionnée de différentes source de carbone, a montré que l'amidon a induit une activité maximale de 0,7 U/ml.

Les sources d'azote peuvent être des substances simples comme les acides aminés (Millet et Aubert, 1969; Priest, 1977; Priest, 1981). Les sels d'ammonium peuvent être utilisés comme source d'azote (Fijuwara et *al.*, 1989). Certaines protéines (caséine, gluten) ou des substances complexes contenant de l'azote telles que la poudre de muscle (Proth et *al.*, 1976), l'extrait de levure, peptone et le corn steep liquor sont également utilisés (Vehmaanpera, 1990; Dercova et *al.*, 1992).

L'utilisation du peptone comme source d'azote à une concentration de 1%, est considéré comme un excellent substrat pour une bonne production de la protéase avec des taux de production de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI/ml) chez les souches (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et P<sub>1op</sub>) respectivement.

La substitution du peptone par l'extrait de viande dans le milieu de culture, a augmenté considérablement l'activité protéolytique de (1,39, 1,33, 1,42, 0,89, 0,75, 0,85, 0,85, 0,82,

0,65, 0,50, 1,30 et 0,50 U/ml) chez les souches (**T<sub>2</sub>**, **TB<sub>2op</sub>**, **T<sub>2</sub>'**, **AH<sub>2</sub> (-2)**, **P<sub>2op</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **NB<sub>1op</sub>**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub> p**, **E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> IBN** et **P<sub>1op</sub>**) respectivement.

Par ailleurs, un faible taux de production de la protéase de (0,49, 0,60 et 0,60 U/ml) est observé lors de l'utilisation du tryptone chez les souches sélectionnées (**T<sub>2op</sub>**, **P<sub>2op</sub>** et **H<sub>1(-6)</sub>**) respectivement. **Sangeetha et al., (2010)** ont rapporté que l'utilisation du peptone à une concentration de 0,5% chez *B. licheniformis*, a manifesté une importante activité protéolytique (0,8U/ml).

**Thomas et Mills (1981)** ont montré que la production de la protéase chez les bactéries lactiques est maximale lors de l'inoculation du milieu de culture synthétique, contenant une concentration de 3% de tryptone et 1% d'extrait de viande, après 48 heures d'incubation.

L'optimisation de la concentration de caséine utilisée comme substrat de la protéase, est mise en évidence, lors de l'utilisation d'un milieu de culture de production contenant le peptone comme source d'azote, en présence de différentes concentrations de caséine (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 0,6%). La lecture des résultats a montré qu'une activité protéolytique maximale est obtenue lors de l'utilisation d'une concentration de 0,1% de caséine comme source de protéines. Les rendements obtenus sont de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI /ml) chez les souches (**T<sub>2</sub>**, **T<sub>2op</sub>**, **TB<sub>2op</sub>**, **T<sub>2</sub>'**, **AH<sub>2</sub>(-2)**, **Xg<sub>4</sub>**, **P<sub>2op</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **H<sub>1(-6)</sub>**, **NB<sub>1op</sub>**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub> p**, **E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> IBN** et **P<sub>1op</sub>**) respectivement.

Des travaux antérieurs réalisés par **Bibilos et ces collaborateurs (1988)** ont montré qu'une production maximale de la protéase, est obtenue en présence d'une concentration de 0,6% de caséine. Cette divergence de production peut être expliquée par la dissemblance des souches utilisées. En outre, la protéase est une enzyme inductible, généralement induite en présence de caséine et ses dérivés hydrolysés (**Drahovska et al., 2002**). Par ailleurs, **Xu et al., (2003)** ont rapporté que la production de la protéase est également soumise à une répression catabolique en présence du fructose et d'autres sucres. Par ailleurs, l'utilisation d'une concentration élevée de caséine dans le milieu de culture, a réprimé d'une façon inversement proportionnelle la production de la protéase.

L'effet de la concentration en biomasse, sur la production de la protéase est étudié, en inoculant le milieu de production avec différentes concentrations allant de 1 à 8%. Les résultats obtenus ont montré qu'une activité protéolytique maximale de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI /ml) est observée après inoculation de 2% d'inoculum, chez les souches (**T<sub>2</sub>**, **T<sub>2op</sub>**, **TB<sub>2op</sub>**, **T<sub>2</sub>'**, **AH<sub>2</sub>(-2)**, **Xg<sub>4</sub>**, **P<sub>2op</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P**, **H<sub>1(-6)</sub>**, **NB<sub>1op</sub>**, **Y<sub>4</sub>**, **LV<sub>2</sub>**, **E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>p**, **E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN** et **P<sub>1op</sub>**) respectivement.

L'activité enzymatique a diminué progressivement à partir de 3 à 8%. Ces résultats sont en conformité avec les travaux de **Elibol et al., (2005)** qui ont établi que le niveau d'inoculum de 2,5% contribue à une bonne production de la protéase.

(**Mabrouk et al., 1999; Kanekar et al., 2002 ; Heyrman et al., 2005**) ont rapporté que la concentration d'inoculum de 2-5% est optimale chez les souches appartenant au genre *Bacillus* et *Lysinibacillus*. En outre, **Tourneur et al., (1972)** ont rapporté que la concentration d'inoculum de 2-6%, est optimale chez les bactéries lactiques, ce qui concorde avec nos résultats obtenus.

Cependant, **Fridlender et ses collaborateurs (1993)** ont suggéré que l'utilisation d'une concentration d'inoculum de 1% est optimale dans la production de la protéase chez les souches de *Pseudomonas sp*, ce qui s'oppose avec nos résultats obtenus.

L'utilisation de la technique d'électrophorèse SDS-PAGE a permis la détermination de l'homogénéité et le poids moléculaire des extraits bruts (protéines de la paroi cellulaire) chargés sur un gel de polyacrylamide.

La révélation des fragments protéiques par le bleu de Coomassie, a permis la visualisation de bandes protéiques claires et bien distinctes (**Figure 116**). Les colonnes MT ont représenté le marqueur de taille, contenant des protéines de poids moléculaires de 10-250 kDa. Trois groupes de bandes avec des mobilités différentes sont démembrés :

- ✓ Groupe des bandes lentes : mobilité de 10 à 50 kDa.
- ✓ Groupe des bandes intermédiaires : mobilité de 50 à 100 kDa.
- ✓ Groupe des bandes rapides : mobilité de 100 à 250 kDa.

L'analyse des 14 bandes protéiques des souches sélectionnées productrices de la protéase, a montré un profil électrophorétique constant, formé de deux zones de mobilité électrophorétique différentes : une zone avec faible mobilité est représentée par des bandes de (35, 36, 37,38, 40 et 45 kDa), leur mobilité dépasse de loin les bandes de (49 et 50 kDa) dans le gel. La deuxième zone est intermédiaire et localisée entre les bandes de (50 et 100 kDa) du marqueur de taille.

Par analogie avec les profils électrophorétiques de références, les zones dont la mobilité est faible, sont probablement celles des souches du genre *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* et des lactobacilles. Ces résultats sont semblables à ceux de **Macwanaet al., (2012)** où le poids moléculaire d'une protéine purifiée et dialysée à partir d'une souche d'*Enterococcus faecium* est de 32 kDa. Egalement, **Khan et al.,(1996)** ont montré la présence de 45 bandes protéiques de différents poids moléculaires (14,3-340 kDa)

lors de l'analyse effectuée par SDS-PAGE, des protéines totaux chez *Pseudomonas aeruginosa*. De même, des travaux antérieurs réalisés par **Dominique et al.,(2007)** ont rapporté que la protéine LasB chez la même espèce, présente un poids moléculaire de 39 kDa. **Malkov, 1991; Ooi et Kikuchi, 1995)** ont montré la présence de bandes protéiques purifiées de (40, 39 kDa) chez les souches de *Bacillus sp* et *Bacillus subtilis* respectivement, ce qui concorde avec nos résultats obtenus.

**Chenet al., (2000)** ont établi que la souche *Bacillus subtilis* a présenté une bande protéique de 55 kDa, ce donné se rapproche de nos résultats.

**Gattiet al., (2001)** ont rapporté sur la caractérisation de différents profils protéiques de la paroi cellulaire chez les espèces *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* par SDS-PAGE qui ont montré la présence des bandes de (38 et 18-21 kDa) respectivement.

# CONCLUSION

---

### Conclusion

L'utilisation des enzymes microbiennes a permis le remplacement des produits chimiques utilisés dans les industries (blanchiment du papier) ou à domicile (solution nettoyante à base de produits chimiques), ce qui a empêché le rejet des substances chimiques néfastes dans l'environnement. De ce fait, les protéases ont suscité un intérêt majeur grâce à leur importance biotechnologique et leur utilisation potentielle dans de nombreux secteurs tel que: les domaines agroalimentaire et médicale, les industries des détergents, des textiles ...etc.

Les principaux objectifs tracés pour la réalisation de ce présent travail sont d'une part : l'isolement et la caractérisation d'une large gamme de bactéries dotées d'une excellente activité protéolytique et l'optimisation des différents paramètres impliqués dans la bonne production de cette enzyme. D'une autre part, l'étude de l'influence des facteurs physicochimiques sur l'activité et la stabilité des protéases, afin d'évaluer l'influence de chaque facteur sur le taux de production, ainsi l'identification moléculaire et l'analyse phylogénétique des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase.

Le criblage primaire a permis l'isolement de 115 souches bactériennes appartenant aux différents genres. Après le screening secondaire, 15 souches témoignant d'une bonne activité protéolytique sont sélectionnées.

L'optimisation de quelques paramètres de culture, a amélioré considérablement la production de la protéase chez les souches (T<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, TB<sub>2op</sub>, T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P, E<sub>3</sub>S<sub>1</sub>IBN et P<sub>1op</sub>) après 48 heures d'incubation lors de leur inoculation sur un milieu de culture de production contenant: 1g/l glucose, 1g/l amidon, 1g/l caséine, 1% peptone et 2% d'inoculum, avec des activités maximales de (1,60, 1,45, 1,50, 1,80, 1,65, 1,30, 1,30, 1,70, 1,50, 1,65, 1,62, 0,95, 1,55, 1,48 et 0,60 UI /ml) respectivement.

Les études visant à déterminer l'effet de la température d'incubation sur l'activité protéolytique ont indiqué que la plupart des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase sont mésophiles à l'exception de la souche H<sub>1</sub> (-6) qui est thermophile comme la plupart des bactéries lactiques.

Les souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase (T<sub>2'</sub>, AH<sub>2</sub>(-2), P<sub>1op</sub>, Xg<sub>4</sub>, P<sub>2op</sub>, T<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P, H<sub>1</sub>(-6), NB<sub>1op</sub>, Y<sub>4</sub>, LV<sub>2</sub>, T<sub>2op</sub>, E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P et TB<sub>2op</sub>) sont identifiées génétiquement, le séquençage du gène codant la sous unité ribosomale 16S a révélé leur appartenance aux espèces (*Enterobacter xiangfangensis* Ps21, *Bacillus subtilis* SBT-014, *Bacillus cereus* SBTBC-008, *Bacillus sp* BAB 4378, *Bacillus amyloliquefaciens* B5, *Enterococcus faecium*



E745, *Bacillus sp* K2DN343, Lactobacille (Uncultured organism clone), *Enterococcus faecalis sp*, *Enterococcus faecalis* RCB443, *Lysinibacillus macroides* SPL1, *Enterococcus faecium* PSB5, *Bacillus licheniformis* BaDB01 et *Pseudomonas aeruginosa* S164S) respectivement.

En perspectives, ce travail peut être accompli par :

- Des études approfondies sur l'ingénierie des protéines pour générer des protéases avec des fonctions entièrement nouvelles.
- Le séquençage des régions d'ADN, codant la production de la protéase pour une éventuelle caractérisation afin de mieux connaître leurs propriétés physicochimiques.
- L'amélioration de production de la protéase par des méthodes du génie génétique.
- La caractérisation des sites de fixation du substrat et le site de spécificité par des mutations dirigées.
- La purification des protéases surexprimées par les différentes méthodes de la chromatographie.

# REFERENCES

---

# BIBLIOGRAPHIQUES

## Références bibliographiques

1. **Abdel-Baky A. A., El-Neshawy A. A., Rable A. M., Ashour M. M. (1986).** Heat-shocked *Lactobacilli* for accelerating flavour development of Ras cheese. Food Chemistry, 21:301-313.
2. **Accolas J. P., Auclair J. (1970).** Détermination de l'activité acidifiante des suspensions concentrées congelées de bactéries lactiques. Le Lait, 609-626.
3. **Acinas S. G., Marcelino L. A., Klepac-Ceraj V., Polz M. F. (2004).** Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. Int. Bacteriol., 9:2629-2635.
4. **Adley C., Khalil A., Camila M., Kamila O., Vijayalakshmi V. (2009).** Design of specific DNA primers to detect the *Bacillus cereus* group species. IEEE Sensors Applications Symposium, 9:17-19.
5. **Aehle W., Sobek H., Amory A., Vetter R., Wilke D et Schomburg D. (1993).** Rational protein engineering and industrial applications: structure prediction by homology and rational design of protein-variants with improved « washing-performance » - The alkaline protease from *Bacillus alcalophilus*. J. Biotechnol., 28:31-40.
6. **Afia G., Shahida H . (2010).** Purification and characterization of an Extracellular protease from *Bacillus subtilis* EAG-2 Strain Isolated from ornamental plant Nursery. Polish. Journal Of Microbiology, 59(02):107-112.
7. **Ahaotu A., Anyogu C., Njoku B., Odu B., Sutherland C., Ouoba L. (2013).** Molecular identification and safety of *Bacillus* species involved in the fermentation of African oil beans (*Pentaclethra macrophylla* Benth) for production of Ugba. International Journal of Food Microbiology, 162:95-104.
8. **Ahmed I., Yokota A., Yamazoe A., Fujiwara T. (2007).** Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. And *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57:1117-1125.
9. **Akel H., Quaden F., Youcef T. K. (2009).** Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic *Bacillus* Strain HUTBS71. European Journal of Scientific Research, 31(2):1450-216.
10. **Akkermans., et al.( 1996).** Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov), the bacterium causing canker of hazelnut (*Corylus avellana* L.). Syst. Appl. Microbiol., 19: 589-595.

11. **Alais C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. Masson. Paris, 108-645.
12. **Albert R. A., Archambault J., Lempa M., Hurst B., Richardson C., Gruenloh S., Duran M., Worliczek H. L., Huber B. E. (2007).** Proposal of *Viridibacillus* gen. nov. and reclassification of *Bacillus arvi*, *Bacillus arenosi* and *Bacillus neidei* as *Viridibacillus arvi* gen. nov., comb. nov., *Viridibacillus arenosi* comb. nov. and *Viridibacillus neidei* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 2729-2737.
13. **Alcorn J. F., Wright J. R. (2004).** Degradation of pulmonary surfactant protein d by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. J. Biol. Chem., 279:30871-30879.
14. **Alquati C., Gioia D. E., Santarossa G., Alberghina L., Fantucci P., Lotti M. (2002).** The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. Eur. J. Biochem., 269: 3321-3328.
15. **Amann R. 1., Ludwig W., Schleifer K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev., 59:143 -169.
16. **Amoozegara M. A., Fatemia A. Z., Karbalaee- Heidarib H. R., Razavic M. R (2007).** Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. Microbiol. Res., 162:369-377.
17. **An Coorevits A., Anna E. D., Jeroen H., Peter S., Anita V. L., Niall A., Paul D. V. (2012).** *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. Rev. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62 :1121-1127.
18. **Anbu P., Annadurai G., Lee J. F., Hur B. K. (2009).** Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis* MR-1 by response surface methodology. J. Chem Technol. Biotechnol., 84:54-62.
19. **Andersen S. M., Johnsen K., Sorensen J., Nielsen P., Jacobsen C. S. (2000).** *Pseudomonas frederiksbergensis* sp. Nov., isolated from soil at a coal gasification site. Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 50: 1957-1964.
20. **Andrews R. E., Bibilos M. M., Bulla J. R. (1985).** Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Applied and Environmental Microbiology, 50(4):737-742.

21. **Anjum F. M., Khan R. M., Din A., Saeed M., Pasha I., Arshad M. U. (2007).** Wheat gluten: High molecular weight glutenin subunits-structure, genetics and relation to dough elasticity. *Journal of Food Science*, 72:3-38.
22. **Anwar A., Saleemuddin M. (1998).** Alkaline proteases: a review. *Bioresour. Technol.*, 64:175-183.
23. **Anzai Y., Kim H., Park J. Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50: 1563-1589.
24. **Arizcun C., Barcina Y., Torre P. (1995).** Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38(1997)17-24.
25. **Arzu C. C., Nilgun T., Birgul O., Cumhuri C. (2011).** The genetic diversity of genus *Bacillus* and the related genera revealed by 16S rRNA gene sequences and ARDRA analyses isolated from geothermal regions of Turkey. *Braz. J. Microbiol.*, 309-324.
26. **Assamoi A. A., Destain J., Thonart P. (2009).** Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- $\beta$ -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(2) :281-294.
27. **Atilgan A. R., Durell S. R., Jernigan R. L., Demirel M. C., Keskin O., Bahar I. (2001).** Anisotropy of fluctuation dynamics of proteins with an elastic network model. *Biophys. J.* 80(1): 505-15.
28. **Atlan D., Béal C., Champonier-Vergès M. C., Chapot-Chartier M. P., Chouayekh H., Coccagn-Bousquet M., Deghorain M., Gadu P., Gilbert C., Goffin P., Guédon E., Guillouard I., Guzzo J., Juillard V., Ladero V., Lindley N., Lortal S., Loubière P., Maguin E., Monnet C., Monnet V., Rul F., Tourdot-Maréchal R., Yvon M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In: *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments* (Corrieu G. et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier. Paris, 271-447.
29. **Atlas R. M., Bartha R. (1998).** *Microbial ecology: Fundamentals and applications*, 4<sup>ème</sup> Édition. Addison-Wesley Publishing Company, Don Mills, Ontario, Canada, 694: 890.
30. **Auberger B., Lamberet G., Lenoir J. (1985).** Les activités enzymatiques de *Penicillium camemberti*. *Le lait*, 59:244-268.
31. **Auberger B., Lenoir J., Bergere J. L. (1995).** Caractérisation de l'activité carboxypeptidasique de *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments.*, 15:273-28.

32. **Aunstrup K ., Barker S. A., Eriksen J., Fogerty W. F., Goksoyr J., Kieslich K., Pilnik W., Rombouts F. M., Rose A. H., Sebek O. K., Shirley J., Vandamme E. J., Vinning L. C. (1980).** Microbial enzymes and bioconversions. Dans: *Economic microbiology*. Academic Press, Rose A.H. (éd)., Londres. Grande Bretagne, 5:75.
33. **Axelsson L. (2004).** Classification and physiology. In : *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Salminen S., Wright A.V. et Ouwehand A). 3e Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1-66.
34. **Azghani A. O., Gray L. D., Johnson A. R. (1993).** A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect. Immun.*, 61:2681-2686.
35. **Azghani A. O., Miller, E. J., Peterson B. T. (2000).** Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung.*, 178:261-269.
36. **Azghani A. O. (1996).** *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 15:132-140.
37. **B., Blotin A., Delorme C., Dusko Ehrlich S., Guedon E., Monnet V., Renault P., Kleerebezem M. (2005)** .new insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435-463.
38. **Baba Ahmed-Kazi T. Z., Decre D., Genel N., Boucherit-Otmani Z., Arlet G., Drissi M. (2013).** Molecular and epidemiological characterization of enterobacterial multidrug-resistant strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008-2010). *Microb. Drug Resist.*, 19:185-190.
39. **Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M., Ouzrout R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle ». *Sciences & Technologie*, 23:30-37.
40. **Bahar I, ernigan R. L. (1999).** Cooperative fluctuations and subunit communication in tryptophan synthase. *Biochemistry*, 38(12):3478-90.
41. **Bahar I., Atilgan A. R., Erman B. (1997).** Direct evaluation of thermal fluctuations in proteins using a single parameter harmonic potential. *Fold. Des.*, 2(3):173-81.
42. **Bahar I., Erman B., Jernigan R. L., Atilgan A. R., Covell D. G. (1999).** Collective motions in HIV-1 reverse transcriptase: examination of flexibility and enzyme function. *J. Mol. Biol.*, 285(3):1023-37.

43. **Barnabé S. (2003).** Eaux usées et résidus industriels, matières tertiaires ou matières premières?. *Vecteur environnement*, 36(2):50-62.
44. **Barnabé S., Yan S., Tyagi R. D. (2007).** Fate of toxic organic compounds during bioconversion of wastewater sludge to value added products. Proceedings of IWA conference on Moving Forward: Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy. New Brunswick, Canada.
45. **Bastard K., Thureau A., Lavery R., Prevost C. (2003).** Docking macromolecules with flexible segments. *J. Comput. Chem.*, 24(15):1910-20.
46. **Beaufort N., Leduc D., Rousselle J. C., Namane A., Chignard M., Pidard D. (2004).** Plasmin cleaves the juxtamembrane domain and releases truncated species of the urokinase receptor (CD87) from human bronchial epithelial cells. *FEBS. Lett.*, 574:89-94.
47. **Beg Q. K., Sahai V., Gupta R. (2003).** Stastical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Proc. Biochem.*, 39:203-209.
48. **Beg Q. K., Saxena R. K., Gupta R. (2002).** De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operation. *Press biochemistry*, 37:1103-1109.
49. **Ben Belgacem Z. B., Abrionel H., Ben Omar N., Lucas R., Martinez-Canamero M., Galvez A., Manai M. (2010).** Antimicrobial activity, safety aspects and some technological properties of Bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. *Food control*, 21:462-470.
50. **Benlounissi A. (2004).** La protéase acide de *Penicillium camemberti*. Production sur lactosérum, précipitation par le sulfate d'ammonium et action sur le lait de chèvre. Thèse de magistère. Université Mentouri. Constantine.
51. **Berg G., Krechel A., Ditz M., Sikora R.A., Ulrich A et Hallmann J. (2005).** Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS. Microbiol. Ecol.*, 51:215-229.
52. **Bergmeyer H. U., Gawekn K. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Tech et Doc. Lavoisier. Paris, 17.
53. **Berkeley R. C. W., Logan N. A., Shute L. A., Capey A. G. (1984).** Identification of *Bacillus* species. In. *Met. Microbiol.*, 16 ed. Bergan, T. London, Academie Press, 291-328.

54. **Berrazeg M., Diene S. M., Drissi M., Kempf M., Richet H., Landraud L., Rolain J. M. (2013).** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS.One, 8-61428.
55. **Bever R. A., Iglewski, B. H (1988).** Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. J. Bacteriol., 170:4309-4314.
56. **Bezawada J., Yan S., Tyagi R. D., Surampalli R. Y. (2010).** Comparison of protease activities in different *Bacillus Licheniformis* strains using wastewater sludge and synthetic soy medium as raw material. Environ. Technol., 31:63-72.
57. **Bibilos M., Andrews R. E. (1988).** Inhibition of *Bacillus thuringiensis* proteases and their effects on crystal toxin proteins and cell-free translation. Canadian Journal of Microbiology, 34:7 40-747.
58. **Björkroth J., Holzapfel W. (2006).** Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (Eds). The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition). Springer Verlag, New York, USA, 267-319.
59. **Boiron P. (1996).** Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris, 19-79.
60. **Bossis C. (1995).** Most Enterobacter aerogenes strains in France belong to a prevalent clone. J.Clin.Microbiol., 37:2165-2169.
61. **Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. (2000).** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie, 20:51-63.
62. **Botelho G. R., Mendonça-Hagler L. C. (2006).** Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. Braz. J. Microbiol. 37(4):401-416.
63. **Botella C., de Ory I., Webb C., Cantero D., Blandino A. (2005).** Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. Biochem. Eng. J., 26 :100-106.
64. **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., SanglierBouchez M., Blanchet D., vandeCastele J. P. (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43: 156-164.
65. **Bradley J. C., Galil, B. (1977).** The taxonomie arrangement of the Phasmatodea with keys to the subfamilies and tribes. Proc. Entomol. Soc., Washington, 2:176-208.



66. **Brafoed H. C. (1981).** Production of enzymes by fermentation. Assays in Applied Microbiology, Ed., Norris, J.R. and Richmond, 2:1-31.
67. **Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., Surampalli R. Y., Barnabé S., Valero J. R. (2007).** *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism, Processbiochem, 42:773-790.
68. **Brar S. K., Verma M., Tyagi R. D., Valero J. R., Surampalli R. Y. (2004).** Comparative rheology and particulate size analysis of various types of *Bacillus thuringiensis* fermented sludges. J. Residuals. Sci. Tech., 1:231-237.
69. **Braud A., Geoffroy V., Hoegy F., Mislin G. L. A., Schalk I. J. (2010).** Thesiderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: Another biological function of these two siderophores. Environ. Microbiol. Report., 2: 419-425.
70. **Braun P., de Groot A., Bitter W., Tommassen J. (1998).** Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 180:3467–3469.
71. **Burhan A., Nisa U., Golman C., Omer C., Ashabil A., Osman G. (2003).** Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* isolate ANT-6. Pro. Cess. Biochemistry., 38:1397-1403.
72. **Calik G., Pehlivan N., Ozcelik L. S., Calik P., Ozdamar T. H. (2004).** Fermentation and oxygen transfert characteristics in serine alkaline protease production by recombinant *Bacillus subtilis* in molasses-based complex medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 79:1243-1250.
73. **Calik P., Bilir E., Calik G., Ozdamar T. H. (2002).** Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. Enzyme and Microbial Technology, 31:685-697.
74. **Calik P., Calik G., Ozdamar T. H. (1998).** Oxygen transfer effects in serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis*: Use of citric acid as the carbon source. Enzyme and Microbial Technology, 23:451-461.
75. **Calik P., Calik G., Ozdamar T. H. (2000a).** Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. Biotechnology and Bioengineering, 69(3):301-311.

76. **Calik P., Takaç S., Calk G., Ozdamar T. H. (2000b)**. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enz. Microbiol. Technol.*, 26(1):45-60.
77. **Camara B., Strompl C., Verbarq S., Sproer C., Pieper D. H., Tindall B. J. (2007)**. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:923-931.
78. **Cano M. E., Rodriguez-Martinez J. M., Agüero J., Pascual A., Calvo J., Garcia-Lobo J. M., Velasco C., Francia M. V., Martinez-Martinez L. (2009)**. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter spp* in Spain. *J. Clin. Microbiol.*, 47:2033-2039.
79. **Carbonnelle B., Denis F., Marmonier A., et al. (1987)**. Bactériologie Médicale : Techniques usuelles. SIMEP SA. Paris, 121-137.
80. **Carr J. G. (1983)**. Microbes 1 have known: a study of those associated with fermented products. *Int. Appl. Bacteriol.*, 55:383-402.
81. **Carrol J., Li J., Ellar D. J. (1993)**. Proteolytic processing of a coleopteran-specific endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochemistry Journal*, 261:99-105.
82. **Carugo O., Pongor S. (2002)**. Protein fold similarity estimated by a probabilistic approach based on C (alpha) - C (alpha) distance comparison. *J. Mol. Biol.*, 315(4):887-98.
83. **Casanova A., Obreque J. c., Sandino A. M. G., Jashés, M. (2001)**. tRNA genes were found in *Piscirickettsia salmonis* 16S-23S rDNA spacer region (ITS). *FEMS. Microbiol. Lett.*, 197:19-22.
84. **Castro G. R., Mendez B. S., Sinez F. (1993)**. Proteolytic enzymes produced by *Bacillus amyloliquefaciens* MIR-41 in Batch and continuous culture. *J. chem. Tech. Biotechnol.*, 56:289-294.
85. **Centeno J. A., Cepada A., Rodriguez-Otero J. L. (1996)**. Lactic acid bacteria isolated from Arzûa cow's milk cheese. *International Dairy Journal*, 6:65-78.
86. **Chari F., Fatma B., Monia B., Sameh M., Semia E. C., Raoudha E. G. (2012)**. Potential application of two thermostable lichenases from a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 47(3) :509-516.

87. **Chamba J. F., Prost F. (1989).** Mesure de l'activité acidifiante des bactéries lactiques thermophiles utilisées pour la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 417-431.
88. **Chantawannakul P. (2002).** Microorganisms related in Thai fermented soybeans BSc Dissertation, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University (in Thai).
89. **Cheesbough M. (2001).** District laboratory practice in tropical countries. United Kingdom, university press.
90. **Chekireb D., Tahar A., Cochet N. (2009).** Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. *European Journal of Scientific Research*, 125-140.
91. **Chen J., Stites W. E. (2001).** Packing is a key selection factor in the evolution of protein hydrophobic cores. *Biochemistry*, 40(50):15280-9.
92. **Chen S. T., Hsiao S. C., Wang K. T. (1991).** Stable industrial protease catalyzed peptide bond formation in organic solvent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1:445-450.
93. **Chen S. S., Huang W. J., Chang L. S., Wei Y. H. (2000).** Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J. Urol.*, 179(2):639-642.
94. **Chen Y, Long J, Liao L, Zhang Y, Yang J. (2000).** Study on the production of beta-mannanase by *Bacillus M50*. *Acta. Microbiol. Sin.*, 40:62-8.
95. **Chestukhina G. G., Zalunin I. A., Kostina L. I., Kotova T. S., Kattrukha S. P., Stepanov V. M. (1980).** Crystal-forming proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry Journal*, 187:457-465.
96. **Chi Z., Zhao S. (2003).** Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan producing yeast strain. *Enzyme. Microb. Technol.* 33:206-211.
97. **Cholet O. (2006).** Etude de l'écosystème fromager par une approche biochimique et moléculaire. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon Discipline : Sciences des Aliments.
98. **Chun T. G., Chun Y. L., Gui C. H. (2014).** *Enterobacter Xiangfangensis* Sp. Nov., Isolated From Chinese Traditional Sourdough, and Reclassification of *Enterobacter Sacchari* Zhu as *Kosakonia Sacchari* Comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64(8):2650-2656.
99. **Claus, D., Berkeley, R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 2:1105-1139.

100. **Coenye T., Vandamme P. (2003).** Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 228: 45-49.
101. **Colwell R. R., Grigorova. R. (1989).** *Methods in microbiology.* (Ed) St E dimundsbert press limited. Great Britain, 133-138.
102. **Colwell R. R., Mandel M. (1964).** Adansonian analysis and deoxyribonucleic acid base composition of some Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 87:1412-1422.
103. **Colwell R. R., Citarella R. V., Ryman I. (1965).** Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J. Bacteriol.*, 90:1148-1149.
104. **Coorevits A., Dinsdale A. E., Heyrman J., Schumann P., Van Landschoot A., Logan N. A., De Vos P. (2012).** *Lysinibacillus macroides sp.nov.*, nom. rev. *Int. J. Syst Evol. Microbiol.*, 62:1121-1127.
105. **Corrieu G., Luquet F. M. (2008).** *Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.* Ed. Lavoisier. Paris. France, 472-676.
106. **Cousin D., Matagne A., Laemmli U. K., Stewart D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34:1157-1166.
107. **Crosby L. D., Criddle C. S. (2003).** Understanding bias in microbial community analysis techniques due to *rrn* operon copy number heterogeneity. *Biotech.*, 34:790-802.
108. **De Ambrosini V. M., Gonzalez S., Perdigon G., De Ruiz Holgado A. P., Oliver G. (1996).** Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem. Pharm. Bull.*, 44: 2263-2267.
109. **De Bentzmann S., Polette M., Zahm J. M., Hinnrasky J., Kileztky C., Bajolet O., Klossek, J. M., Filloux A., Lazdunski A., Puchelle E. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab. Invest.*, 80:209-219.
110. **Debabov V. G. (1982).** The industrial use of bacilli. In: *The molecular biology of bacilli.* Vol. 1, *Bacillus subtilis.* Dubneau, D.A (ed). Academic press, New York, 331-370.
111. **Delarras C. (2003).** *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux.* TEC & DOC., Lavoisier. Paris, 269.

112. **Dellagio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C., Janssens D. (1994).** Taxonomie, métabolisme, croissance et génétique des bactéries lactiques *In : Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques.* Ed. de Roissard H. et Luquet F. M. Loriga : Uriage, France, 25-116.
113. **Denizci A. A., Kazen D., Abdeln E. C. A., Erarslan A. (2008).** Newly isolated *Bacillus clausii* GMBAE : an alkaline protease producer capable to grow under highly alkaline conditions. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 3(1):42-46.
114. **Dercova K., Augustin J., Krajcova D. (1992).** Cell growth and protease production characteristics of *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.*, 37:17-23.
115. **Desmazeaud M. (1978).** Enzymes des microorganismes intervenant dans l'affinage des fromages. XXème Cong. Intern. Lait, Paris.
116. **Deutscher J., Galinier A., Martin Verstraete I. (2002).** Carbonhydrate uptake and metabolism. Dans: *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, États-Unis, 129-150.
117. **Deymié B., Multon J. L., Simon D. (1981).** Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. APRIA. Paris, 238-241.
118. **Dion W. M. (1950).** The proteolytic enzymes of microorganisms. II. Factors affecting the production of proteases in submerged. *Can. J. RES.*, 586-599.
119. **Doi R. H. (1974).** Role of proteases in sporulation. In: *Molecular microbiology*, KWAPINSKI J. B. G. Wiley. New-York, États-Unis, 1-20.
120. **Doi, R. H (1972).** Role of proteases in sporulation. *Current Topics in Cellular Regulation*, 6:1-20.
121. **Donovan W. P., Tan Y., Slaney A. C. (1997).** Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2311-2317.
122. **Drahovská H., Kocincová D., Seman M., Turňa J. (2002).** PCR-based methods for the identification of *Enterococcus* species. *Folia Microbiol.*, 47:649-653.
123. **Driks A. (2004).** The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 94:1249-1251.
124. **Drouin M. (2005).** Etude de la production de protéase alcaline par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat.
125. **Duan Y. Q., Zhou X. K., Di-Yan L., Li Q. Q., Dang L. Z., Zhang Y. G., Qiu L. H., Nimaichand S., Li, W. J. (2015).** *Enterobacter tabaci* sp. nov., a novel member of the genus *Enterobacter* isolated from a tobacco stem. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108 :1161-1169.

126. **Dulon S., Cande C., Bunnett N. W., Hollenberg M. D., Chignard M., Pidard D. (2005).** Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serineproteinases. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 28:339-346.
127. **Duong F., Bonnet E., Geli V., Lazdunski A., Murgier M., Filloux A. (2001).** The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene*, 262:147-153.
128. **Edwards C.M.B., Cohen M.A., Bloom S.R (1999).** Editorial: Peptides as drugs. *Q.J.Med.*, 92:1-4.
129. **Elibol M., Moreira A. (2005).** Optimizing some factors affecting alkaline protease production by marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid substrate fermentation, *Process. Biochem*, 40:1951-1956.
130. **Elibol M., Antouio R., Moreira. (2005).** Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Terclinobacter turbirae* solid substrate fermentation. *Process. Biochem.*, 4:1951-1956.
131. **Emanuel G., Lorrence H. G. (2009).** Practical handbook of microbiology. CRC press. USA, 13: 978-8493.
132. **Engel L. S., Hobden J. A., Moreau J. M., Callegan M. C., Hill J. M., O'Callaghan R. J. (1997).** *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38:1535-1542.
133. **Engel L. S., Hill J. M., Caballero A. R., Green L. C., O'Callaghan, R. J. (1998a).** Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 273:16792-16797.
134. **Engel L. S., Hill J. M., Moreau J. M., Green L. C., Hobden J. A., O'Callaghan R. J. (1998b).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39:662-665.
135. **Estepar J., del Mar Sánchez M., Alonso L., Mayo B. (1999).** Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Penamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 9:737-746.
136. **Estrellas P. S., Alionte L. G., Hobden Euzemy J. P. (2008).** List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. URL <http://www.bacterio.cict.fr/>.
137. **Facklam R., Hollis D., Collins M. D. (1989).** Identification of gram-positive coccid and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 27:724-730.
138. **Fahmy F., Flossdorf J., Claus D. (1985).** The DNA composition of the type strains of the genus *Bacillus*. *Syst. App. Microbiol.*, 6: 60-65.

139. **Falagas M. E., Betsi G. I., Athanasiou S. (2006).** Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 58: 266-272.
140. **Federighi M. (2005).** Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. 2ed. Economica. Paris, 224-233.
141. **Ferrero M. A., Castro G. R., Abate C. M., Baigori M. D., Sineriz F. (1996).** Thermostable alkaline protease of *Baeillus licheniformis* MIR 29 : isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 327-332.
142. **Fijuwara N., Tsumiya T., Katada T., Ymamoto K. (1989).** Continious recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochemistry*, 24:155-156.
143. **Fisher S. H., Débarbouillé M. (2002).** Nitrogen source utilization and its Regulation. Dans: *Bacillus subtilis* and ifs closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, États-Unis, 181-192.
144. **Fogarthy W. M., Kelly C. T. (1990).** Microbial enzymes and bioteehnology, 2<sup>ème</sup> Édition. Elsevier Science Publishing, New-York, États-Unis, 472.
145. **Folders J., Tommassen J., van Loon L. C., Bitter W. (2000).** Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182:1257-1263.
146. **Fourrier F (2004).** Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock*, 21:444-451.
147. **Frankena J., Van Verseveld H. W., Stouthamer A. H. (1985).** A coutinous culture study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus lieheniformis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 22: 169-176.
148. **Frateur I., Lartundo-Rojas L., Méthivier C., Galtayries A., Marcus P. (2006).** Influence of bovine serum albumin in sulphuric acid aqueous solution on the corrosion and the passivation of an iron-chromium alloy. *Electrochimica Acta*, 51 :1550-1557.
149. **Frazier W. C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London, 3-429.
150. **Fridlender M., Inbar J., Chet. I. (1993).** Biological control of soil-borne plant pathogens by a b-1,3-glucanase–producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil. Biol. Biochem.*, 25:1211-1221.
151. **Fritze D. (2004).** Taxonomy and systematics of the aerobic endospore forming bacteria: *Bacillus* and related genera. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and*

- Emerging Application, Eds. E. Ricca, A.O. Henriques, and S.M. Cutting,. Norfolk, U.K.: Horizon Bioscience, 17-34.
152. **Fujiwara N., Yamamoto K. (1987).** Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus sp* and properties of the enzyme. Journal of fermentation Technology, 65(3):345-348.
  153. **Fujiwara N., Yamamoto K., Masui A. (1991).** Utilisation of a thermostable alkaline protease from an alkalophilic thermophile for the recovery of silver from used X-ray. Journal of fermentation and Bioengineering, 2(4)306-308.
  154. **Fujiwara N., Yamamoto K. (1987).** Production of alkaline protease in a low cost medium by alkalophilic *Bacillus sp* and properties of the enzyme. J. Ferment. Technol., 65: 345-348.
  155. **Fukushima M., Kakinuma K., Kawaguchi R. (2002).** Phylogenetic analysis of *Salmonella*, *Shigella*, and *Escherichia coli* strains on the basis of the *gyrB* gene sequence. 1. Clin. Microbiol.40: 2779 -2785.
  156. **Fujiwara N., Tsumiya T., Katada T., Hosobuchi T., Yamamoto K. (1989).** Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. Process. Biochem., 24: 155-156.
  157. **Gajju H., Bhalla T.C et Agarwal H.O. (1996).** Thermostable alkaline proteases from thermophilic *Bacillus coagulans*. PB-77. Indian. J. Microbiol., 36:153-155.
  158. **Gallagher S., Wiley E. (2008).**Current Protocols Essential Laboratory Techniques.New York, John Wiley & Sons, Inc.,978:470.
  159. **García-Gómez M. J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L. A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem., 112:604-608.
  160. **Gatti M., Fornasari M. E., Neviani E. (2001).** Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* by SDS-PAGE of cell-wall proteins. Lett. Appl. Microbiol., 32(5):352-6.
  161. **Giesecke U. E., Bierbaum G., Rudde H., Spohn U., Wandrey C. (1991).** Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in controlled fed-batch process, Appl. Microbiol. Biotechnol., 35:720-724.
  162. **Gilarová R., Voldrich M., Demnerová K., Cerovský., Dobiás J. (1994).** Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol., 24: 315-319.



163. **Godfrey T. A., Reichelt J. (1985).** Industrial enzymology: the application of enzymes in industry. London, the nature press.
164. **Gololobov M. Y., Stepanov V. M., Voyushina T. L., Morozova I. P., Adluereutz P. (1994).** Side reactions in enzymatic peptide synthesis in organic media: Effects of enzyme, solvent and substrate concentration. *Enzyme Microb. Technol.*, 16:522-528.
165. **Goozner M. (2004).** The 800 million pill. The truth behind the cost of new drugs. University of California Press.
166. **Gordon R. E., Hayens W. C., Pang C. H. N. (1973).** The genus *Bacillus*. In *Bacillus* Edited by Colin R. Harwood. New -York & London, Plenum Press, 293 -320.
167. **Gordon Y. J., Romanowski E. G., McDermott A. M. (2005).** A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* Jul., 30(7):505-15.
168. **Grimont F., Grimont P. A. D. (2006).** The Genus *Enterobacter* In : Procaryotes (3éd) USA, Springer, 6:197-214.
169. **Grimont F, Grimont P. A. D. (2002).** *Enterobacter* In: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (2éd): The Proteobacteria, Partie B: The Gammaproteobacteria) USA, Springer, 2:661-671.
170. **Gu C. T., Li C. Y., Yang L. J., Huo G. C. (2014).** *Enterobacter xiangfangensis sp. nov.*, isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of *Enterobacter sacchari*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64:2650-2656.
171. **Guangrong H., Dehui D., Weilian Hu., Jiixin J. (2008).** Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with statistical method. *Afr. J. Biotechnol.*, 7: 1115-1122.
172. **Guerzoni M. F., Suzzi G. (2001).** Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64:105-117.
173. **Guiraud J. P. (2003).** *Microbiologie alimentaire*. Tek et Dok dunod. Paris, 90-292.
174. **Guiraud J.P. (2003).** *Microbiologie alimentaire*. Ed: Dunod. Paris, 144(145):435-446.
175. **Gupta R., Beg Q. K. (2003).** Purification and characterization of an oxidation stable, thioldependant serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 32-294.

176. **Gupta R., Beg Q.K., Lorenz P. (2002a)**. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 59: 15-32.
177. **Gupta R., Beg Q. K., Khan S., Chauhan B. (2002b)**. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 381-395.
178. **Guzzo J., Pages J. M., Duong F., Lazdunski A., Murgier M. (1991)**. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.*, 173:5290-5297.
179. **Hameed A., Keshavarz T., Evans C. (1999)**. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*, 74:5-8.
180. **Hammes W. P., Hertel C. (2006)**. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *The Prokaryotes*. Springer, 4:320-403.
181. **Hanlon G. W., Hodges N. A., Russel A. D. (1982)**. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.*, 128:845-851.
182. **Hansen W. (1991)**. *Pseudomonas* aspects microbiologiques et cliniques. *L'eurobiologiste (TXXV)*, 193:125-148.
183. **Hao J., Pazlarova J., Strnadova M., Tichy P, haloupka J. (1988)**. Temperature effect on  $\alpha$  amylase DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Folia Microbiol.*, 33:230-233.
184. **Hara T, eda S. (1982)**. Regulation of polyglutamate production in *Bacillus subtilis* (natto): Transformation of high PGA productivity. *Agrie. Biol. Chem.*, 29:45-72.
185. **Hardie J. M. (1986)**. Methods for the isolation and identification of anaerobes. *Soc. Ppl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 13:397-410.
186. **Hardoim P. R., van Overbeek L. S., van Elsas J. D. (2008)**. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends. Microbiol.*, 16(10):463-471.
187. **Hariri A., Ouis N., Sahnouni F., Djilali B. (2009)**. Mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux à base des extraits de caroube. *Rev. .Microbiol. Ind. San. Environn.*, 5:37-55.

188. **Hashemi M., Razavi S. H., Shojao S. A. (2010).** Development of a solid-state fermentation process for production of an alpha amylase with potentially interesting properties. *Biosci.Bioeng.*, 110:333-337.
189. **Heyman T., Kermazyn C. (1973).** Observation sur une souche W23 de *Bacillus subtilis* sporulant en présence d'un excès de glucose. Colloques internationaux du CNRS, 227. Régulation de la sporulation microbienne CNRS Paris.
190. **Heyrman J., Logan N. A., Rodriguez M., Scheldeman P., Lebbe L., Swings J., Heyndrickx M., De Vos P. (2005).** Study of mural painting isolates, leading to the transfer of *Bacillus maroccanus* and *Bacillus carotarum* to *Bacillus simplex*, emended description of *Bacillus simplex*, re-examination of the strains previously attributed to *Bacillus macroides* and description of *Bacillus muralis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol Microbiol.*, 55:119-131.
191. **Higgins D. G., Sharp, P. M., Moritz C. (1996).** CLUSTALW: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*,73:237-244.
192. **Hmidet N., El Hadj A. N., Haddar A., Kanoun S., Alya S., Nasri M. (2009).** Alkaline proteases and thermostable  $\alpha$ -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, 47:71-79.
193. **Ho P. L., Korenblum E., der Weid I., Santos A. L., Rosado A. S. (2005).** Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* HO-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. *J. Appl. Microbiol.* 98(3):667-75.
194. **Hodgson J. (1994).** The changing bulk biocatalyst market. *Biotechnol.*, 12:789-790.
195. **Höfle M. G. (1988).** Identification of bacteria by low molecular weight RNA profiles: a new chemotaxonomic approach. *J. Microbiol. Meth.*, 8: 235-248.
196. **Höfle M. G. (1990).** Transfer RNAs as genotypic fingerprints of eubacteria. *Arch. Microbiol.*, 153:299-304.
197. **Holloway B. W. (1992).** *Pseudomonas* in the late twentieth century. In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* (E Galli, S Silver, B Witholt, eds), Am. Soc. Microbiol, Washington, DC, 1-8.
198. **Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D., Leblond-Bourget N., Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. (1994).** Genus *Pseudomonas*. In: (Eds) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins, 93-94.

199. **Horikoshi K. (1996).** Alkalophiles from an industrial point of view. FEMS. Microbiol. Rev., 18:259-270.
200. **Hormaeche F., Edwards M. (1960).** Enterobacter aerogenes (Approved Lists 1980). Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 67(2):502-504.
201. **Hugenholtz H., van Sinderen D., Kok J., Konings W. (1987).** Cell wall associated proteases of *Streptococcus cremoris* Wg2. Applied and Environmental Microbiology, 53:853-859.
202. **Iglewski B. H., Sadoff J., Bjorn M. J., Maxwell, E. S. (1988).** *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. Proc. Natl. Acad. Sci., U S A., 75:3211-3215.
203. **J.J., Vayssier Y., Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris, 12-426.
204. **Jacques M. A. (1994).** Écologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllie de *Cichorium endivia* var. *latifolia* L. Thèse de doctorat, université de Paris-XI, Orsay, 123.
205. **Jakubowski. (2001).** Proteinase chemistry and molecular biology. J. Biochem., 23(5): 1825-1827.
206. **Jaspard E. (2013).** Role of protein-solvent interactions in refolding: effects of cosolvent additives on the renaturation of porcine pancreatic elastase at various pHs. Arch. Biochem. Biophys., 375:220-228.
207. **Joffin J. N., Leyrol G. (2006).** Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. 4ème édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. ISBN., 363:2-86617
208. **Johnson J. L., Palleroni N. J. (1989).** Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 39:230-235.
209. **Johnson J. L., Ordal E. J. (1968).** Desoxyribonucleic acid homology in bacterial taxonomy: effect of incubation temperature on reaction specificity. J. Bacteriol., 95:893-900.
210. **Joly B., Reynaud A. (2003).** Entérobactéries : systématique et méthodes de diagnostic. TEC & DOC. Lavoisier. Paris, 356.
211. **Joo H. S., Chang C. S. (2005).** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp.I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. Process. Biochem., 40:1263-1270.

212. **Joo H. S., Kumar C. G., Park G. C., Kim K. T., Palk S. R., Chang C. S. (2002).** Optimisation of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process. Biochemistry.*, 38:155-159.
213. **Kalaiarasi K., Sunitha P. U. (2009).** Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*, 8(24):7035-7041.
214. **Kampfer P., Falsen E., Busse H. J. (2008).** Reclassification of *Pseudomonas mephitica* Claydon and Hammer 1939 as a later heterotypic synonym of *Janthinobacterium lividum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58:136-138.
215. **Kampfer P., Ruppel S., Remus R. (2005).** *Enterobacter radicincitans* sp. nov., a plant growth promoting species of the family Enterobacteriaceae. *Syst. Appl. Microbiol.*, 28. 213-221.
216. **Kandler O., Weiss N. (1986).** Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In: (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology* (8th ed). Baltimore, 208-1234.
217. **Kandler O. (1988).** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49:209-224.
218. **Kanekar P. P., Nilegaonkar S. S., Sarnaik S. S., Kelkar A. S. (2002).** Optimization of protease activity of alcaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresour. Technol.*, 85:87-93.
219. **Kaur S., Vorra R. M., Kapoor M., Beg Q. K., Hoondal G. S. (2001).** Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17:125-129.
220. **Kembhavi A. A., Kulkarni A., Pant A. (1993).** Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 38(64): 83-92.
221. **Kenneth T., Ph D. (2008).** Gram positive, aerobic or facultative endospore forming Bacteria (The genus *Bacillus*). *Textbook of Bacteriology*.
222. **Kessler E., Safrin M. (1988).** Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.*, 170:5241-5247.
223. **Kessler E., Safrin M., Abrams W. R., Rosenbloom J., Ohman D. E. (1997).** Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.*, 272:9884-9889.

224. **Khan F.G., Rattan A., Khan I. A., Kalia A. (1996).** A preliminary study of fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by whole cell protein analysis by SDS-PAGE. Indian. J. Med. Res., 104:342-8.
225. **Kipnis E., Guery B. P., Tournoys A., Leroyt X., Robrique L., Fialdes P., Neviere R., Fourrier F. (2004).** Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. Shock, 21:444-451.
226. **Kole M. M., Draper I., Gerson D. F. (1988a).** Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. J. chem Technol. Biotechnol., 41:197-206.
227. **Kole M. M., Draper I., Gerson D. F. (1988b).** Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled, glucose fed batch fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol., 28: 404-408.
228. **Kon Y., Tsukada H., Hasegawa T., Igarashi K., Wada K., Suzuki E., Arakawa M., Gejyo F. (1999).** The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat airpouch inflammation model. FEMS. Immunol. Med Microbiol., 25:313-321.
229. **Kortt A. A., Burns J. E., Vaughan J. A., Stewart D. J. (1994).** Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. Biochem. Mol. Biology Int., 34(6):1157-1166.
230. **Kovacs N. (1956).** Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, 178-703.
231. **Kresze G. B. (1991).** Proteases during purification. Bioprocess-technol., 12:85-120.
232. **Kudrya V. A et Simonenko I. A. (1994).** Alkaline serine protease and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology, 41: 505-509.
233. **Kumar A. G., Nagesh N., Prabhakar T. G., Sekaran G. (2008a).** Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. Utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresour. Technol., 99; 2364-2372.
234. **Kumar C. G., Takagi H. (1999).** Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advances, 17:561-594.
235. **Kumar D., Savitri-Thakur N., Verma R., Bhalla T. C. (2008b).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Res. J. Microbiol., 3(12):661-672.

236. **Kumar G., Parrack P. (2003).** Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19:757-762.
237. **Kumar S., Tamura K., Nei M. (2004).** MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief Bioinformatics*, 5:150-163.
238. **Kunitate A., Okomoto M., Ohmori I. (1989).** Purification and characterization of thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*. *Agric. Biol.Chem.*, 53(12):3251-3256.
239. **Kunitz M. (1947).** Crystalline soybean trypsin inhibitor. *Journal of General Physiology*, 30:291-310.
240. **Lachhab K., Tyagi R.D., Valéro J. R. (2001).** Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37:197-208.
241. **Laemmli U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
242. **Lakhal A. (1997).** Optimisation des facteurs de production des protéases extracellulaire chez *Bacillus* cultivé sur un milieu à base de Corn steep liquor : approche à l'utilisation des plans expérimentaux. Université Tlemcen.
243. **Lamontagne E. (2004).** Caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* d'intérêt pour la production de biopesticides et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-ETE, Université du Québec, Canada, 112.
244. **Lathan P. W. (1999).** Therapeutic peptides revisited. *Nature. Biotech.*, 17:755-57.
245. **Lavigne J. P., Sotto, A., Nicolas-Chanoine M. H., Bouziges N., Pages J. M., Davin-Regli A. (2013).** An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. *Int.J.Antimicrob.Agents.*, 41 :130-136.
246. **Lazim H., Mankai H., Slama N., Barkallah I., Liman F. (2009).** Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 36:531-537.
247. **Leclerc H., Mossel D. A.A., Edberg S. C., Struijk C. B. (2001).** Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55:201-234.

248. **Lee C. S., Jung Y. T., Park S., Oh T. K., Yoon J. H. (2010).** *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from forest humus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 60:281-286.
249. **Lehner A, Roger. S, Fanning. S., Iversen C. (2011).** *Enterobacter* In: *Molecular Detection Of Human Bacterial Pathogens*. USA, CRC, 853-863.
250. **Leidal K. G., Munson K. L., Johnson M. C et Denning G. M (2003).** Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1, and ENA-78. *J. Interferon. Cytokine. Res.*, 23:307-318.
251. **Lelliott R. A., Billing E., Hayward A. C. (1966).** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. *J. Appl. Bacteriol.*, 29:470-489.
252. **Levy E., Eyal Z., Chet I., Hochman A. (1992).** Resistance mechanisms of *Septoria tritici* to antifungal products of *Pseudomonas*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 40:163-71.
253. **Logan N. A., Berkeley R. C. W. (1984).** Identification of *Bacillus* strains using API system. *J. Gen. Microbiol.*, 130:1871-1882.
254. **Lynn F., Jahir A. K., Ruchika P. (1999).** A study on partial purification and characterization of extracellular proteases from *Bacillus subtilis*. *Pelagia Research Library*, 2(3):509-519.
255. **Mabrouk S. S., Hashem A. M., EL-Shayeb N. M. A., Ismail A. M. S., Abdel-Fattah A. F. (1999).** Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69:155-159.
256. **Macwana M., Rani-Prasad N. N., Sambasvarao K. R. S. (2012).** Optimization of cultural condition for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus*. *ASIAN. J. Exp. Biol. Sci.*, 3(3):565-576.
257. **Mäkelä P., Schillinger U., Korkeala H., Holzapfel W. H. (1992).** Classification ofropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 16:167-172.
258. **Maldonado A., Caballero-Guerrero B., Jimenez E., Jiménez-Díaz R., Ruiz-Barba J. L et Rodriguez J. M. (2011).** Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *Int. J. Food. Microbiol.*, 133:105-112.
259. **Malek F. (1995).** Etude de la production de protéases extracellulaires chez *Bacillus*. Evaluation semi- quantitative du pouvoir protéolytique et effet des acides aminés sur



la production des protéases. Thèse de magister. Institut de biologie. Université de Tlemcen.

260. **Malkov S. V., Barabanshchikov B. I. (1991).** The effect of silicon metabolism on genetic transformation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 9-11.
261. **Malloy J. L., Veldhuizen R. A., Thibodeaux B. A., O'Callaghan R. J., Wright J. R. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 288:409-418.
262. **Marchal N. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed: DOIN. Paris, 483.
263. **Margot A, Flaschel E., Renken A. (1994).** Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Proc. Biochem.*, 29:257-262.
264. **Markkanen P. H., Bailey M. J. (1975).** Effect of the alteration of aeration and temperature on production of protease by *Bacillus subtilis*. *J. appl. Chem. Biotechnol.*, 25:863-865.
265. **Matoub L. (2000).** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* sélectionnée (Lc33). Mémoire de Magister. Sciences alimentaires. I.N.A. El-Harrach.
266. **Matsumoto K., Greenberg E. P., Nilles J. S (2004).** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.*, 186:4449-4456.
267. **Mavrodi O. V., McSpadden-Gardener B. B., Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Weller D. M., Thomashow, L. S. (2001).** Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.*, 91: 35-43.
268. **McKenzie H. A. (1971).** Milk proteins chemistry and molecular biology. (Ed) Berkeley square. London, 246-249.
269. **McLeod A., Nyquist O. L., Snipen L., Naterstad K., Axelsson L. (2008).** Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst. Appl. Microbiol.*, 31:393-403.
270. **McSweeney P. L. H., Sousa M. J. (2000).** Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait.*, 80:293-324.

271. **Mechakra A., Auberger B., Remeuf F., Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments.*, 19(6):663-675.
272. **Meenakshisundaresh K. S., Gujar G. T. (1998).** Proteolysis of *Bacillus thuringiensis subspecies kurstaki* endotoxin with midgut proteases of some important lepidopterous species. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36:93-598.
273. **Mesadek T., Kunst F., Rapoport G. (1993).** Two component regulatory systems in: *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria. *Biochemistry. Physiology and molecular genetics. American society for Microbiology. Washington, D.C.*, 729-745.
274. **Meunier N. (1999).** Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168.
275. **Meyer J. M., Gruffaz C., Tulkki T., Izard D. (2007).** Taxonomic heterogeneity, as shown by siderotyping, of strains primarily identified as *Pseudomonas putida*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:2543-2556.
276. **Meyer J. M., Geoffroy V. A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N. (2002).** Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:2745-2753.
277. **Michoud G. (2014).** Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi «omics», thèse Université de Bretagne Occidentale.
278. **Miller J. D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.*, 54:872-884.
279. **Millet J., Aubert J. P. (1969).** Etude de la mégateriopéptidase. Protéase exocellulaire de *Bacillus megaterium*. Biosynthèse et rôle physiologique. *Annales de l'institut Pasteur*, 117:464-473.
280. **Min Y. J., Joong-Su K., Woon K. P., Igor S., In-Soon P., Yeseul S., Jayoung P., Keun A. P., Hongik K., Hong L. K., Young-H. C. (2012).** Description of *Lysinibacillus sinduriensis* sp. nov. And transfer of *Bacillus massiliensis* and *Bacillus odysseyi* to the genus *Lysinibacillus* as *Lysinibacillus massiliensis* comb. nov. And *Lysinibacillus odysseyi* comb. nov. with emended description of the genus *Lysinibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2347-2355.

281. **Miwa H., Ahmed I., Yokota A., Fujiwara T. (2009).** *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp.nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 59:1427-1432.
282. **Monnet V., le Bars, D., Gripon J. C. (1987).** Purification and characterization of a cell wall proteinase from *Streptococcus lactis* NCDO763. Journal of Dairy Research, 54:247-255.
283. **Moodie P. (2001).** Traditional baking enzymes- proteases. Enzyme Development Corporation, 212:736-1580.
284. **Moreira K. A., Albuquerque B. F., Teixeira M. F. S., Porto A. L. F., Lima filho J. L. (2002).** Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18:307-312.
285. **Morihara K., Tsuzuki H., Oka T., Inoue H., Ebata M. (1965).** *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Isolation, crystallization, and preliminary characterization. J. Biol. Chem., 240:3295-3304.
286. **Mukhtar H., Haq I. (2008).** Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing. Pak. J. Bot., 40(4):1673-1679.
287. **Munsch P., Alatosava T. (2002).** Several pseudomonads, associated with the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* sp., are hemolytic. Microbiol. Res. 157:1-5.
288. **Nagashima T., Watanabe A., Kise H. (1992).** Peptide synthesis by proteases in organic solvents: Medium effect on substrate specificity. Enzyme. Microb. Technol., 14: 842-847.
289. **Naidu K. S. B., Devi K. L. (2005).** Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. African Journal of Biotechnology, 4 (7):724-726.
290. **Nascimento W. C. A, Martins M. L. L. (2003).** Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Braz. J. Microbiol., 35:91-96.
291. **Nathalie D. (2010).** Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. Toxins, 2:1179-1206.
292. **Nedjai S., Barguigua A., Djahmi N., Jamali L., Zerouali K., Dekhil M., Timinouni M. (2012).** Prevalence and characterization of extended spectrum beta-lactamases in *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* group bacteria, in Algeria. Med.Mal Infect., 42:20-29.

293. **Nehete P. N., Shah V. D., Kothari R. M. (1985).** Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. *Biotechnol lett.*, 7:413-418.
294. **Nielsen T. H., Thrane C., Christophersen C., Anthoni U, orensen J. (2000).** Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin - a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J. Appl. Microbiol.*, 89: 992-1001.
295. **Nielsen M. N., Sorensen J., Fels J, edersen H. C. (1998).** Secondary metabolite – and endochitinase- dependent antagonism toward plant -pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:3563-3569.
296. **Nishimori E., Kita-Tsukamoto K., akabayashi H. (2000).** *Pseudomonas plecoglossicida* sp. Nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50:83-89.
297. **Oberoi R., Beg Q. K., Puri S., Saxena R. K., Gupta R. (2001).** Characterization and wash performance analysis of SDS – stable alkaline protease from *Bacillus* sp. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 17:493-497.
298. **O'Callaghan R. J., Engel L. S., Hobden J. A., Callegan M. C., Green L. C., Hill J. M. (1996).** *Pseudomonas keratitis*. The role of an uncharacterized exoprotein, protease IV, in cornealvirulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:534-543.
299. **Ochi K. (1994).** Phylogenetic diversity in the genus *Bacillus* and comparative ribosomal protein AT430 analyses of the genus *Thermoactinomyces* and relatives. *Microbiology*, 140:2165-2171.
300. **Okuda K., Morihara K., Atsumi Y., Takeuchi H., Kawamoto S., Kawasaki H., Suzuki K et Fukushima J. (1990).** Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *Infect. Immun.*, 58:4083-4088.
301. **Olajuyibe F. M. (2005).** Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species, *African Journal of Biotechnology*, 4(8):776-779.
302. **Olajuyibe F. M., Ajele J. O. (2008).** Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* Lbbl-11 isolated from «iru », a traditionally fermented African locust bean condiment, IDOSI Publications.
303. **Ole K., Borchert T.V., Fuglsang C. C. (2002).** Industrial enzymes applications. *Current opinion in Biotechnology*, 13:345-351.

304. **Olson J. C., Ohman, D. E. (1992).** Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *J. Bacteriol.*, 174: 4140-4147.
305. **Ooi T, Kikuchi D. (1995).** Purification and some properties of beta-mannanase from *Bacillus sp.* *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 11:310-4.
306. **Otto B. R., Van Dooren S. J.M., Nuijens J. H., Luirink J., Oudega B. (2002).** Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J. Exp. Med.*, 188:1091-1103.
307. **Palleroni N. J. (1984).** Genus *Pseudomonas* Migula. In: (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, 141-171.
308. **Palleroni N. J. (2005).** Genus I. *Pseudomonas*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part B: The Proteobacteria*. Springer, New York, 323-379.
309. **Palleroni N. J. (2008).** The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P. (Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, 1-18.
310. **Palleroni N. J., Kunisawa R., Contopoulou R., Doudoroff M. (1973).** Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23:333-339.
311. **Pandey K. K., Mayilraj S., Chakrabarti T. (2002).** *Pseudomonas indica* sp. nov., a novel butane-utilizing species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:1559-1567.
312. **Park P. W., Pier G. B., Hinkes M. T., Bernfield M. (2001).** Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence, *Nature*, 411 : 98-102.
313. **Park S., Galloway D. R. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* LasD processes the inactive LasA precursor to the active protease form. *Arch. Biochem. Biophys.*, 357:8-12.
314. **Parry J. M., Turnbull P. C. B., Gibson J. R. (1983).** A Color atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Atlases.19. London: Wolfe Medical Publications.
315. **Patel P. R. (1985).** Enzyme isolation and purification In: *Biotechnology: Applications and Research*. Technomic Publishing Co-Inc. USA, 534-564.
316. **Payne P. I., Holt L. M., Jackson E. A., Law C. N. (1979).** Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B.*, 304:359-71.

317. **Peix A., Ramírez-Bahena M. H., Velázquez E. (2009).** Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evolution*, 9:1132-1147.
318. **Pelmont J. (1995).** Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble, 619-655.
319. **Penasse L. (1974).** Les enzymes cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris, 58-86.
320. **Pilet C., Bourdon J. L., Toma B. (1979).** Les entérobactéries: Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne. Doins. Paris, 109-187.
321. **Pirotta M., Gunn, J., Chondros P., Grover S., O'Malley P., Hurley S., Garland, S. (2004).** Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ.*, 329:548.
322. **Pot B. (2008).** The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu G., Luquet, F. M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, 1-152.
323. **Prescott L., Harley J. P., Klein D. A. (1995).** Microbiologie, 2<sup>ème</sup> Édition. De Boeck-Wesmael, Bruxelles, Belgique, 1014.
324. **Prescott L. M. (2002).** VIII Ecology and Symbiosis. In *Microbiology*. Fifth edition. The McGraw–Hill Companies, 596-697.
325. **Prescrire (2003).** Coût de recherche et développement du médicament: la grande illusion, 23(244):782-87.
326. **Priest F. G., Goodfellow M., Todd C. (1981).** The genus *Bacillus*: a numerical analysis. In *the aerobic endospore-forming bacteria: classification and identification* ed. Berkeley R.C.W., Goodfellow M. New York, Academic Press, 91-103.
327. **Priest F. G. (1977).** Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriological reviews*, 41(3):711-753.
328. **Priest F. G. (1981).** DNA homology in the genus *Bacillus*, in: *The aerobic endospore forming bacteria* (Berkeley R.C.W and Goodfellow M). Academic press, London.
329. **Prieur D., Erauso G., Geslin C., Lucas S., Gaillard M., Bidault A., Mattenet A., Rouault K., Flament D. (2004).** Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions*, 32(2):184-187.
330. **Proth J., Mouray A., Kilbertus G. (1979).** Milieux à base de muscle pour la numération des microorganismes protéolytiques. *Separatum experianta*, 2:1542-1525.

331. **Puri S., Beg Q. K., Gupta R. (2002).** Optimisation of alkaline protease production from *Bacillus sp.* by response surface methodology. *Current Microbiology*, 44:286-290.
332. **Qadar S., Erum S., Samina I., Abida A. (2009).** Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus sp.* *Indian Journal Biotechnology*, 8:286-290.
333. **Queipo-Maria I., Juan-De-Dios C., Manuel M., Maria J. B., Pilar M. (2007).** Preparation of Bacterial DNA Template by Boiling and Effect of Immunoglobulin G as an Inhibitor in Real-Time PCR for Serum Samples from Patients with Brucellosis. *Clin Vaccine Immunology*, 15(2):293-296.
334. **Quiberoni A., Rezaiki L., El Karoui M., Biswas I., Tailliez P., Gruss A. (2001).** Distinctive features of homologous recombination in an old microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res. Microbiol.*, 152:131-139.
335. **Rahman R.N.Z.R.A., Geok L. P., Basri, M., Saleeh A. B. (2005).** An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K, nutritional factors affecting protease production, *Enz. Microb. Technol.*, 36:749-757.
336. **Rai S. K., Mukherjee A. K. (2010).** Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwi-prase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochem. Eng. J.*, 48:173-180.
337. **Ramalho R., Cunha J., Teixeira P., Gibbs P. A. (2002).** Modified pseudomonas agar: new differential medium for the detection/ enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. *J. Microbiol. Meth.*, 49: 69-74.
338. **Ranganathan B., Wessels D., Jooste P. J., Mostert J. F. (1984).** Technologically important characteristics of *Enterococcus* isolated from milk, and dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.*, 10:349-352.
339. **Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3):597-625.
340. **Raynaud S. (2006).** Régulation métabolique et transcriptionnelle de l'autoacidification chez *Lactococcus lactis*. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat, 826-309.
341. **Reddy S. T., Kumar N. S., Venkateswerlu G. (1998).** Comparative analysis of intracellular proteases in sporulated *Bacillus thuringiensis* strains. *Biotechnology Letters*, 20(3):279-281.

342. **Reginald T., Monod M. A., Faith Y. K., Jatou-Ogay R. (1975).** The secreted protease of *Aspergillus* and their possible role in virulence. *Can. J. botany.*, 73(1):1081-1086.
343. **Rodrigues U. M., Aguirre M., Facklam R. R., Collins M. D. (2014).** Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J. Appl. Bacteriol.*, 71:509-516.
344. **Rodriguez J. M. (2011).** Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *Int.J. Food. Microbiol.*, 133:105-112.
345. **Ruiz F. O., Gerbaldo G., Asurmendi P., Pascual L. M., Giordano W., Barberis I. L. (2009).** Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr. Microbiol.*, 59:497-501.
346. **Sachveda V., Tyagi R.D., Valéro J.R. (1999).** Factors affecting the production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides. *Recent Research Developments in Microbiology*, 3: 363-375.
347. **Sadek M. (2000).** Études des protéases bactériennes dans les boues d'eaux usées. Travail dirigé 1.INRS-ETE., 1-32.
348. **Salminen S., Von Wright A., Morelli L., Marteau P., Brassart D., De Vos W. M., Fonden R., Saxelin M., Collins K., Mogensen G., Birkeland S. E., Mattila-Sandholm T. (2004).** Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food. Microbiol.*, 44: 93-106
349. **Salminen S., Wright A.V., Ouwehand A.C. (2012).** Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects Third edition Taylor & Francis Group. Boca Raton London New York.
350. **Sambrook J., Russel D.W. (2001).** Molecular cloning: A Laboratory Manuel. Cold Spring Harbor Laboratory Press.Cold Spring. New York.
351. **Sangeetha R., Geetha A., Arulpandi I. (2010).** Concomitant production of protease and lipase by *Bacillus licheniformis* VSGI : production, purification and characterization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41.
352. **Schmidt T.M ., Bleakley B., Neilson K. H. (1988).** Characterization of an extracellular protease from the insect pathogen *Xenorhobdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 :2793-2797.
353. **Scriban R. (1993).** Biotechnologie. 4ème édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris, 30-695.



354. **Secades P., Guijarro J. A. (1999).** Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9):3969-3975.
355. **Sharipova M. R., Shakirov E. V., Balaban N. P., Gabdrakhmanova L. A., Shilova M.A., Rudenskaya G. N., Leshchinskaya I. B. (2000).** The cellular location of proteolytic enzymes of *Bacillus intermedius*. *Microbiology (Moscow)*, 69:660-667.
356. **Sharma R., Chisti Y., Banerjee U. C. (2001).** Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19:627-662.
357. **Shen D. K., Filopon D., Chaker H., Boullanger S., Derouazi M., Polack B., Toussaint B. (2008).** High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology*, 154:2195-2208.
358. **Shukla Pratyosh., Brett I. (2013).** *Advances in Enzyme Biotechnology*. Springer India, 147-165.
359. **Sikati-Foko V., Vidyarthi A. S., Tyagi R. D., Valéro J. R. (2001).** Synthèse des protéases extracellulaires à partir des boues d'épuration par quelques espèces de *Bacillus*. *INRS-ETE*, 22.
360. **Sokol M., Kawaharajo K. J., Homma Y., Aoyama K., Morihara K. (1979).** Effects of protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *Jpn. J. Exp. Med.*, 45:79-88.
361. **Stackebrandt E., Ludwig W., Weizenegger M. (1987).** Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murein types of round-spore-forming bacilli and non spore-forming relatives. *J. Gen. Microbiol.*, 133:2523-2529.
362. **Stackebrandt E., Teuber M. (1988).** Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70:317-324.
363. **Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. (1960).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43:159-271.
364. **Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. (1966).** The aerobic pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43:159-271.
365. **Stets M. I., Pinto A. S., Huergo L. F., de Souza E. M., Guimaraes V. F., Alves A. C., Steffens M. B., Monteiro R. A., Pedrosa F. O., Cruz L. M. (2013).** Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. *J Biotechnol.*, 165:167-174.

366. **Stiles M. E., Holzapfel W. H. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Microbiol.*, 36:1-29.
367. **Sutra L., Rise Áde J. M., Gardan L. (2000).** Isolation of fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31:289-293.
368. **Sutra L., Rise Áde J. M., Gardan L. (2000).** Isolation of fluorescent *Pseudomonas* from the rhizosphere of banana plants antagonistic towards root necrosing fungi. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31:289-293.
369. **Takagi H., Kondon M., Hisatsuka T., Nakamori S., Tsai Y. C., Yamasaki M. (1992).** Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. *J. Agric. Food. Chem.*, 40:2364-2368.
370. **Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2013).** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28:2731-2739.
371. **Thanh N. T. (1978).** Untersuchungen zur regulation der amylase bildung durch *Penicillium citrium* and der protease bildung durch *Bacillus cereus var. Mycoides*. *Dissection. Technol.*, 8:547-548.
372. **Thomas T.D., Mills O.E. (1981).** Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 15 : 255-273.
373. **Todorov S. D., Dicks L. M. T. (2009).** Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*, 132:117-126.
374. **Tourneur C. (1972).** Aptitude à la protéolyse des lactobacilles présents dans les fromages et les lactosérums de fromagerie. *Le Lait*, 2 :149-174.
375. **Traidej M., Marquart M. E., Caballero A. R., Thibodeaux B. A., O'Callaghan, R. J. (2003).** Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocesing and activation. *J. Biol. Chem.*, 278:2549-2553.
376. **Trap C., Boireau P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.*, 31:461-471.
377. **Tryfinopoulou P, Tsakalidou E, Nychas G. J. (2002).** Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:65-72.

378. **Ul-Haq I., Mukhtar H., Daudi S., Sikander A., Quadeer M. A. (2003).** Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions. *Biotechnology*, 2(1): 30-36.
379. **Vahmanpera J., Nyberg P. M. A., Tanner R., Pohjonen E., Bergelin R., Korhola M. (1987).** Industrial production of protease by genetically engineering *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.*, 9:546-549.
380. **Van Behen J. B., Li Z. (2002).** Enzyme technology: an overview. *CUIT ent Opinion in Biotechnology*, 13:338-344.
381. **Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. (1996).** Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, 60:407-438.
382. **Varela H., Ferrari M. D., Belobradjic L., Weyrauch R., Loperena M. L. (1996).** Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promoshing unhairing activity. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 12:643-645.
383. **Verstraete W. (2002).** Environmental biotechnology for sustainability. *Journal of Biotechnology*, 94:93-100.
384. **Visca P., Imperi F., Lamont I. L. (2007).** Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends. Microbiol.*, 15:22-30.
385. **Ward O. P. (1983).** Proteinases in: *Microbial Enzymes and Biotechnology* (Fogarty, W.M). Applied science publishers: New York, 512.
386. **Ward O. P. (1985).** Proteolytic enzymes. In *comprehensive Biotechnology*, edited by M. Moo-Young. Pergamon Press. Great Britain, 789-818.
387. **Weisburg W. G., Dobson M. E., Samuel J. E., Dasch G. A., Mallavia L. P., Baca O., Mandelco L., Sechrest J. E., Weiss E., Woese C. R. (1991).** Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J. Bacteriol.*, 171(8):4202-4206.
388. **Wilderman P. J., Vasil A. I., Johnson Z., Vasil, M. L. (2001).** Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol. Microbiol.*, 39:291-303.
389. **Wilson S. A., Peek K., Daniel R. M. (1994).** Immobilization of a proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus Rt41A*. *Biotechnol. Bioeng.*, 43:225-231.

390. **Woese C. R., Kandler O., Wheelis, M. L. (1990).** Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4576-4579.
391. **Wu X. Y., Mark J., Walkerb M. H., James C. (2006).** Development of a groupspecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. Journal of Microbiological Methods, 64:107-119.
392. **Xu D., Benjamin M., Côté J. C. (2003).** Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S Rdna and 5' end 16S – 23S ITS nucleotide sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbio., 53:695-704.
393. **Yezza A., Ty Agi R. D., Valéro J. R., Surampalli R. Y., Smith J. (2004).** Scale-up of biopesticide production processes using wastewater sludge as a raw material. Journal of Indian Microbiology and Biotechnology, 31:545-552.
394. **Yezza A., Tyagi R. D., Valéro J. R., Surampalli R. Y. (2005).** Wastewater sludge pretreatment for enhancing entomotoxicity produced by *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, accepté le 17 janvier 2005. Article sous presse.
395. **Yilmaz M., Soran H., Beyati Y. (2005).** Determination of polyhydroxybutirate production by some *Bacillus spp.* J. Microb & Biotech., 21:565-566.
396. **Zaunmüller T., Eichert M., Richter H., Uden G. (2006).** Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. Appl. Microbiol. Biotechnol., 72:421-429.
397. **Zouari N., Jaoua S. (1999).** The effect of complex carbon and nitrogen, salt, Tween-80 and acetate on delta-endotoxin production by a *Bacillus thuringiensis subsp kurstaki*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23:497-502.
398. **Zourari A., Roger S., Chabanet C., Desmazeaud M. J. (1991).** Caractérisation des bactéries lactiques thermophiles isolées de yaourts artisanaux grecs. 1. Souches de *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*. Le Lait, 11:445-461.

# **ANNEXES**

---

## Annexe A

## Composition des milieux de culture utilisés

## ❖ Gélose nutritive (GN) :

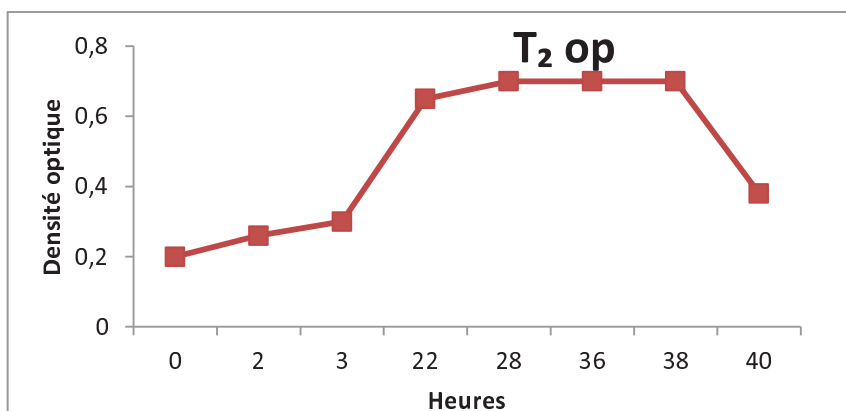
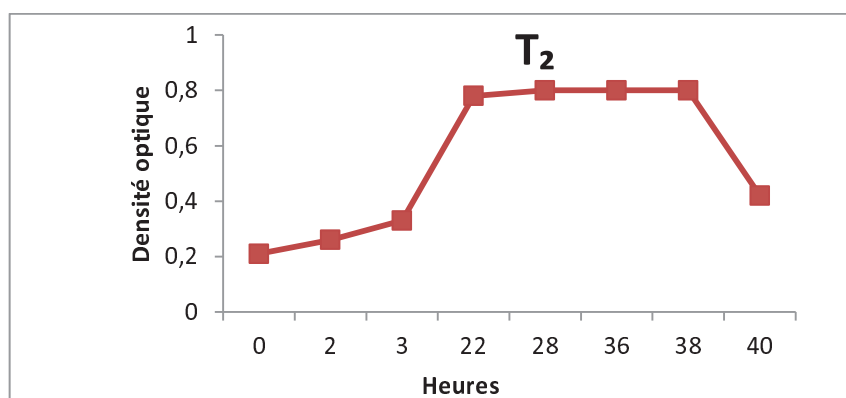
Peptone.....	5g / l
Extrait de levure.....	2g / l
Extrait de viande.....	1g / l
Chlorure de sodium.....	5g / l
Agar.....	5g / l
Eau distillée.....	1000 ml

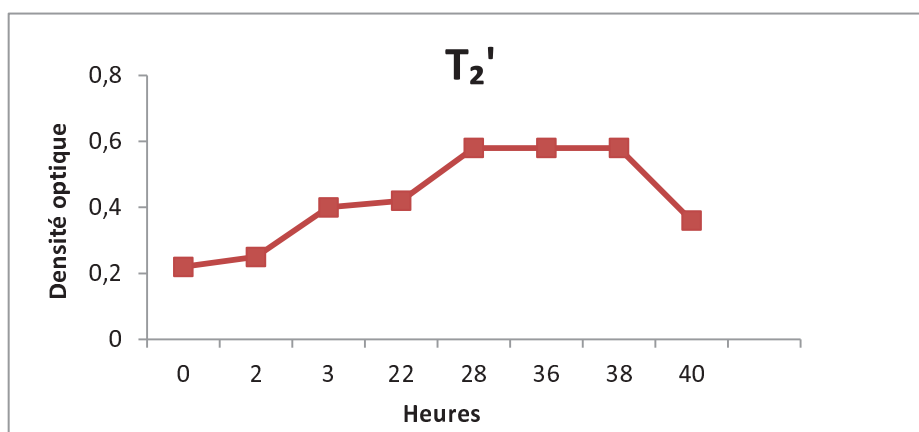
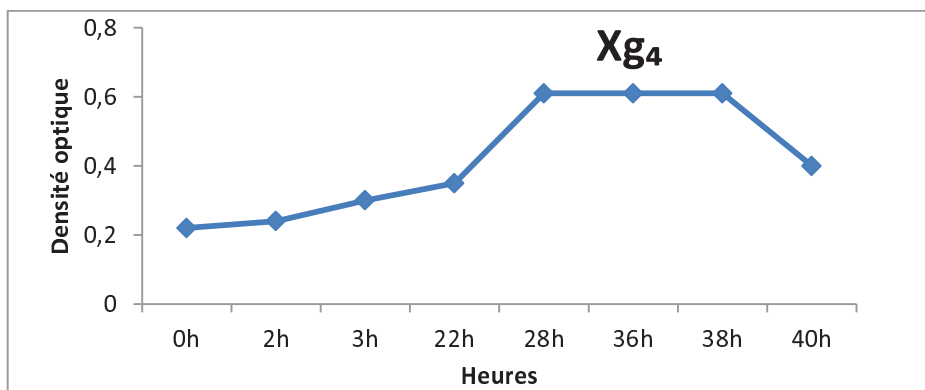
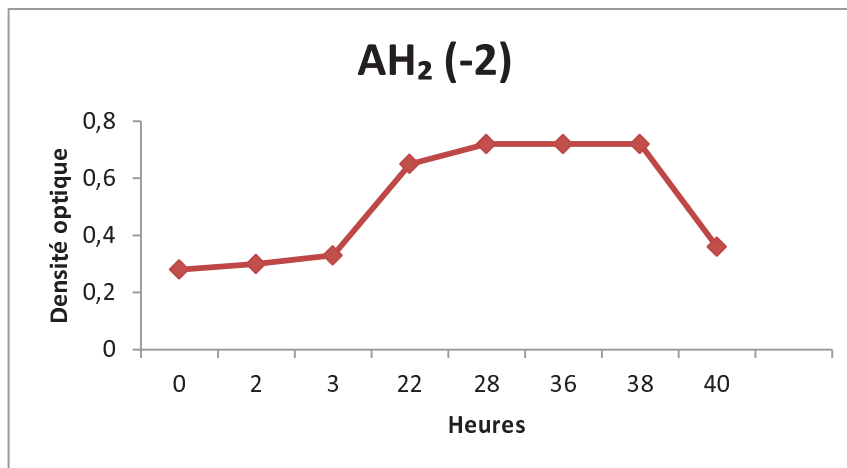
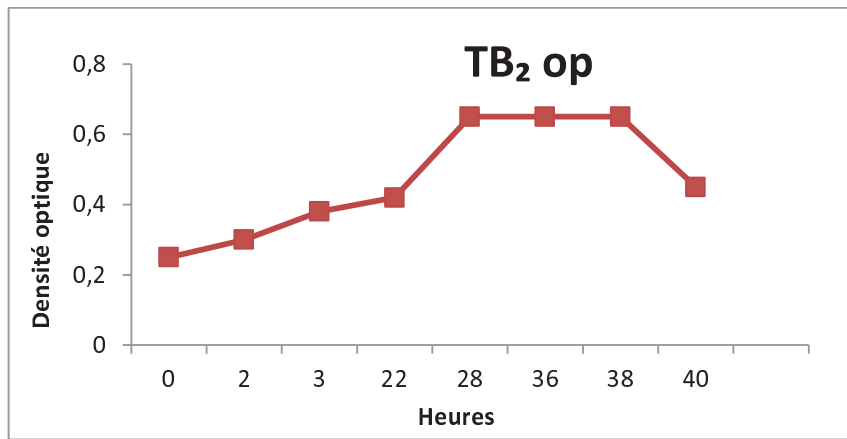
## ❖ Milieu (TGEA) :(Tryptone, glucose, extrait de levure, agar)

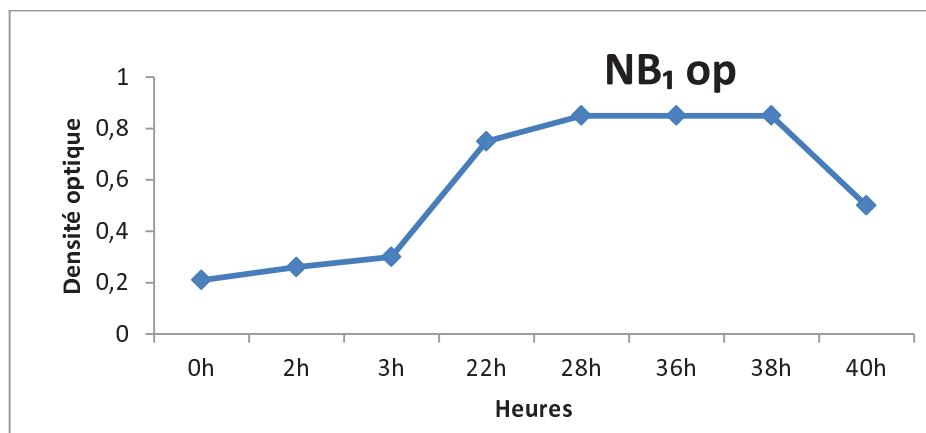
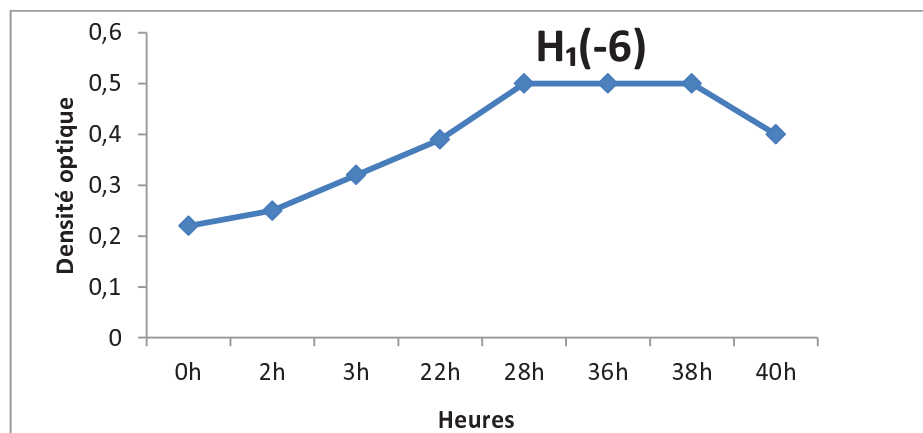
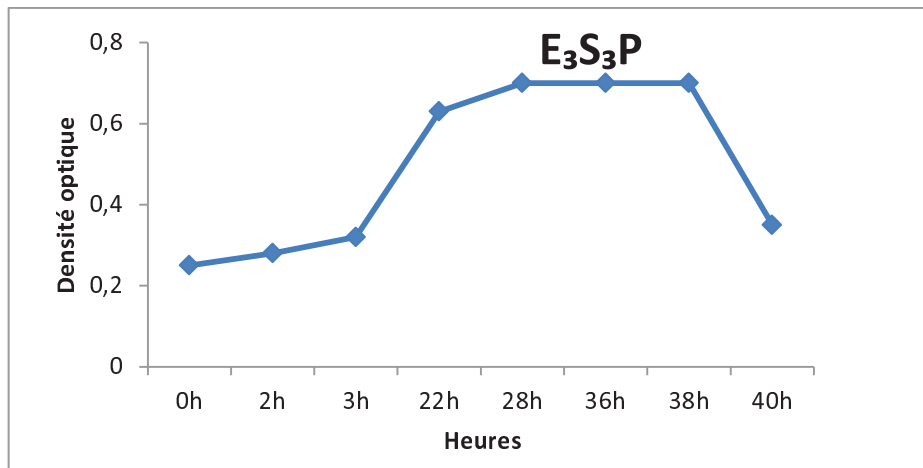
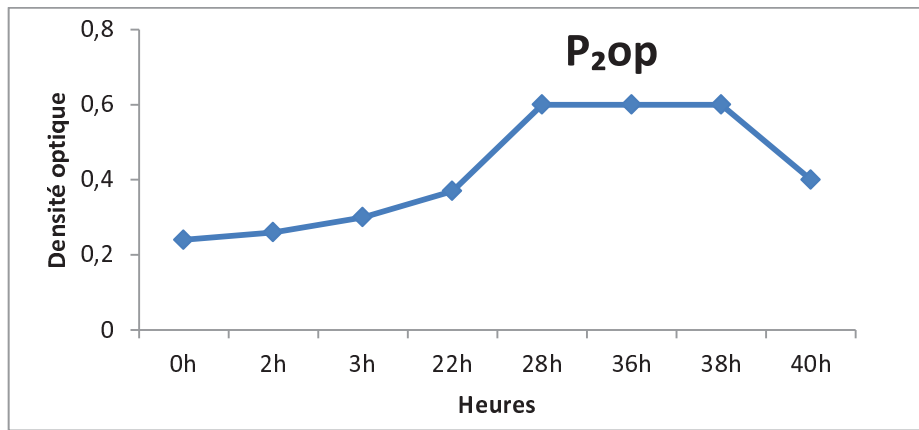
Tryptone.....	5g / l
Extrait de levure.....	2,5/ l
Glucose.....	1g / l
Agar.....	15g / l
Eau distillée.....	1000 ml

## Annexe B

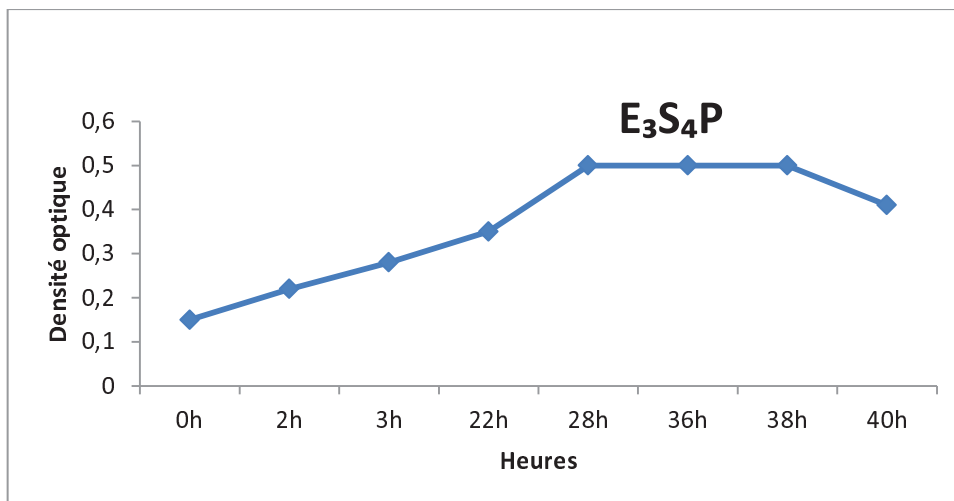
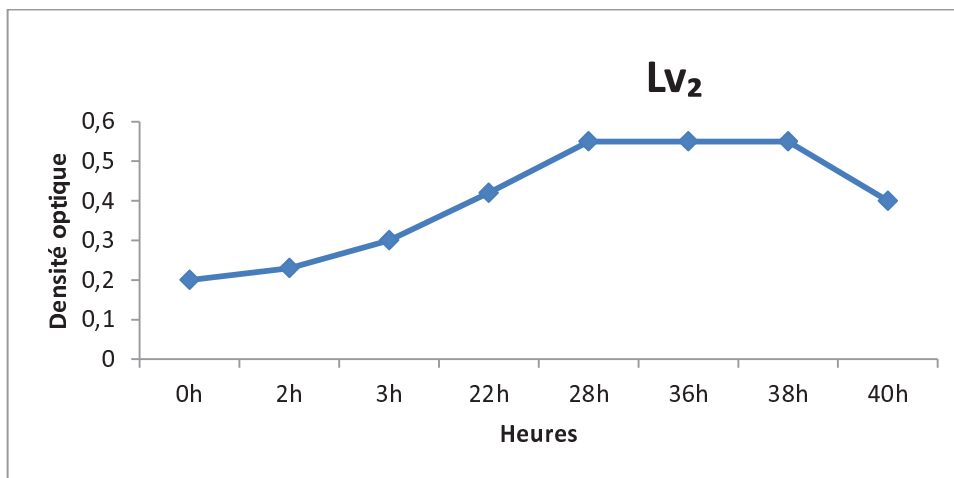
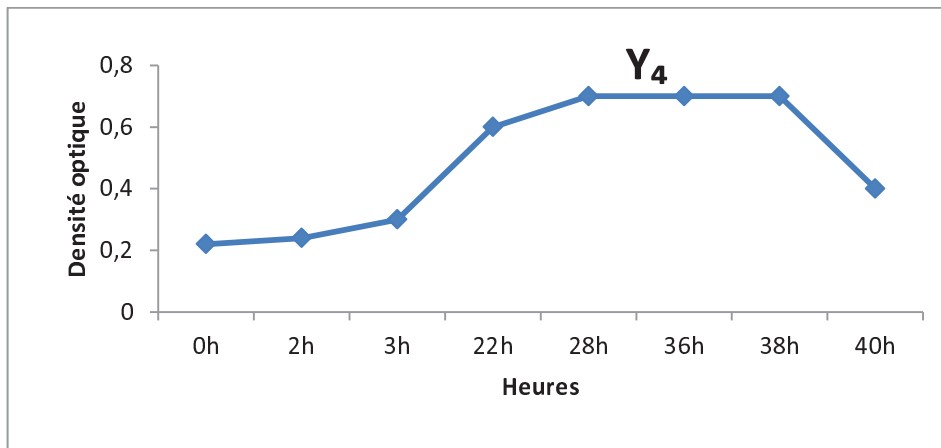
## Cinétique de croissance des souches isolées, sélectionnées productrices de la protéase

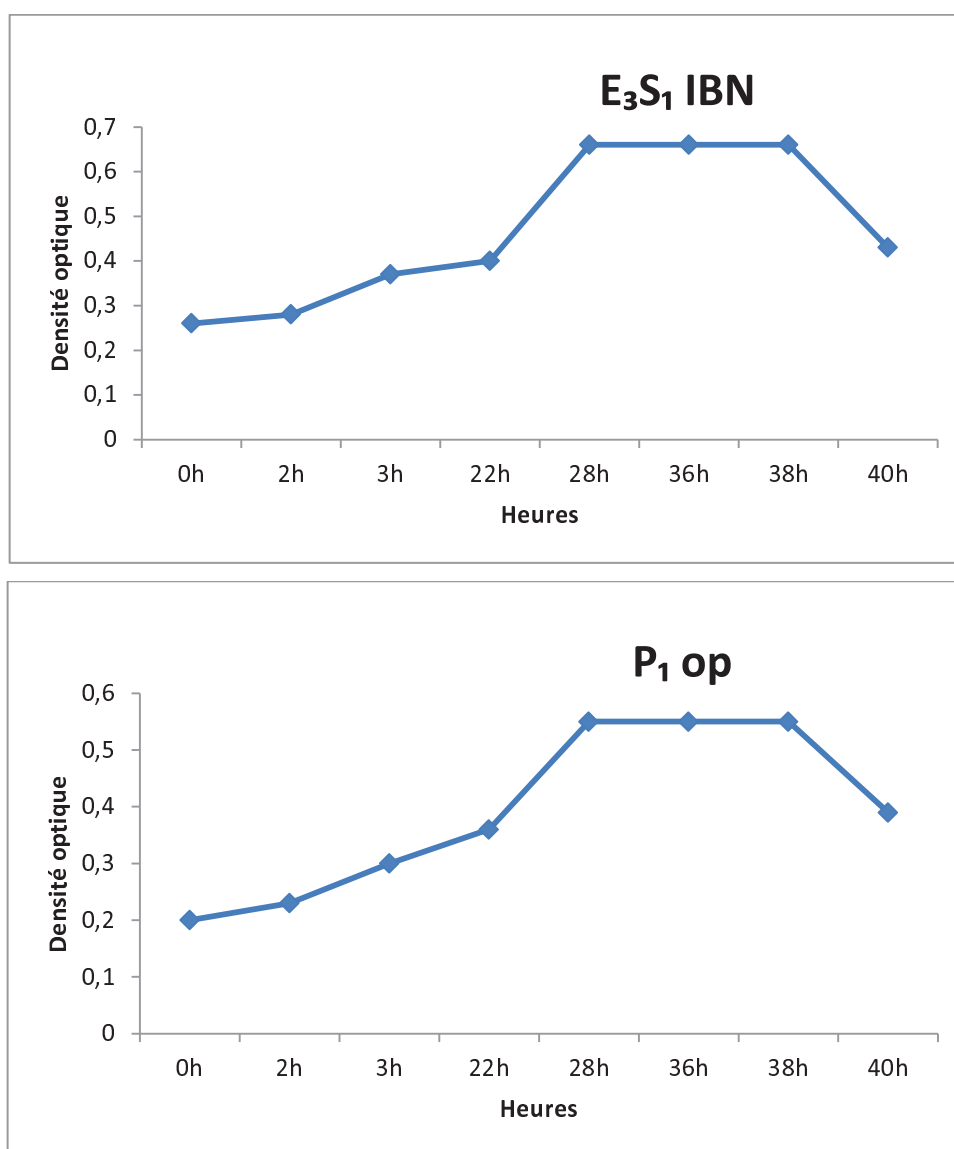












### Annexe C

#### Préparation des solutions pour la mesure de l'activité protéolytique

❖ **Solution d'acide borique (0,20 M)**

(12,41 g d'H<sub>2</sub>Bo<sub>3</sub> + 14,41 g Kcl + 1 litre d'H<sub>2</sub>O distillé stérile).

❖ **Solution de soude (0,20 M)**

(8 g de NaoH + 1 litre d'H<sub>2</sub>O distillé stérile).

❖ **Solution du borate à pH 8,2**

100 ml ( Kcl et H<sub>2</sub>Bo<sub>3</sub>) + 11,8 ml de NaoH.

❖ **Solution de caséine (1,2%)**

1,2 g de caséine dilué dans 100 ml du tampon borate à pH 8,2.

❖ **Solution de TCA (30%)**

30 g de TCA + 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillé stérile.

## Annexe D

## 1. Base de données pour galerie Api 20E

Espèce	ANAEROBIOSE																										
	GNPG	ADH	LDC	COX	CITRATE	SIMMONS	H2S	URE	TDA	INDOLE	VP	GELATINASE	GLUCOSE	MANNITOL	INOSITOL	SORBITOL	RHAMNOSE	SACCHAROSE	MELIBIOSE	AMYGDALINE	ARABINOSE	OXYDASE	NITRITES	MOBILITE	LECITHINASE		
<i>anaer</i>	100	80	0	0	0	0	75	0	50	99	99	1	50	1	1	1	50	50	1	0	25	90	0	0	0	0	
<i>amyloliquefaciens</i>	0	85	0	0	0	75	0	0	0	50	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	95	90	0	0	0	0	
<i>antiaris</i>	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99	90	99	1	1	1	1	99	50	1	1	0	99	0	0	96	0	
<i>brevis</i>	0	25	5	0	0	70	7	3	0	0	57	40	1	1	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	0	
<i>centrum</i>	7	1	1	1	1	50	1	1	1	1	99	50	99	50	50	1	1	50	50	1	50	90	50	0	0	0	
<i>ceruus</i>	100	0	85	0	1	80	1	50	0	0	60	99	99	1	1	1	50	50	1	1	0	78	90	90	96	0	
<i>ceruus (ferredox)</i>	100	0	2	0	1	99	14	0	0	0	99	99	99	1	1	1	99	50	1	1	0	85	90	90	96	0	
<i>circulans</i>	50	80	2	0	0	30	4	4	0	4	30	16	99	99	50	1	50	99	50	99	99	0	16	90	0	0	
<i>complexus</i>	100	99	0	0	0	0	0	0	0	0	99	50	99	50	50	50	99	50	50	50	0	50	90	0	0	0	
<i>firmus</i>	0	21	7	0	0	99	0	0	0	0	71	99	99	99	1	1	99	50	1	1	0	50	90	0	0	0	
<i>litoregicus (?)</i>	100	0	0	0	0	75	0	0	0	50	50	99	99	99	1	1	1	50	50	1	0	75	90	0	0	0	
<i>lentus</i>	0	98	2	0	0	60	1	50	0	0	30	30	99	99	1	1	50	50	99	50	1	0	0	90	0	0	
<i>lichiniformis</i>	100	99	99	0	0	77	0	3	0	0	80	99	99	99	50	99	99	99	99	50	99	99	0	87	90	0	
<i>maerosus</i>	100	99	26	0	0	30	0	0	0	0	73	50	99	99	50	50	99	99	50	99	99	0	36	90	0	0	
<i>metapheticum (?)</i>	0	83	0	0	5	77	0	0	0	0	88	77	99	99	99	50	1	99	50	99	99	0	77	90	0	0	
<i>mycoides</i>	7	43	56	6	0	93	0	18	0	0	99	99	99	1	1	1	50	50	1	0	50	1	0	50	1	0	0
<i>parvichlorus</i>	100	25	0	0	0	20	0	10	0	0	0	50	99	50	50	99	99	99	1	0	20	90	0	0	0	0	
<i>posteri</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50	1	1	0	99	90	0	0	0	
<i>polymyx</i>	100	99	0	0	0	52	0	0	0	0	99	95	99	99	1	1	50	99	50	99	99	0	71	90	0	0	
<i>prunus</i>	0	99	4	0	0	86	0	0	0	0	99	95	99	99	50	1	99	50	99	99	0	25	90	0	0	0	
<i>sphaericus</i>	0	1	0	0	0	60	0	25	0	0	43	37	1	1	1	1	50	1	1	0	10	90	0	0	0	0	
<i>stereothemophilus 1</i>	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	50	50	50	1	99	50	1	50	0	50	90	0	0	
<i>stereothemophilus 2</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	99	50	99	1	99	50	99	50	0	50	90	0	0	
<i>stereothemophilus 3</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12	93	99	1	1	1	99	50	1	1	0	1	90	0	0	0	
<i>subtilis</i>	0	95	5	0	0	89	0	5	0	0	99	95	99	99	99	1	99	50	99	99	0	94	90	0	0	0	
<i>thermophilus</i>	100	99	1	1	1	99	99	99	1	99	50	99	99	99	1	99	50	99	1	0	50	90	0	0	0	0	
<i>thermophilus (?)</i>	100	1	99	0	0	99	0	0	0	0	0	99	99	99	1	1	1	50	50	1	1	0	99	90	0	96	0

## 1. Base de données pour galerie Api 50CHB

Espèce	Api 50 CHB V4.0																										
	GLY : 1	ERY : 2	DARA : 3	LARA : 4	RIB : 5	DXYL : 6	LXYL : 7	ADO : 8	MDX : 9	GAL : 10	GLU : 11	FRU : 12	MNE : 13	SBE : 14	RHA : 15	DUL : 16	INO : 17	MAN : 18	SOR : 19	MDM : 20	MDG : 21	NAG : 22	AMY : 23	ARB : 24	ESC : 25		
<i>aerobactilis aeruginifluus</i>	50	0	0	9	33	9	0	0	0	33	33	33	9	0	0	0	0	0	0	9	0	9	0	9	9	9	
<i>aerobactilis</i>	49	1	0	1	99	1	0	0	0	0	100	79	2	0	0	0	1	0	1	0	0	99	0	79	9	0	
<i>axillus aerus 1</i>	74	0	1	1	99	1	0	0	1	8	100	99	26	0	1	0	1	1	1	1	3	97	30	99	96	0	
<i>axillus aerus 2</i>	11	1	0	0	77	1	0	0	0	3	100	99	1	0	0	0	0	0	0	0	0	99	0	43	6	0	
<i>axillus aerolans</i>	48	0	18	96	80	98	1	1	68	94	100	97	97	1	45	1	20	89	20	32	64	84	99	96	10	0	
<i>axillus complexus</i>	71	0	4	47	66	52	0	1	1	98	100	100	98	1	42	1	9	28	39	4	66	100	71	76	8	0	
<i>axillus firmus</i>	41	0	0	4	20	7	0	0	0	1	88	50	11	0	0	0	1	66	2	0	2	63	1	4	5	0	
<i>axillus lentus</i>	40	0	1	50	55	10	0	0	0	10	55	95	95	0	40	17	1	80	17	1	35	82	65	82	98	0	
<i>axillus lichiniformis</i>	90	1	1	99	97	87	1	1	1	75	100	100	99	8	32	1	69	99	92	1	99	62	99	99	10	0	
<i>axillus megastriatum</i>	80	1	1	87	86	76	1	1	1	82	100	99	28	1	8	1	55	97	39	3	30	87	73	80	5	0	
<i>axillus mycoides</i>	20	0	0	1	98	1	0	0	0	28	100	99	4	0	0	0	1	4	1	0	1	99	42	80	7	0	
<i>axillus prunus</i>	72	1	1	88	97	65	0	0	0	49	99	100	99	1	14	1	11	99	2	37	27	64	62	98	10	0	
<i>axillus subtilis</i>	89	0	0	36	97	97	0	0	0	36	100	100	75	0	45	0	2	100	2	0	89	0	0	2	2	0	
<i>subtilis / Amorphiliquefaciens</i>	77	0	0	84	91	56	0	0	0	12	95	98	87	1	1	1	65	95	86	0	83	29	70	80	10	0	
<i>axillus non testée</i>	1	1	0	1	1	2	0	1	1	2	6	10	2	1	1	0	2	9	1	1	1	24	1	1	1	1	
<i>axillisus apti</i>	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	42	42	0	0	0	0	21	94	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>axillisus litoregicus</i>	72	0	0	1	61	20	0	0	0	0	98	98	66	0	1	0	1	61	5	0	1	98	30	88	9	0	
<i>axillisus con tractive</i>	13	0	0	1	8	2	0	0	1	0	23	19	1	0	1	1	3	22	1	0	1	6	1	6	1	2	
<i>axillisus stereothemophilus</i>	45	0	0	4	17	1	0	0	0	25	100	98	98	1	0	1	1	10	4	0	50	4	1	4	3	0	
<i>axillisus thermophilus</i>	36	0	0	47	68	73	0	0	0	31	100	95	95	0	63	0	4	63	26	0	63	73	31	31	8	0	
<i>axillisus aerophilus</i>	100	0	0	0	100	0	0	0	0	28	87	3	28	0	0	0	40	0	0	0	50	96	71	87	10	0	
<i>axillisus amyloliquefaciens</i>	76	0	0	84	84	100	0	0	0	93	100	100	100	0	53	0	1	99	0	46	100	93	100	100	10	0	
<i>axillisus glycerotholus</i>	61	0	28	100	100	99	11	0	72	88	88	100	88	0	29	11	14	94	11	20	94	100	100	100	10	0	
<i>axillisus aeris</i>	73	0	46	100	93	100	0	26	66	100	100	100	99	0	0	6	6	99	6	6	98	100	100	100	10	0	
<i>axillisus macerosus</i>	77	0	51	99	82	99	1	1	82	100	100	100	99	0	58	0	11	93	22	22	77	40	97	99	10	0	
<i>axillisus polymyx</i>	83	0	2	93	100	97	0	0	83	97	100	99	97	0	2	0	1	99	0	6	71	46	100	100	10	0	
<i>axillisus thermophilus</i>	94	0	0	0	87	0	0	0	22	0	100	100	94	94	0	0	58	0	0	0	35	70	70	87	98	9	
<i>axillisus viduus</i>	91	0	0	6	100	93	0	0	6	100	100	100	43	0	0	0	85	100	100	6	0	100	0	0	0	0	
<i>axillisus amorphiliquefaciens</i>	65	0	14	1	0	1	0	0	0	1	84	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	10	0

## Annexe E

## Electrophorèse des protéines sur gel d'acrylamide

## ❖ Préparation du LSDB 500 Mm

1 ml NaCl à 5 M + 5ml LSDB 2X + 100 µl NP 40 à 10% + 10 µl DTT 1M + Tablet complète + H<sub>2</sub>O qsp 3,89 ml. Stoker à 4°C.

## ❖ Préparation du LSDB 2X

20 l glycérol 100% + 600 µl MgCl<sub>2</sub> à 0,5 M + 5ml + 50 ml HEPES 1M + H<sub>2</sub>O qsp 24,4 ml Stoker à température ambiante et ajuster le pH à 7,4.

## ❖ Préparation du Bleu SDS 2X

900 ml bleu SDS 4X + 100 ml 2- Mercaptoethanol.

## ❖ Extraction des protéines solubles et insolubles

- Centrifuger 5 ml d'une culture de nuit à 4000 rpm /5mn/ 4°C.
- Resuspendre le culot dans 500 du LSDB (500 mM) et on laisse 10 mn dans la glace.
- Lyse mécanique par l'ajout de billes en verre par vortex durant 2 mn à une vitesse maximale.
- Mettre les tubes un par un dans la glace.
- Centrifugation 10 mn/1400 rpm/ 4 C°.
- Récupération du surnagent contenant les protéines soluble.
- Rajout de 100 ml du bleu SDS 2X Sur le culot contenant les protéines insoluble.
- Conservation des protéines soluble et non soluble à (-80°C).

## ❖ Dosage des protéines par la méthode Bradford

=BECKMAN COULTER AD340 S Quick Mode:												
Date	: 1/1/98 00:03					Date of Evaluation	: 1/1/98 00:02					
						Page	: 1					
Legend	OD Status					Test-Information	Filter : 570 nm					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.293 OK	0.358 OK	0.432 OK	0.524 OK	0.681 OK	0.882 OK	1.026 OK	0.032 OK	0.033 OK	0.052 OK	0.032 OK	0.033 OK
B	0.318 OK	0.379 OK	0.451 OK	0.517 OK	0.699 OK	0.900 OK	1.036 OK	0.032 OK	0.032 OK	0.044 OK	0.032 OK	0.031 OK
C	0.376 OK	0.383 OK	0.410 OK	0.396 OK	0.446 OK	0.354 OK	0.413 OK	0.397 OK	0.374 OK	0.389 OK	0.350 OK	0.474 OK
D	0.448 OK	0.425 OK	0.459 OK	0.415 OK	0.524 OK	0.382 OK	0.475 OK	0.460 OK	0.389 OK	0.420 OK	0.374 OK	0.534 OK
E	0.492 OK	0.435 OK	0.032 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.032 OK	0.037 OK	0.032 OK	0.031 OK
F	0.523 OK	0.473 OK	0.034 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.034 OK	0.033 OK	0.033 OK	0.032 OK	0.032 OK	0.032 OK	0.032 OK
G	0.032 OK	0.055 OK	0.036 OK	0.406 OK	0.034 OK	0.401 OK	0.408 OK	0.451 OK	0.507 OK	0.033 OK	0.605 OK	0.617 OK
H	0.388 OK	0.390 OK	0.412 OK	0.390 OK	0.433 OK	0.368 OK	0.409 OK	0.550 OK	0.373 OK	0.388 OK	0.352 OK	0.462 OK

## ❖ Préparation des échantillons pour électrophorèse

Echantillon	[pro]µg/µl	Vol pro (µl)	Vol Ho <sub>2</sub> (µl)	Vol Bleu (µl)
T <sub>2</sub>	0,49	102	17	40
AH <sub>2</sub> (-2)	0,59	84,74	34,26	40
P <sub>1</sub> op	0,53	94,33	24,67	40
Xg <sub>4</sub>	0,49	102	17	40
P <sub>2</sub> op	0,62	80,64	38,35	40
E <sub>3</sub> S <sub>3</sub> P	0,43	116,2	2,8	40
AH <sub>1</sub> (-6)	0,58	86,2	32,8	40
NB <sub>1</sub> op	1,87	26,73	92,27	40
Y <sub>4</sub>	0,45	111,11	7,89	40
LV <sub>2</sub>	0,49	102	17	40
T <sub>2</sub> op	0,42	119	0	40
E <sub>3</sub> S <sub>4</sub> P	0,65	76,92	42,08	40
T <sub>2</sub> '	2,38	21,55	97,45	40
TB <sub>2</sub> op	2,05	24,39	94,61	40

## ❖ Préparation de la solution du bleu et ajustement des concentrations

- 900 µl du tampon (Laemmli sample buffer biorad 4x) + 100µl du 2-Mercaptoethanol.
- Le volume de la protéine à prélever est calculer comme suit : pour une concentration de 50 µg.

$$0,42 \mu\text{g} \longrightarrow 1 \mu\text{l}$$

$$50 \mu\text{g} \longrightarrow 119 \mu\text{l}$$

- Tous les échantillons sont ajustés à une concentration de 119 µl.

## ❖ Tampon pou électrophorèse

NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X) dont on prépare 400 ml.

400ml /20X  $\longrightarrow$  20ml du tampon + 280 ml H<sub>2</sub>O.

## ❖ Bleu de comassie (1L)

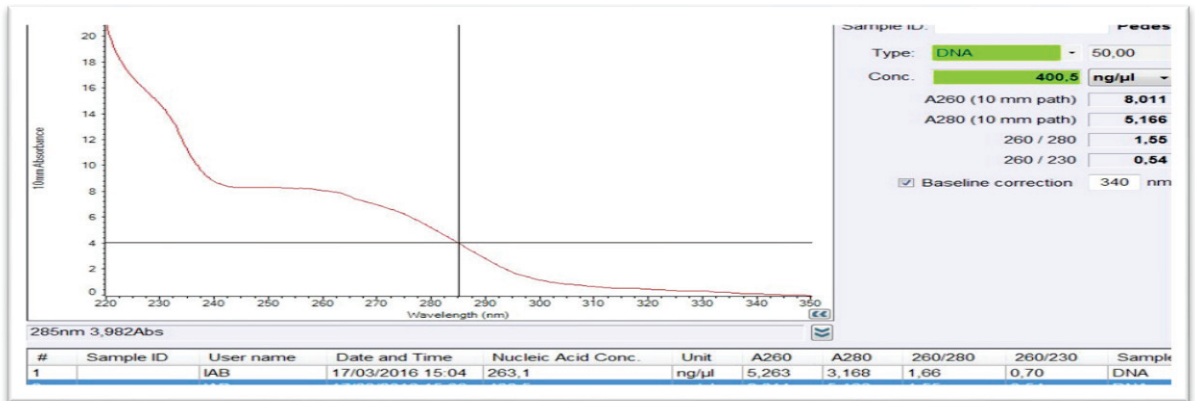
- 2g du bleu de comassie (Brillant Blue R250)
- 10% acide acétique.
- 20% éthanol

## ❖ Décoloration du bleu de comassie

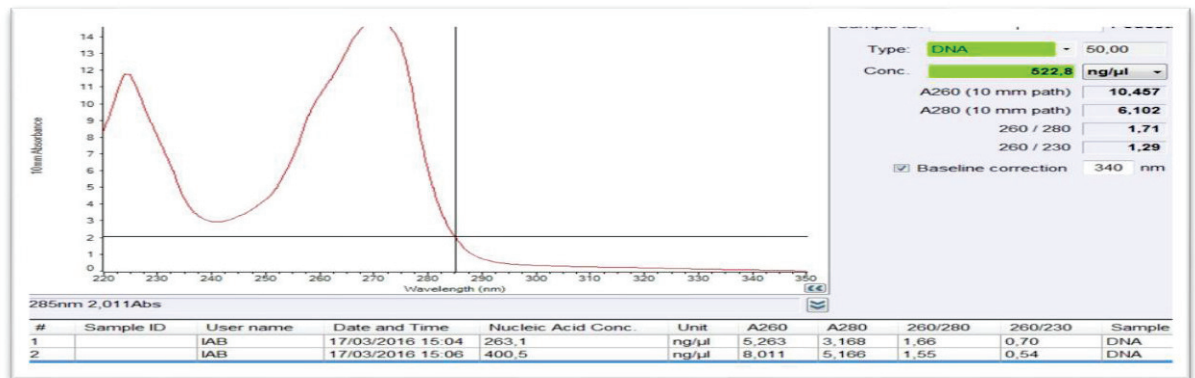
- 10% acide acétique  $\longrightarrow$  100 ml
  - 20% méthanol  $\longrightarrow$  200ml
- } 700 ml H<sub>2</sub>O.

## Annexe F

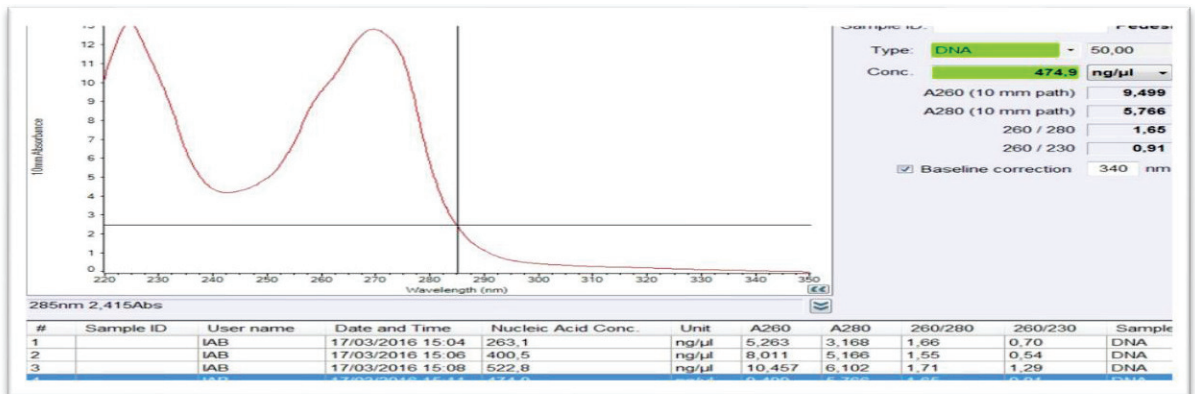
### Captures d'écran des courbes d'absorbance en fonction de la longueur d'onde



T<sub>2</sub>'

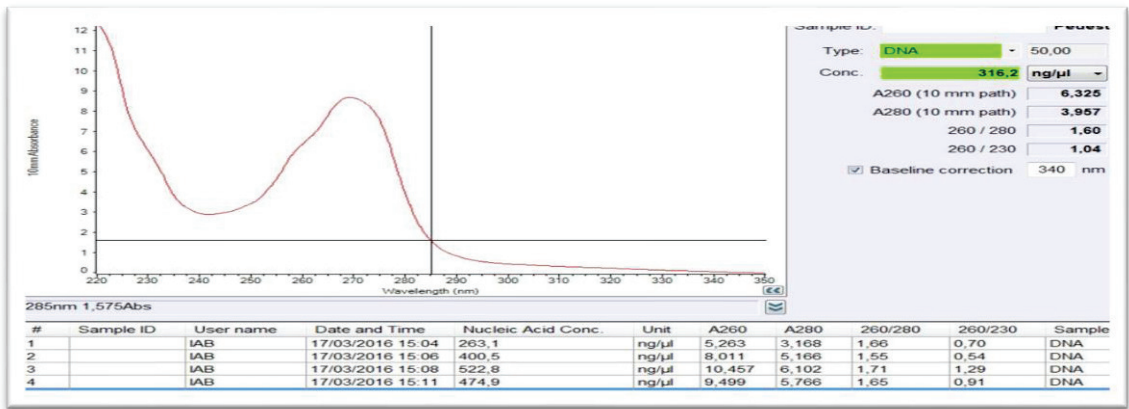


AH<sub>2</sub> (-2)

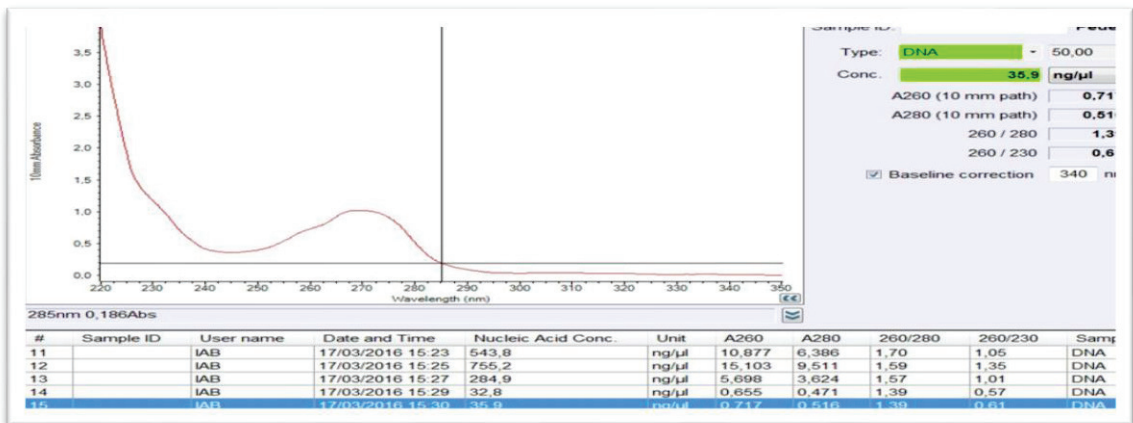


P<sub>1</sub> op

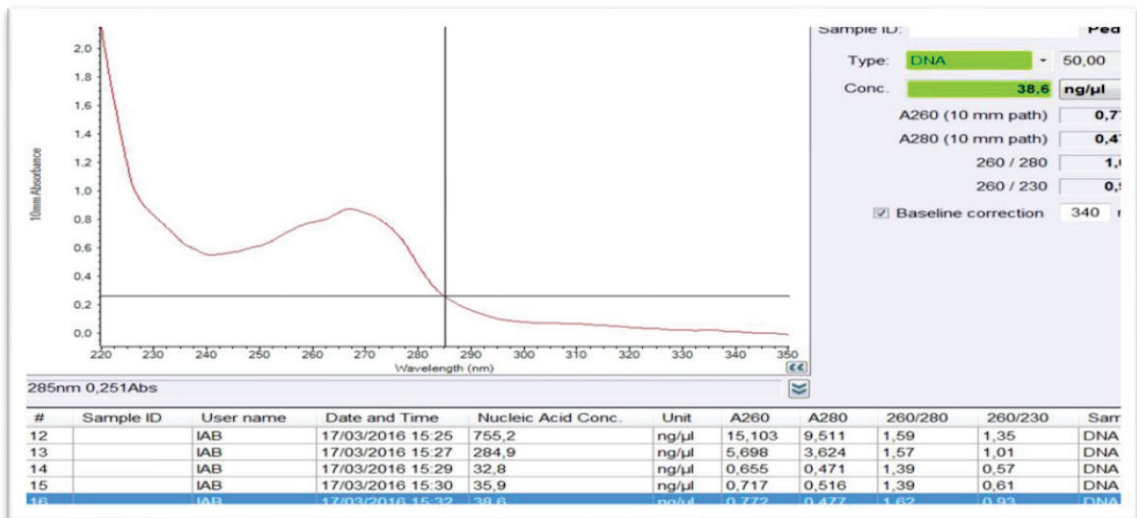




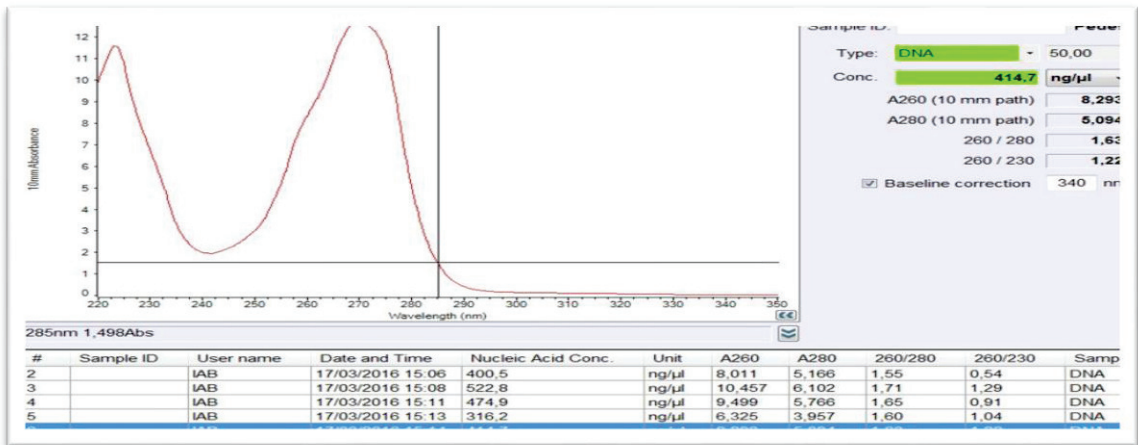
Xg<sub>4</sub>



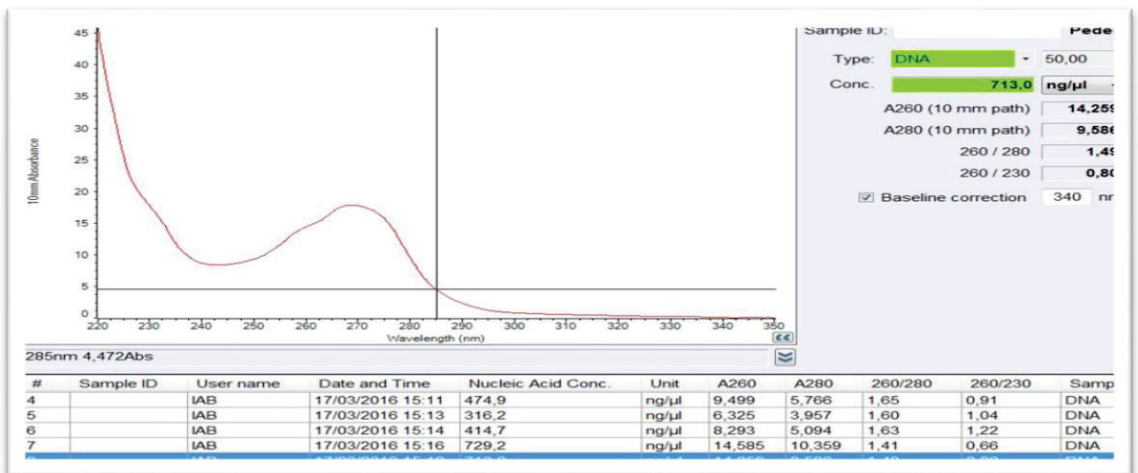
P<sub>2</sub> op



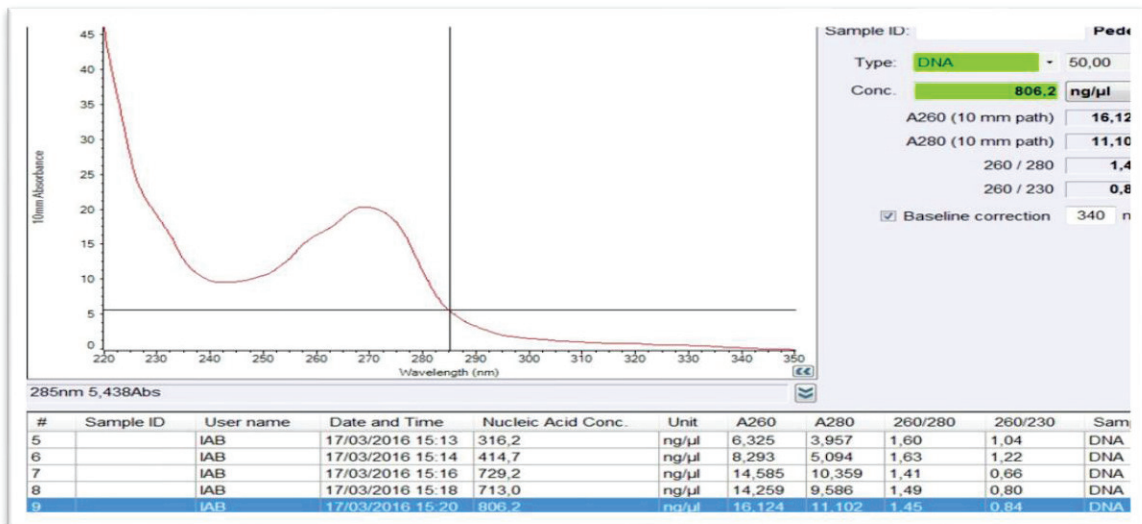
T<sub>2</sub>



E<sub>3</sub>S<sub>3</sub>P

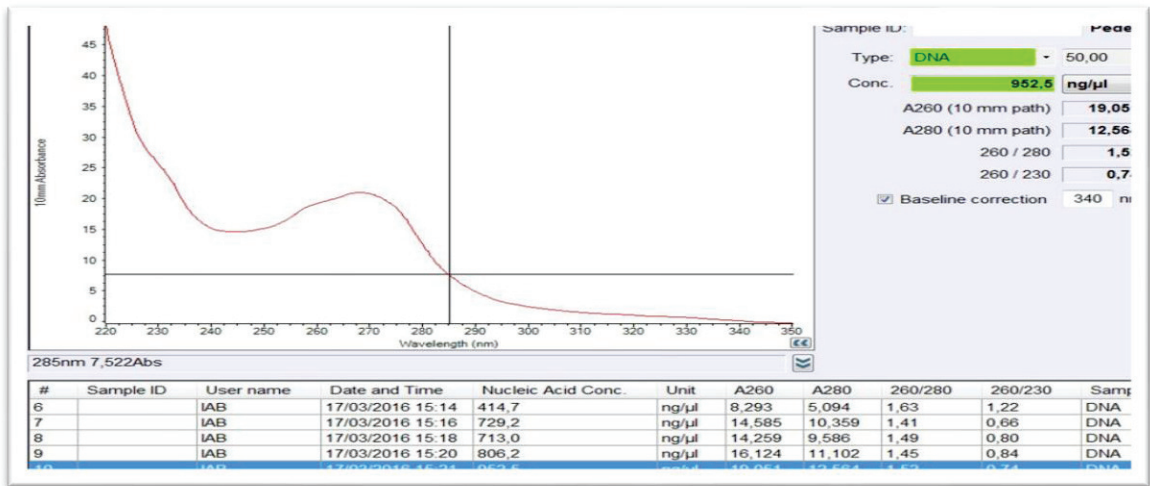


H<sub>1</sub> (-6)

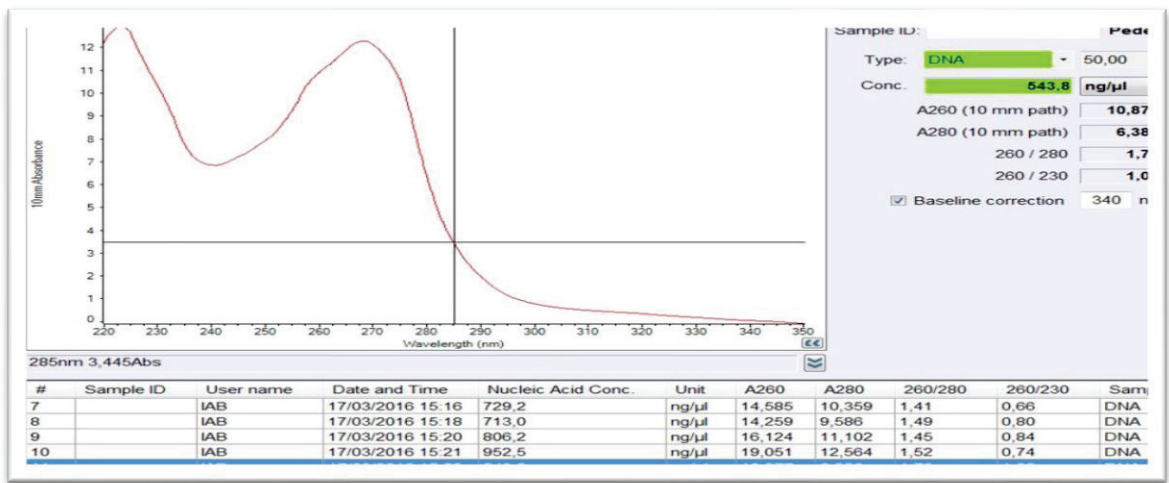


NB<sub>1</sub> op

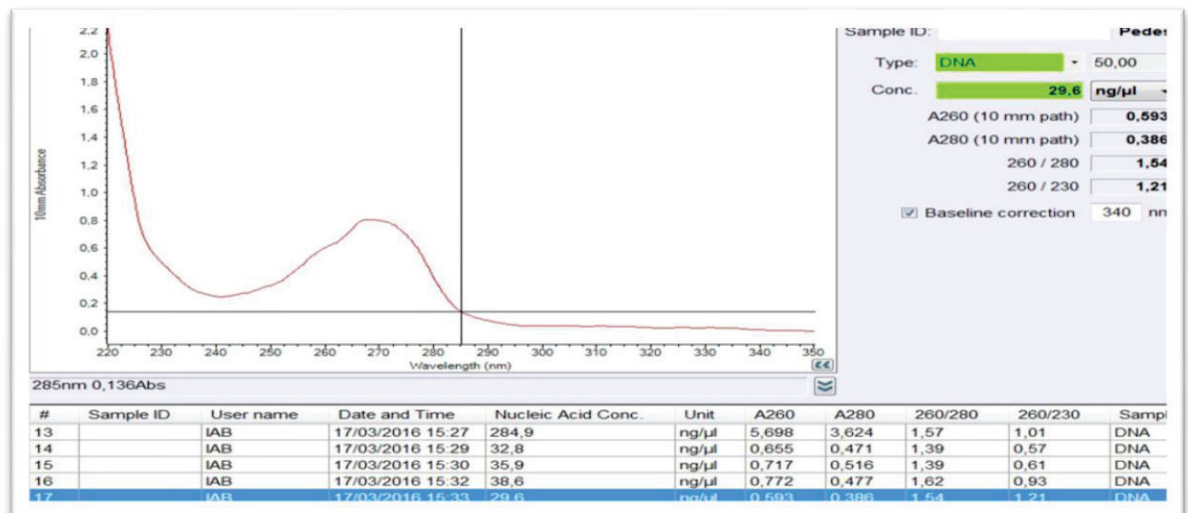




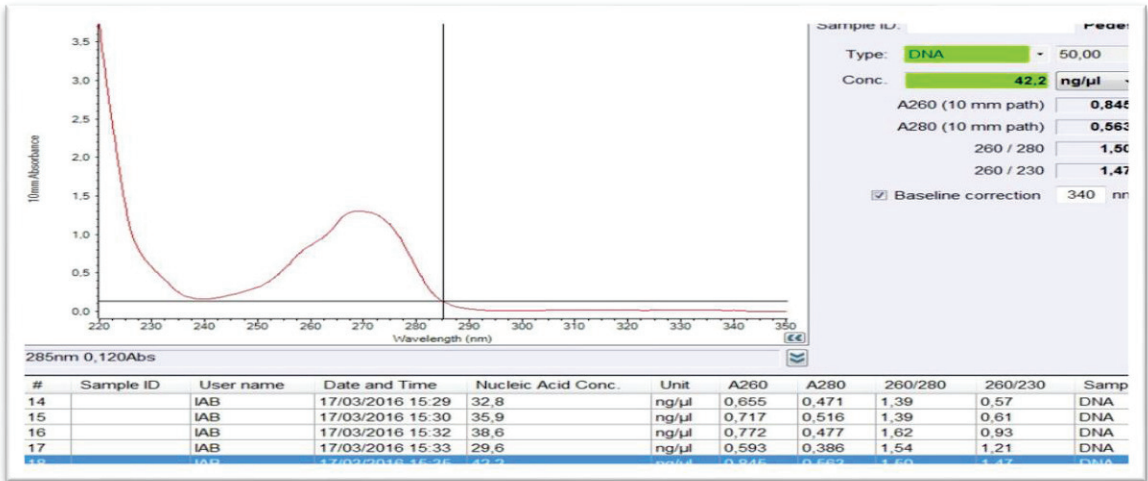
Y<sub>4</sub>



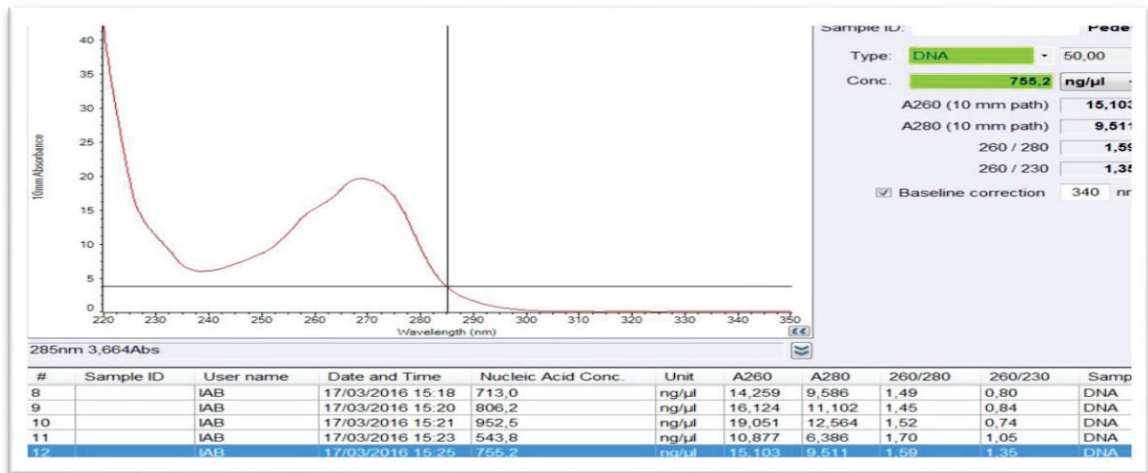
LV<sub>2</sub>



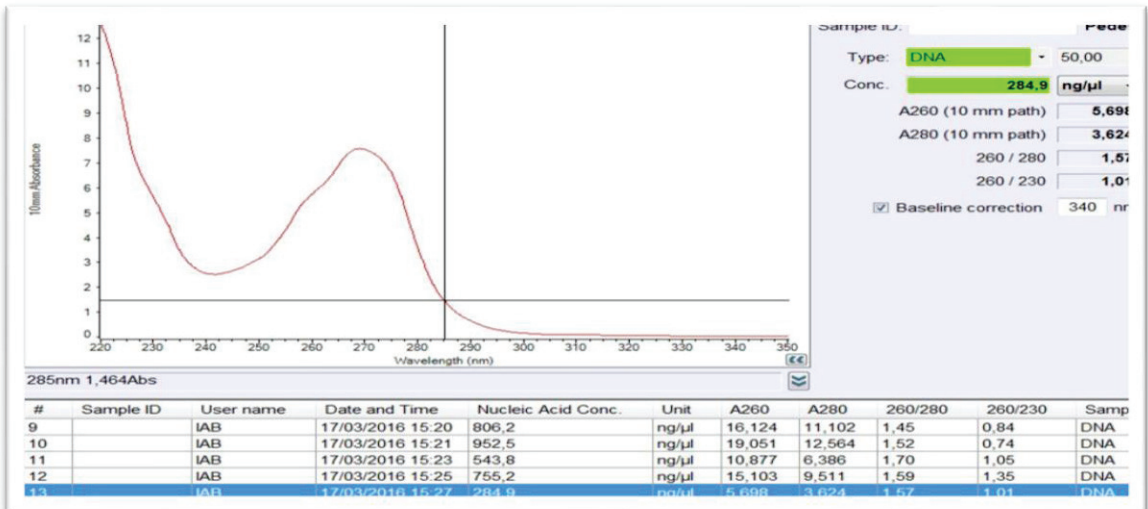
T<sub>2</sub> op



E<sub>3</sub>S<sub>4</sub>P



E<sub>3</sub>S<sub>1</sub> IBN



TB<sub>2</sub>op

## *Travaux réalisés dans le cadre de la thèse*

### *Publication*

**Boukhtache H., Reffas FZI., LarbiDaouadji K., Hassaine O., Boussouar F., Allem R., Laradj Zazou K., Boudjemaa H and Abbouni B.** Production of Protease by *Enterococcus faecium* E745 and *Enterococcus faecium* PSB5 isolated from protein rich soils. *Der Pharmacia Lettre*, (2017), 9 (5):177-187.

### *Séminaire colloques et journées scientifiques*

- ❖ Séminaire international des Biotechnologie. Constantine, le 19, 20, et 21 Octobre 2015. Communication affiché, intitulé «Isolement et identification de quelques souches de *bacillus* productrices de protéases à partir des sols riches en protéines». **Auteurs :** Boukhtache H, Abbouni B, Allem R.
- ❖ Premier Séminaire National 'Biologie et Santé' (1er SNBS) le 14 décembre 2015, Université Djillali Liabes de Sidi-Bel-Abbès, intitulé : «Production et étude des protéases produites par quelques souches bactériennes isolées à partir des sols riches en protéines». **Auteurs :** Boukhtache H, Abbouni B, Allem R.
- ❖ Première conférence international sur l'écologie microbienne (The 1st International Conference Microbial Ecology:An important Challenge for future Sétif-Algeria, le 12 et 15 Décembre, 2015, intitulé : «Research of the proteolyticpotentialfromstrains of *Bacillus* genusisolated in soilsrich in protein». **Auteurs :** Boukhtache H, Abbouni B, Allem R.
- ❖ VII èmes journées scientifiques de la faculté des sciences de la nature et de la vie organisées, les 26 et 27 Avril 2017, intitulé « Optimisation des conditions de culture pour la production des protéases extracellulaire à partir de quelques souches bactériennes isolées des sols riches en protéines. **Auteurs :** Boukhtache H, Abbouni B, Allem R.