



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne démocratique et populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

جامعة زيان عاشور – الجلفة

Université Ziane Achour – Djelfa

كلية علوم الطبيعة والحياة

Faculté des sciences de la nature et de la vie



Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master

En Microbiologie Appliqué

Thème

Criblage d'activité protéases chez des Archaea Halophiles

Présente par : Taza Habiba et Zitouni Nadjat.

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

Président :	Mr Khodja. k	MAA	UZA-Djelfa
Promoteur :	Mr Boutaiba. S	MCA	UZA-Djelfa
Examineur :	Mr Belaouni H.A.	MAA	UZA-Djelfa
Examineur :	Mr Mahi. M	MAA	UZA-Djelfa

Année universitaire 2018/2019

Sommaire

Liste de figures

Liste des arômes

Problématique

Introduction

Partie I : revue bibliographiques

1- Généralité.....	2
2- Les archées halophiles.....	3
3- Ecologie.....	4
4- Mécanisme d'adaptation.....	4
5- Enzymes des halophiles.....	5
1- Protéases halophiles.....	5
1-1 intérêt de production en biotechnologie.....	6

Partie II : matériel et méthode.

1- Origine de souches.....	8
2- Etude microbiologique.....	8
2-1 Revivification des souches.....	9
2.2- Préparation de milieu de culture.....	9
3- Isolement des isolats.	
3-1. Ensemencement.....	9
3-2. Test de criblage.....	10
3-2-1. criblage de l'activité protéolytique sur milieu solide	10
3-2-2. criblage de l'activité protéolytique sur milieu liquide	10
4- Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique.	
1- Cinétique de croissance.....	11
2- Mesure de l'activité protéolytique	11
5- Production et caractérisation de l'activité protéolytique	
1- Production de protéasE	11
2- Test de localisation.....	11
6- Caractérisation préliminaire des protéases.	
6.1 Effet de NaCl sur l'activité protéolytique .	

6.1.1- Dessalage par dialyse.....	13
6.1.2 – test de salinité	13
6.1.3-test différentiel.....	15
6.1.4- test de confirmation.....	15
6.1.5- cinétique de dialyse.....	16
6.2- Effet de pH sur l'activité protéolytique	16
6.3-Effet de température sur l'activité protéolytique.....	16
6.4-test de thermo-stabilité de l'enzyme.....	16
6.5-Test d'EDTA.....	17
6.5.1-Préparation de la solution EDTA.....	17
6.5.2-Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique.....	17

Partie III : résultat et discussion

1- Revivification des souches.....	19
2- Criblage des isolats pour de l'activité protéolytique.	
2.1- criblage sur milieu solide.....	20
2.2- criblage sur milieu liquide.....	20
3- Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique.	
3.1- Cinétique de croissance	21
3.2- Test d'activité protéolytique.....	22
4- Production et caractérisation de l'activité protéolytique.	
1- Production de protéase	25
2- Test de localisation.....	25
5- Caractérisation des protéases.	
5.1- Cinétique de dialyse.....	26
5.2- Effet de NaCl sur l'activité protéolytique.....	26
5.3- teste de confirmation.....	28
5.4- Effet de pH sur l'activité protéolytique.....	29
5.5-Effet de température sur l'activité protéolytique.....	31
5.6- La thermo-stabilité de l'activité protéolytique de l'enzyme	33
5.7-Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique.....	36
Discussion	37
Conclusion	38
Référence bibliographique	39

Annexe.

Résumé.

Liste des figures.

Liste des arommes.

Liste des figures

Tableau01: Classification des micro-organismes selon leur réponse aux sels.....	2
Tableau02: Tableau comparatif entre les trois domaines du vivant	3
Figure 03 : Organigramme des étapes de test de localisation	12
Figure 04 : Les différents tests de caractérisation partielle de l'enzyme.....	13
Figure 05 : Schéma générale de la pratique.....	18
Figure 06 : l'apparition des colonies bactériennes dans les boites de Pétri des souches cultivées	19
Figure 07 : Croissance des isolats cultivés.....	19
Figure 08: Test d'activité des souches C, Rs42, 24, Sb41 selon la méthode de diffusion sur gélose....	20
Figure 09: la croissance de souche C3 dans milieu de culture MSH après l'incubation.....	21
Figure 10: Mise en évidence de l'activité protéolytique.....	22
Figure 11: courbe de résultat de l'activité protéolytique et la densité optique de la souche C3.....	24
Figure 12: résultat de test de localisation autour le surnagent et le culo.....	25
Figure 13: Résultat du test de salinité effectué sur le dialysat (obtenu en utilisant une membrane avec un Cut-off de 14 KDa)	27
Figure 14: Résultat de test de confirmation.....	28
Figure 15: Résultat de la cinétique de dialys	29
Figure 16 : Effet de ph sur l'activité protéolytique (- : témoin)	30
Figure 17 : Effet de PH sur l'activité protéolytique	31
Figure18 : Effet de température(⁰ C) sur l'activité protéolytique.....	32
Figure 19: courbe de l'effet de température sur l'activité protéolytique.....	33
Figure 20: Thermo-stabilité de l'activité protéolytique à 70 C°.....	35
Figure 21: courbe Thermo-stabilité de l'activité protéolytique à 70C°	36
Figure 22: Effet d'EDTA sur l'activité protéolytique.....	37

Liste des Abréviations

CaCl₂ : Chlorure de calcium

Cm : centimètre.

°C : degré Celsius.

DO : densité optique.

EDTA : Ethylène diamine tétra antiacide.

MSH : milieu spécifique aux halophiles.

g: Gramme.

g/l : gramme par litre.

Mm: millimètre.

ml : millilitre.

Rpm :Rotation par minute.

pH : potentiel hydrogène.

t/mn : tours par minutes.

H : heure.

µl : microlitre.

%: pourcentage.

Pour répondre aux besoins actuels dans différents domaines, la recherche s'oriente de plus en plus aux techniques de pointe liées aux innombrables potentiels des microorganismes.

D'après Costenaro (2001), les microorganismes qui se développent dans les biotopes hostiles sont globalement qualifiés d'extrêmophiles. Parmi ces derniers on trouve les halophiles qui se développent dans des environnements où la concentration en sels approche de la saturation appelé les environnements hypersalins.

Ces halophiles peuvent être à l'origine d'applications technologiques potentielles des plus prometteuses ; non seulement parce que certaines d'entre elles produisent des molécules qui ont un intérêt pour l'industrie (enzymes, polymères ou osmoprotectants) mais surtout parce qu'elles présentent des propriétés physiologiques qui peuvent faciliter leur exploitation à des fins commerciales (Cayol et *al*, 2011).

L'une des applications biotechnologiques les plus importantes de ces halophiles est centrée sur la production de l'hydrolase extracellulaire telle que la protéase qui ont des utilisations potentielles variées en sciences biomédicales et industrielles etc.

Les cas qui intéressent l'Algérie sont les biotechnologies relatives à la dépollution des milieux sinistrés par les hydrocarbures et à différents secteurs industriels, pharmaceutiques et alimentaires etc.

Aussi est-il intéressant de pouvoir produire des enzymes de ce type à partir des milieux hyper-salins, et de ce fait nous avons dans le cadre de notre master 2 procédé à une étude des isolats de bactéries halophiles provenant d'échantillons prélevés par nos condisciples Morsli, Meliani, Beladel et Chemma lesquels ont fait la collection à Zahrez el Gharbi et Rocher de Sel dans la région de Djelfa.

Les microorganismes extrêmophiles vivent dans des environnements qui réunissent des conditions physico-chimiques hostiles à la vie. Ces conditions comprennent la température, le pH, la pression, la radiation, la dessiccation et la salinité.(Lynn et *al.*,2001). Néanmoins, il y'a un grand intérêt envers l'étude de ces microorganismes de la part de la communauté scientifique en raison de leurs caractéristiques biotechnologiques. Les microorganismes extrêmophiles sont une source d'extrêmozymes avec une grande variété d'applications industrielles dues à leur stabilité dans les conditions extrêmes (Dumorné et *al.*,2017). Les environnements hypersalins ayant une concentration en sels supérieure à celle de l'eau de mer sont des habitats extrêmes, couvrant une bonne partie de la surface de la terre. (RodríguezValera, 1980).

Les microorganismes halophiles vivant dans ces environnements sont une source de biomolécules qui peuvent avoir de nombreuses applications intéressantes notamment dans la décontamination des eaux usées hypersalées (Lefebvre et Moletta, 2006). Parmi les biomolécules synthétisées dans ces milieux hypersalins, se trouvent des enzymes. Le potentiel industriel des enzymes halophiles réside dans leur capacité à être actives et stables sous une basse activité de l'eau et dans beaucoup de cas, aussi en présence des solvants organiques, et à des pH et des températures élevées (Munawar et Engel, 2013).

Le sujet développé dans le cadre de ce travail concerne le criblage de souche halophile productrice d'enzyme extracellulaire d'intérêt biotechnologique et cela par la mise en évidence des activités enzymatiques protéolytique, ainsi que l'étude de leur stabilité aux traitements physico-chimiques. Le développement de la biotechnologie repose sur la recherche de nouvelles enzymes robustes qui résistent et restent stables et actives dans les conditions extrêmes.

Dans la première partie, nous trouverons la synthèse bibliographique qui comprend les archées halophiles et les protéases halophiles. La deuxième partie est consacrée à la

r
t

PARTIE 1

REVUE BIBLIOGRAPHIE

1. Généralités

Les halophiles présentent une grande diversité phylogénétique. On les trouve parmi les trois domaines du vivant : Archaea, Bacteria et Eucarya. Les virus sont aussi plus abondants dans les environnements hypersalins. (Oren., 2002 ;Atanasova et *al.*, 2015.).Le terme halophile est couramment utiliser pour désigner les organismes qui ont besoin de quantités substantielles en sel qui est presque toujours le NaCl. Les microorganismes halophiles sont classés sur la base de leur niveau d'exigence et de tolérance en sel. (Kushner., 1993). (Tableau I).

Tableau 1: Classification des micro-organism+es selon leur réponse aux sels.

(Oren., 2013).

Catégorie	Propriétés	Exemple
non-halophile	Se développe mieux dans un milieu contenant moins de 0.2 M de sel	La plus part des bactéries d'eau douce
Légèrement halophile	Se développe mieux dans milieu contenant 0.2-0.5 M de sel	La plus part des bactéries marines
Halophile modère	Se développe mieux dans un milieu contenant 0.5-2.5 M de sel	<i>Salinivibrio costicola</i> <i>Halmonas elongata</i>
Halophile extrême limite	Se développe mieux dans un milieu contenant 1.5-4 M de sel	<i>Halorhodospira halophila</i>
Halophile extrême	Se développe mieux dans un milieu contenant 2.5-5.2 M de sel	<i>Halobacterium salinarum</i> <i>Salinibacter ruber</i>
Halotolérant	Non halophile qui peut tolérer le sel , si la gamme de croissance s'étend de 2.5 M en sel , il peut considérer halotolérant extrême	<i>Staphylococcus aureus</i>

2. Archaea halophiles

Les halophiles du domaine Archaea appartiennent à trois familles : *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. La famille des *Halobacteriaceae* de l'ordre *Halobacteriales*, de classe *Halobacteria* sont des halophiles extrêmes, qui requièrent au moins 1.5M du NaCl pour leur croissance. Plus de 40 genres et plus de 150 espèces d'*Halobacteriaceae* ont été décrites. Les représentants de cette famille sont en général des aérobies qui utilisent les substrats organiques comme source de carbone et d'énergie. Quelques espèces de *Halobacteriaceae* sont des polyextrémophiles qui combinent la capacité de se développer aux concentrations élevés en sel, à des pH extrêmes et parfois à des températures élevées. (Yachai., 2009 ;Amoozegar et al., 2015 ; Christon et al., 2016).

Les Archaea se distinguent des deux autres domaines de la vie : Eucarya et Bacteria par des caractéristiques qui lui sont propres. (Tableau II).

Tableau2 : Tableau comparatif entre les trois Domaines du vivant. (Besse.,2016).

Caractéristique	Archaea	Bactéria	Eucarya
Taille	0.1 à 15 µm	0.1 à 15 µm	Supérieur à 5 µm
Noyau	Non	Non	Oui
Organites	Non	Non	Oui
Paroi cellulaire	Couches S	Couches S	Absente
Membrane			
Liaisons glycérol-lipide	Ether	Ester	Ester
Squelette phosphat Des lipides	Glycérol-3-Phosphate	Glycérol-1-phosphate	Glycérol-3-phosphate
Méthanogènese	Oui	Non	Non
Machinerie central de la transcription	Types eucaryote	bactéries	Eucaryote
Facteurs d'élongation de la traduction	Types Eucaryote	bactéries	Eucaryote

3. Écologie

Les archées halophiles extrêmes sont des microorganismes extrémophiles qui exigent des concentrations en sel très élevée pour croître, ils sont présents dans les environnements hypersalins avec une concentration en sel proche de la saturation tel que les lacs salés, les marais salants, la Mer morte, les salines, les sols salins, et dans les aliments fermentés et conservés à base de sel. Ils peuvent survivre pendant de longues périodes dans les cristaux de sel, et face à de nombreux facteurs tels que l'oligotrophie et la radiation.

Ces microorganismes sont dominants dans les milieux hypersalins ou leur présence peut être observée à l'œil nu, grâce à la coloration rouge, orange, ou pourpre qui est due à des pigments photosynthétiques présents dans leurs membranes et la grande densité des communautés d'haloarchaea colonisant ces milieux.(Ghai et al, 2011 ; Horikoshi et al, 2011; Stan-Lotter et al, 2015.)

4. Mécanismes d'adaptation

Il existe deux stratégies fondamentales chez les microorganismes halophiles pour la régulation de la pression osmotique élevée, due à la concentration élevée en sel confrontée dans les milieux hypersalins. La première consiste en la régulation de la concentration en sel dans leur cytoplasme par l'accumulation des ions inorganiques, qui sont dans la plus part des cas K^+ (plutôt que Na^+) est le cation le plus dominant et Cl^- , cette stratégie est utilisée par les archaea halophiles aérobie de l'ordre des *Halobacteriales* et d'autres bactéries halophiles. L'autre stratégie est rencontrée chez la plupart des bactéries halophiles et halotolérantes et chez les haloarchaea méthanogènes. Elle est basée sur la biosynthèse ou l'accumulation des osmolytes (par exemple : l'éctoïne et la glycine betaine). La régulation de la concentration en ions est possible grâce à l'action coopérative des antiports membranaire Na^+ / H^+ .

Les protéines halophiles sont modifiées pour contenir un niveau élevé en acides aminés acides sur leurs surfaces externes, leur conférant une stabilité face aux concentrations élevées en sel. Cette stabilité est assurée par l'interaction entre la charge négative des protéines et les ions et la charge positive des sels. L'ADN des haloarchaea s'adapte à la concentration intracellulaire élevée en cations par le pourcentage élevé en guanine plus cytosine qui s'étend de 59.5 à 71.2%.(Oren., 2013 ; Shrestha et al., 2018).

5. Les enzymes

Les enzymes halophiles sont des polyextrémophiles capables de catalyser des réactions dans des conditions extrêmes pour divers processus industriels. Certaines propriétés intéressantes ont été rapportées pour les amylases, les protéases, les nucléases, les cellulases, les chitinases, les xylanases, les estérases et les lipases d'halophiles. (Setati, 2010 ; Kumar et *al.*, 2016).

5.1 Les Protéases

Les protéases microbiennes font partie des enzymes les plus étudiées et elles sont largement utilisées dans les procédés industriels. Elles sont couramment utilisées comme additifs dans les détergents à lessive, la transformation des aliments, les produits pharmaceutiques ainsi que la gestion des déchets. (Setati, 2010).

Une protéase extracellulaire de *Halobacterium halobium* a été exploitée pour la synthèse de peptides dans l'eau / N'-N'-diméthylformamide. La synthèse de tripeptides par la protéase extracellulaire de *Natrialba megadii* (Nep) en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) sous différentes concentrations de sel. (Singh et *al.*, 2017).

Des archées halophiles extrêmes productrices de protéases comme *Halogeometricum borinquense* (Vidyasagar et *al.*, 2006) et *Natrialba magadii* (D'Alessandro et *al.*, 2007) ont été isolées. De telles enzymes ont également été isolées et caractérisées de plusieurs espèces bactériennes comprenant *Bacillus sp.* (Setyorini et *al.*, 2006 ; Ghafoori et *al.*, 2016), *Pseudomonas sp.* (Sánchez-Porro et *al.*, 2003b), *Salinivobrio sp.* (Amoozegar et *al.*, 2007), *Salicola sp.* (Moreno et *al.*, 2009), *Halobacillus sp.* (Karbalaeei-Heidari et *al.*, 2009), *Filobacillus sp.* (Hiraga et *al.*, 2005), *Chromohalobacter sp.* (Vidyasagar et *al.*, 2009), *Nesterenkonia sp.* (Bakhtiar et *al.*, 2005) et *Virgibacillus sp.* (Sinsuwan et *al.*, 2008). Ces enzymes exercent une activité optimale en présence de NaCl et restent stables sur une large gamme de pH (5 à 10). Elles ont été caractérisées d'enzymes haloalcaliphiles (Gupta et *al.*, 2005). En outre, elles sont souvent actives à des températures comprises entre 40 et 75°C (Vidyasagar et *al.*, 2009).

5.1.1 Intérêt des protéases en biotechnologie

Les processus industriels sont effectués dans des conditions physiques et chimiques spécifiques qui ne peuvent pas toujours être adaptés aux valeurs optimales requises pour l'activité des enzymes disponibles.

Pour cette raison, il serait très important d'avoir des enzymes disponibles présentant des activités optimales à différentes valeurs de la concentration de sel et de la température. Les halophiles sont la source la plus probable d'enzymes. Car non seulement leurs enzymes sont tolérantes au sel, mais elles sont aussi thermotolérantes (Sanchez-Porro *et al.*, 2003; Karbalaie-Heidari *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012; Elbanna *et al.*, 2015; Dalmaso *et al.*, 2015; Abdel-Hamed *et al.* 2016). L'isolement des halophiles modérés capables de produire des enzymes extracellulaires donnera la possibilité d'avoir des activités optimales à différentes concentrations de sel. Les bactéries modérément halophiles sont un groupe de micro-organismes halophiles capables de se développer de manière optimale dans des milieux contenant une large gamme de concentration de NaCl (3 à 15 % de NaCl). (Sanchez-poro *et al.*, 2003 ; ArdaKani *et al.*, 2012). Elles présentent des avantages importants pour être utilisées comme source d'enzyme halophiles, telles que les quelques besoins nutritionnels, la capacité de croître dans une large gamme de salinités et d'être très facile à cultiver (la plupart d'entre elles pouvant utiliser une grande variété de composés comme seule source de carbone et d'énergie). Ces caractéristiques exposées par des bactéries modérément halophiles ont de grandes applications biotechnologiques potentielles Mellado *et al.*, 2005. Ils constituent un groupe hétérogène de micro-organismes comprenant des espèces appartenant à différents genres tels que *Halomonas*, *SaliniVibrio* et *Chromohalobacter*, et a été étudié en matière d'écologie, de physiologie, de biochimie et, plus récemment, de sa génétique. Cependant, leurs possibilités biotechnologiques n'ont pas été largement exploitées. Bien qu'ils produisent des enzymes extracellulaires tolérantes au sel avec un grand potentiel d'utilisation dans les procédés industriels Sánchez-Porro *et al.*, 2003.

Une plus grande activité hydrolytique est généralement observée pour des bactéries modérément halophiles à Gram positifs que les bactéries à Gram-négatifs. La plupart des bactéries à Gram-positifs appartiennent au groupe *Bacillus*, y compris *Salibacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Gracilibacillus*, *Virgibacillus*, *Thalassobacillus* et *Piscibacillus* (Sánchez-Porro *et al.*, 2003b, Rohban *et al.*, 2009). Les bactéries à Gram-négatifs productrices

d'hydrolase comprennent généralement des espèces de *Salinivibrio*, *Chromohalobacter* et *Halomonas* (Ayad, 2011; Benabdallah, 2014).

. Les bactéries halophiles sont métaboliquement plus versatiles que les archées, et leurs activités enzymatiques sont plus diverses. D'ailleurs, la plupart des enzymes haloarchéennes exigent au moins 10 à 15% (p/v) de sel pour leur stabilité et leur activité. Alors que les enzymes bactériennes généralement ne montrent pas des exigences strictes au sel (Ayad, 2011).Ceci a permis d'avoir un intérêt grandissant dans la recherche scientifique sur les enzymes tolérantes au sel et cela est dû au potentiel d'application industrielle de ces enzymes. Il est généralement reconnu et prouvé que plusieurs enzymes halophiles sont des polyextrémophiles. Ces enzymes non seulement restent actif et stable dans un environnement hyper salé mais sont souvent aussi thermo tolérant et alcaliphiles. Ces propriétés font que les enzymes halophiles soient attractives dans diverses applications biotechnologique comme elles peuvent être capable de catalyser des réactions rudes qui sont typiques de plusieurs processus industriel (Mathabatha, 2010).et c'est ce qui a permis de faire une recherche étendue sur ces dernières isolées à partir des bactéries halophiles ainsi que leurs applications possibles (Ayad, 2011).

PARTIE 2

MATERIAL ET METHODE

L'objectif essentiel du présent travail est la production et la caractérisation partielle d'une activité protéase produite par une souche halophile isolée à partir d'un lac salé de la région de Djelfa

Ce travail a été effectué de mars à septembre dans le laboratoire de recherche de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Ziane Achour-Djelfa.

1 Origine des souches :

10 isolats halophiles extrêmes ont été sélectionnés pour cette étude. Il s'agit de:

- C1, C2, C3, SB 24, SB 31, SB32 et SB41 isolées de la sebkha de Zehrez El Gharbi
- RS42, RS04 issues du Rocher de Sel.

2 Etude microbiologique

2.1 Revivification des souches :

Les isolats sélectionnés ont été revivifiés sur Milieu Spécifique pour les Halophile nommé MSH.

Le choix d'un milieu de culture dépend des espèces recherchées et l'objectif de l'étude à réaliser, pour cela nous avons utilisé un milieu de cultures spécifique pour les halophiles MSH. Sa composition en g/l est la suivante :

Composition	NaCl	MgCl ₂ . 6H ₂ O	MgSO ₄ . 7H ₂ O	KCl,	CaCl ₂ . 2H ₂ O	NaBr	NaH CO ₃	Extrait de levure	eau distillé
quantité(g)	200	32	50	5	0.8	0,6	0,16	5	1000 ml

Le milieu gélosé est obtenu par ajout de 20g/l d'agar, cependant le milieu minimum correspond au MSH dépourvu de l'extrait de levure

2.2 Préparation du milieu de culture :

Après avoir pesé les ingrédients, nous les dissolvons un par un dans 500 ml d'eau distillée chauffée afin d'assurer la fusion et l'homogénéité de tout les ingrédients. Le volume est ajusté à 1 litre par l'ajout de l'eau distillée.

Le milieu est réparti dans des flacons stériles de 250 ml à raison de 200 ml par flacon puis stérilisés dans l'autoclave à 120 degrés pendant 20 minutes. puis bien refermer après l'avoir sorti.

Le milieu MSH stérile est coulé dans des boites de Pétrie qu'on laisse se solidifier.

3 Repurification :

3.1 Ensemencement sur milieu gélosés MSH complet :

L'isolement des souches a été réalisé en suivant la méthode d'épuisement par stries.

D'abord l'anse de platine est chauffée bien sur la flamme d'un bec bunsen au rouge pour stériliser est refroidie au contact du milieu solide ;

Ensuite. Le prélèvement s'effectue à partir d'une colonie dans tube à vice par la boucle de l'anse.

Pour l'ensemencement des souches, la boîte de Pétrie a été divisée en trois parties. Le premier tiers de la boîte est inoculé en balayant avec l'anse la surface de la gélose par des stries bien serrés, l'anse est alors stérilisée et refroidie, l'inoculation du second tiers est réalisée par des stries en «empiétant » légèrement avec l'anse la première partie afin d'obtenir quelques cellules qui seront étalées sur le second, la répartition sur le troisième secteur se fait de la même manière pour achever la séparation des bactéries

Les boîtes inoculées sont mises dans des sacs en plastique contenant des compresses et coton cardé mouillées pour éviter la dessiccation de milieu de culture puis incubées par la suite dans une étuve à 40°C pendant 7 jours.

3.2 Tests de criblage de l'activité protéolytique:

3.2.1 Criblage de l'activité protéolytique sur milieu solide :

Les ensemencements des isolats ont été effectués par la méthode de strie sur gélose dans des boîtes de Pétri contenant le milieu minimum MSH solide additionné du lait écrémé à 2% .

Les boîtes sont mises dans des sacs en plastique contenant du coton cardé stérile mouillé pour éviter leur dessèchement de la gélose puis elles sont déposées à l'étuve à 40 °C pendant 5 jours

La présence de l'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'une zone de dégradation tout autour des stries.

3.2.2 Criblage de l'activité protéolytique sur milieu liquide :

On inocule chaque isolat dans un flacon stérile contenant 30ml de milieu minimum MSH liquide additionné du lait écrémé à 2%. Les flacons sont ensuite, placés dans un incubateur agité à une vitesse de 100 rpm à 40°C pendant 10 jours.

Pour mettre en évidence l'activité protéolytique, on a utilisé la méthode des puits de diffusion sur gélose.

Ce test d'activité est basé sur la diffusion de la protéase sécrétée par les souches dans la gélose pour dégrader la caséine du lait tout autour des puits.

Pour se faire des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum solide additionné de 2% du lait écrémé ont été préparés à raison de 30 ml /boîte. La gélose est perforée par un certain nombre de puits à l'aide d'une pipette pasteur afin d'y mettre environ 100 µl du surnageant obtenu après centrifugation des tubes Eppendorf, préalablement conservés, à raison de 3000t/mn pendant 20 mn et à 4°C. Enfin ces boîtes sont incubées à 40 °C pendant 24 h.

La présence de l'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo clair de dégradation. En revanche un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour des puits.

Au terme des tests de criblage des isolats étudiés, une souche productrice de protéase la plus performante sera sélectionnée pour une étude plus poussée.

4 Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique

1- Cinétique de croissance :

Pour la croissance de la souche C3 est inoculée dans un flacon de 250ml, contenant 30 ml de MSH minimum liquide additionné de 2% de lait écrémé. Une simple agitation est effectuée afin d'homogénéiser le mélange. Les flacons sont incubés à 40°C pendant 7jours.

Des prélèvements ont été effectués quotidiennement pour mesurer la DO à 680nm. Parallèlement, 1ml de la culture est centrifugé dans un tube eppendorf à raison de 3000t/mn pendant 20 mn à 4°C pour servir au test de l'activité protéolytique.

2- Mesure de l'activité protéolytique :

Les tests d'activité protéolytique ont été effectués selon la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

Un test d'activité protéolytique positif se traduit par un halo clair de dégradation autour des puits dont les diamètres seront mesurés à l'aide d'un pied à coulisse à affichage digitale.

5 production et caractérisation de l'activité protéolytique

5.1 production de l'activité protéase :

Afin de produire l'activité protéase, une fermentation liquide a été réalisée pour avoir une culture fraîche avec un volume final de 300ml. En effet trois flacons de 500ml, contenant 100 ml de MSH minimum additionné de 2 % de lait écrémé, ont été inoculés par la souche productrice sélectionnée. Les flacons ont été incubés à 40 °C sous agitation à une vitesse de 100 rpm

Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000t/mn pendant 20 mn à 4°C. Le surnageant et le culot ont été récupérés pour servir aux différents tests de localisation et de caractérisation de l'activité protéolytique.

5.2 Test de localisation de l'activité protéolytique:

Pour réaliser ce test, le surnageant et le culot ont été récupérés après la centrifugation de 300ml du milieu de culture ainsi obtenu.

Le culot cellulaire est resuspendu dans de l'eau distillée puis incubé dans le congélateur à -18°C pendant 1H avant d'être mis directement dans la glace pour créer le choc thermique et lyser ainsi les cellules. Le lysat cellulaire est centrifugé à 3000t/mn pendant 20 mn à 4°C.

Le surnagent est récupéré pour servir aux tests d'activité selon la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

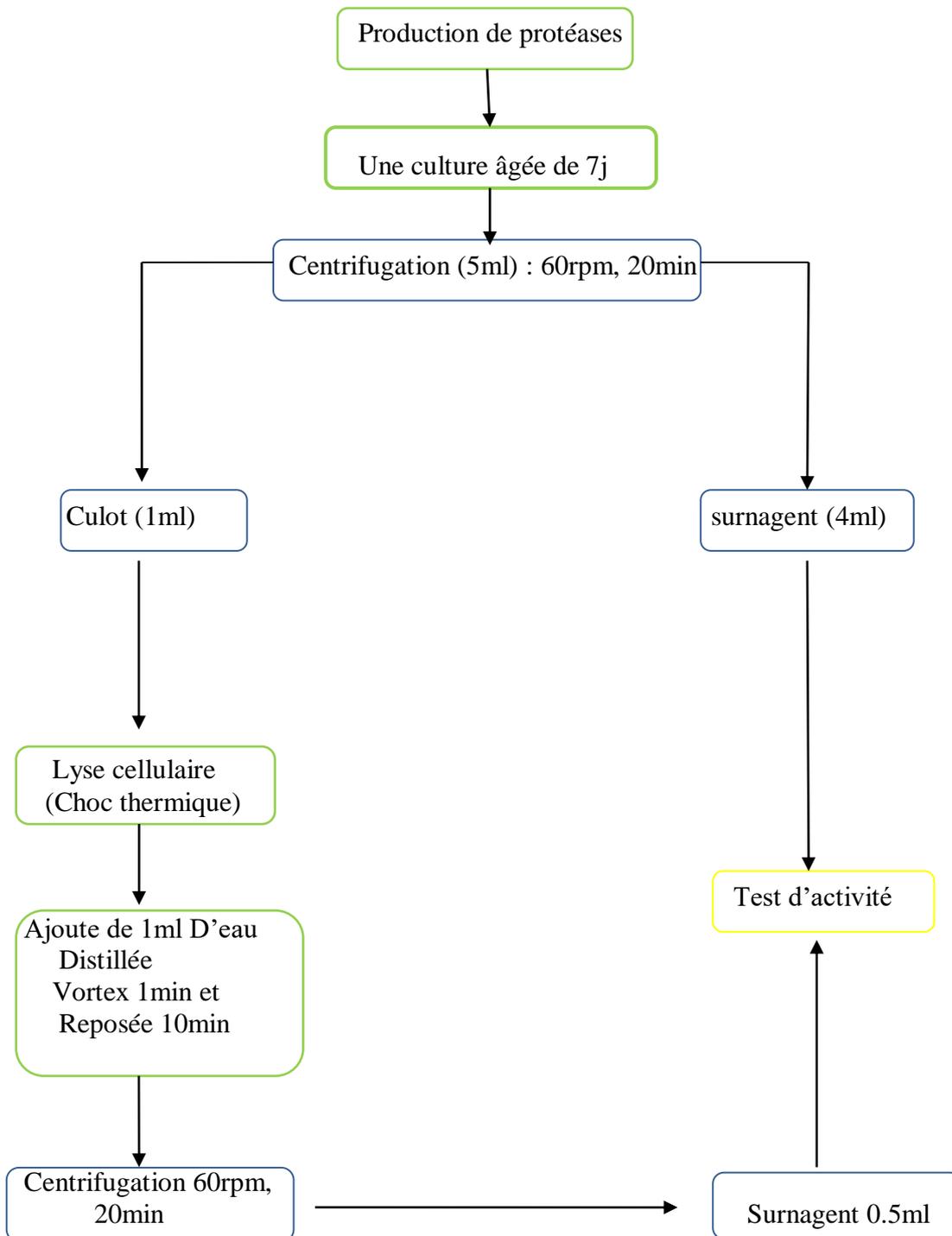


Figure 3 : Organigramme des étapes de test de localisation.

6 Caractérisation préliminaire de l'activité protéase

Dans le but d'effectuer une caractérisation partielle de l'enzyme, différents tests ont été réalisés et qui sont représentés dans le schéma ci-dessous. Bien sûr l'influence de la température, du pH et de la concentration en sel sur l'activité enzymatique est déterminée en variant l'un de ces paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

Les tests d'activité protéolytique sont réalisés en utilisant la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrit.

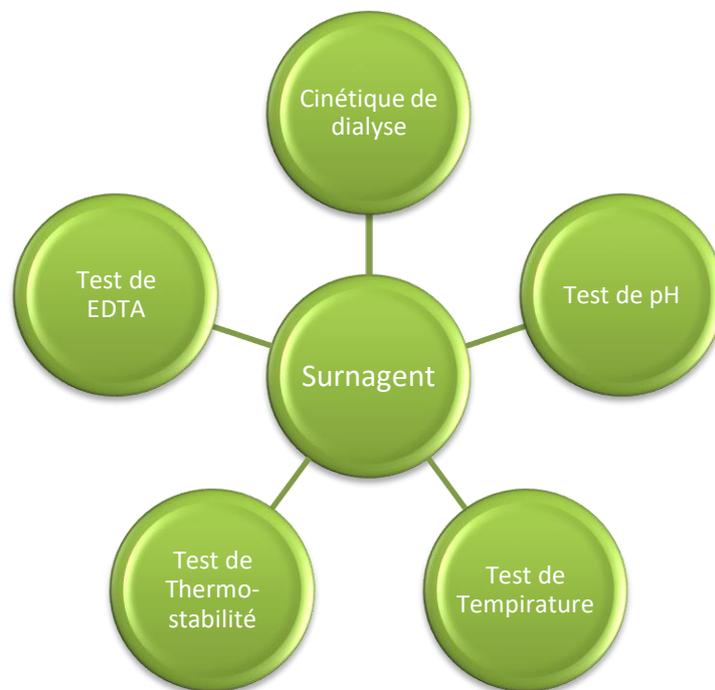


Figure 4 : Les différents tests de caractérisation partielle de l'enzyme.

6.1 Effet du NaCl sur l'activité protéolytique :

6.1.1 Dessalage par dialyse :

Afin de réaliser des tests de salinité une dialyse est nécessaire et cela à l'aide d'un sac à Dialyse qui contient une membrane semi-perméable permettant la sortie ou bien la diffusion des petites molécules telles les ions minéraux et pas celle des macromolécules comme les protéines

Un boudin de dialyse conditionné (sac à dialyse avec un Cut-off de 14 000 Da et une Longueur de 7 cm) sera chargé avec 7 ml de solution protéique à dessaler puis immergé dans un bécher contenant un volume d'eau distillé nécessaire au recouvrement total de ce premier sous agitation par un barreau aimanté tournant à 4°C

Pour éviter la réinsertion du sel dans le boudin l'eau contenu dans le bécher est changée tous les 2 heures. Après les 48h le dialysat est récupéré dans un flacon stérile de 250 ml pour subir le test de salinité.

6.1.2 Test de salinité :

Afin de voir l'effet du sel sur l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brute ainsi que son optimum d'activité, différentes concentrations de Na Cl ont été testées : 0M, 1M, 2M , 3M, 4M, 5M et chacune d'elles est mise dans un tube Eppendorf de 1.5ml.

Des prélèvements de 0.5 ml ont été effectués, à l'aide d'une micropipette, à partir du Dialysat et versés dans chacun de ces micro-tubes. Ces derniers sont légèrement agités manuellement afin d'éviter la formation de bulles d'air causée par le vortex et cela jusqu'à la dissociation totale du sel.

Les activités ont été recherchées en utilisant la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite. Le dialysat pure non traité servira de témoin négatif, alors que le surnagent non dialysé sera considéré comme témoin positif dans ce cas.

6.1.3 Test différentiel

Dans la cas où aucune activité ne sera détectée après la reconstitution des différentes concentrations de NaCl; deux hypothèses s'imposent pour expliquer l'absence de l'activité;

Première hypothèse: l'enzyme étant de poids moléculaire inférieure à 14.000 Da et donc serait perdu au cours de la dialyse.

Ou bien comme deuxième hypothèse l'enzyme serait dénaturé d'une façon irréversible en absence du NaCl et donc l'activité est perdu définitivement même après la reconstitution des différentes concentrations du NaCl.

Afin de trancher pour l'une des deux hypothèses, des tests de confirmation doivent être effectués

faire un deuxième dessalage par dialyse s'impose en réduisant le Cut-off de la membrane de dialyse à 3500 Da au lieu de 14000Da.

6.1.4 Test de confirmation

Pour tester la première hypothèse qui repose sur la taille de la molécule, la dialyse du surnageant a été reconduite en utilisant une membrane de cut-off 3500 Da au lieu de 14.000 Da tout en gardant le même protocole et les mêmes conditions de travail.

Pour un meilleur suivie de l'activité au cours de la dialyse, des prélèvements ont été effectués après 5min, 10 min ,30min ,1h et 2h

L'activité protéolytique est estimée par la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

Afin de vérifier la deuxième hypothèse qui stipule la dépendance de l'activité protéase au NaCl et que cette activité serait perdu en son absence, nous avons reconduit la même expérience de dialyse du surnageant mais contre le milieu MSH au lieu de l'eau distillée.

pour un meilleur suivie de l'activité au cours de la dialyse, des prélèvements ont été effectués après 2min,4 min,6min, 8min, 10min,20min ,30min et 1h

6.1.5 Cinétique de dialyse

Ce test a été réalisé dans le but de suivre l'activité protéolytique selon le temps de dialyse pour déterminer le moment de l'inactivation de l'enzyme et construire une idée sur le degré de dépendance de l'activité de l'enzyme au NaCl.

la dialyse a été effectuée dans les mêmes conditions précédemment décrite avec des prélèvements à: 2min,4 min,6min, 8min, 10min,20 ,30min et 1h

6.2 Effet du pH sur l'activité protéase

Une série de tubes coniques de 50 ml contenant chacun 10 ml de surnagent ont été préparés dans le but d'étudier l'effet du pH sur l'activité protéolytique.

Le pH du surnagent est ajusté par l'ajout de quelques de gouttes des solutions de NaOH ou HCl 1N préalablement préparées.

La gamme de pH étudiée est de: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11

Chaque valeur de pH a été testée contre son témoin négatif qui est le milieu MSH stérile ajusté à la même valeur du pH que celle de l'essai.

L'activité est évaluée par la méthode des puits de diffusion sur gélose.

6.3 Effet de la température sur l'activité Protéase

Dans le but d'explorer l'influence de la température sur l'activité enzymatique et la détermination de la température optimale pour l'activité protéase, des volumes de 1 ml de surnagent sont prélevés dans des tubes Eppendorfs de 1.5 ml. Les températures étudiées sont : 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 80°C ,90°C, et100°C.

Chaque tube est placé dans un bain marie réglé au préalable à la température voulue pendant 1h.

Le test d'activité protéolytique est réalisé en utilisant la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

6.4 Test de la thermo-stabilité de l'activité protéase

La stabilité de l'activité protéolytique a été étudiée en choisissant la température ayant 50 % de l'activité résiduaire.

Pour se faire un tube conique de 50 ml Contenant 5 ml de surnagent a été placé dans un bain marie réglé au préalablement à la température choisie. Des prélèvements de

200µl ont été effectués dans des intervalles de temps variés allant de 5 à 10 min pour arriver à la période de 100 min d'incubations. Les autres prélèvements ont été réalisés à: 160 min, 190 min, 200 min, 220min, 250min et 280min. L'activité protéase est estimée par méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

6.5 Test de l'EDTA

6.5.1 Préparation de la solution d'EDTA

Pour connaître si l'enzyme fait partie de la famille des métallos enzymes ou non une solution d'EDTA a été préparée comme suit :

Un bécher de 50 ml contenant un barreau aimanté est posé sur une plaque chauffante à agitation magnétique et dans lequel est incorporée 10ml d'eau distillée puis 0.0146g d'EDTA (Ethylene Diamine TetraAcetate) pesé préalablement et enfin le tout est agité lentement et régulièrement avec un léger chauffage pour solubiliser le produit qui sera au final de concentration 0.005M.

Sachant que l'EDTA est insoluble à pH 7 et soluble à pH 8, une mesure du pH est nécessaire ainsi qu'un ajout de quelques gouttes de NaOH pour permette une solubilité totale de ce premier.

6.5.2 Effet de l'EDTA sur l'activité protéase

On prélève 100µl à partir de la solution d'EDTA préparée précédemment, qu'on met dans un tube Eppendorf de 1.5 ml avec 900µl de surnageant puis après agitation du mélange ainsi obtenu, 100µl sont prélevés pour servir ultérieurement au test d'activité protéolytique, on utilise le surnageant non traité avec l'EDTA comme témoin dans ce test.

L'activité protéase est estimée par la méthode des puits de diffusion sur gélose précédemment décrite.

Un organigramme enfin de cette partie, a été établi pour résumer les principales étapes d'exécution de ce travail. (Figure 5)

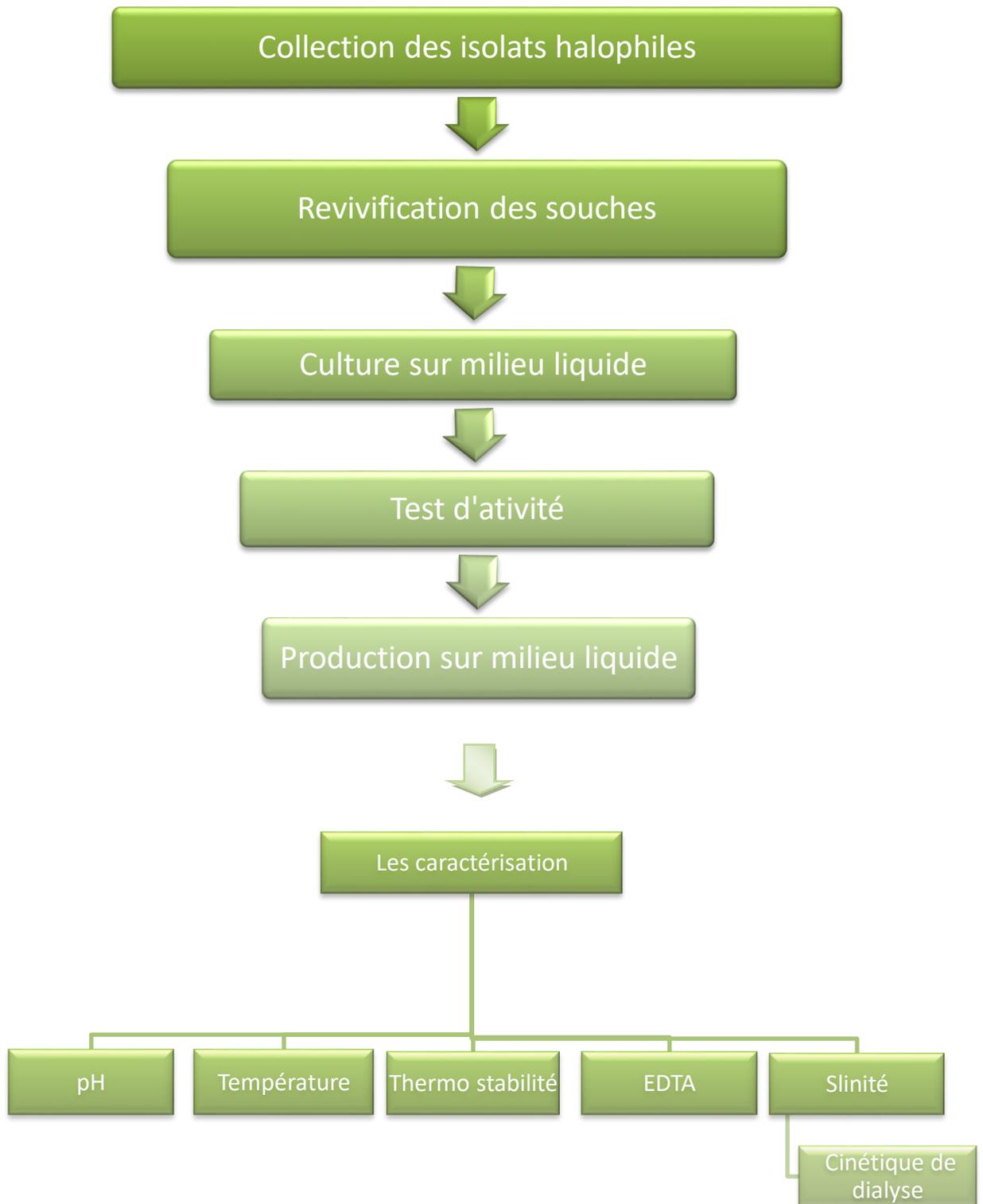


Figure 5 : Schéma générale de la pratique.

PARTIE 3

RESULTAT ET DISCUSSION

1 Revivification des souches :

Après 7 jours de culture dans l'incubateur à une température de 40 °c, on a remarqué l'apparition des quelques colonies bactériennes dans les boîtes de Pétri des souches cultivées [SB41.RS04.C1.C3.RS42.C2.SB32.SB31et SB24]. Ce résultat indique que la composition du milieu de culture MSH et les conditions d'incubation correspondent à l'exigence de la croissance des souches.



Figure 6: l'apparition des colonies bactériennes dans les boîtes de Pétri des souches cultivées



Figure 7 : Croissance des isolats cultivés

2 Criblage des isolats pour l'activité

2.1 Criblage de l'activité protéolytique sur milieu solide :

Après 05 jours d'incubation des souches à une température de 40 °C, on remarque un halo de dégradation autour des stries pour quelques isolats, Il s'agit de : Sb41, Rs42, SB24 et C3 indiquant ainsi qu'elles sont potentiellement productrice de la l'activité protéase

2.2 Criblage de l'activité protéolytique sur milieu liquide

Après 24 H d'incubation des souches cultivées à 40°C pendant 10 jours , on remarque un halo claire est détecté autour des puits des isolats C3 , 24 et Rs42 indiquant une hydrolyse de la caséine. Cependant l'isolat Sb31 ne montre aucune zone d'hydrolyse autour du puits.

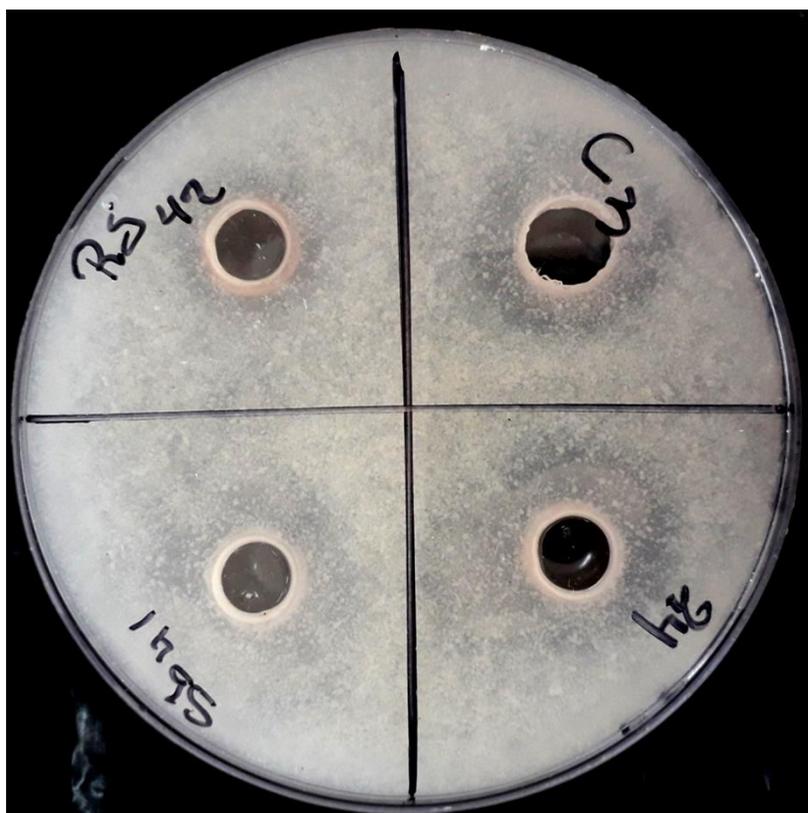


Figure 8 : Test d'activité des souches C3, Rs42, 24, Sb41 selon la méthode de diffusion sur gélose

A partir des résultats des tests du criblage des isolats étudiés sur milieu solide et liquide, il apparait que la souche productrice de protéase la plus performante est la souche C3.

3. Cinétique de croissance et de production de l'activité protéolytique :

3.1 Cinétique de croissance :

Le changement de couleur du milieu de culture MSH minimum en présence de lait écrémé peu à peu du blanc vers l'orange durant les jours d'incubations, indique la croissance de la souche C3 .

La couleur orange du milieu de culture correspond à la croissance de souche C3 , comparé au témoin qui est de couleur blanche. Le lait écrémé contient une protéine connu sous le nom de la caséine qui est utilisée comme source de carbone et d'énergie et permis ainsi à la souche C3 de se croître. Cette croissance se manifeste par le changement de couleur du milieu vers l'orange. (figure 9).

Il semble donc que le lait écrémé a induit la synthèse des protéases qui ont permis la dégradation de la caséine et donc la croissance de la souche C3. par cette méthode on a pu produire des protéases dans le milieu de culture MSH.

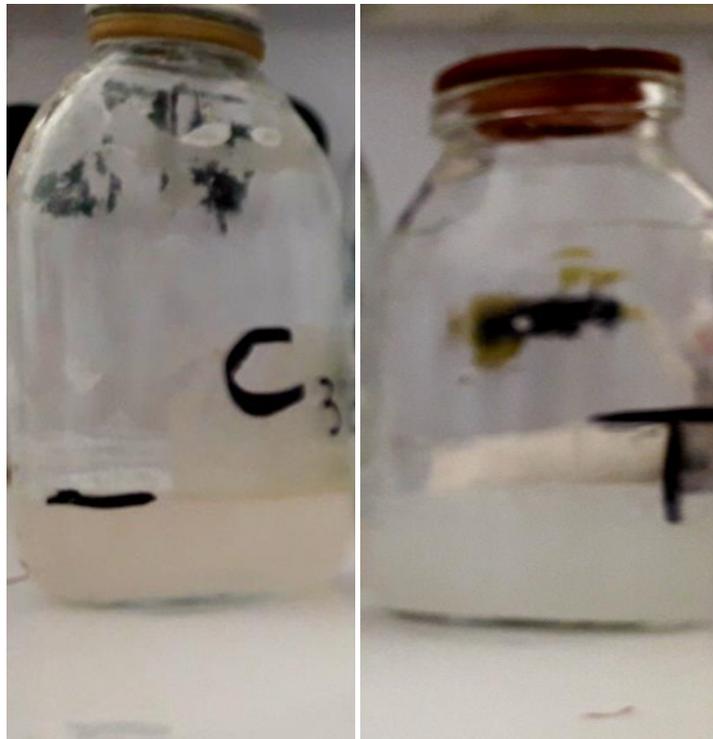


Figure 9 : la croissance de souche C3 dans milieu de culture MSH après l'incubation

3.2- Test d'activité protéolytique :

Les résultats obtenus après incubation sur gélose au lait écrémé ont permis la sélection de l'optimum de production. L'activité protéolytique est reconnue par l'halo transparent résultant de la dégradation de la gélose caséinée par l'exoprotéase produite et qui entoure les puits (figure 10); plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme est importante. Les diamètres des zones d'hydrolyse de chaque puits sont représentés dans la figure 10, le temps d'incubation est de 72h. La comparaison des diamètres d'hydrolyse de chaque puits a permis de retenir l'optimum de production de l'enzyme pour la suite du travail ; à savoir la production et la caractérisation de l'enzyme. L'optimum de production sélectionné est le troisième jour avec un diamètre de 24,85mm.



Figure10 : Mise en évidence de l'activité protéolytique.

Cinétique de croissance de la souche C3

La croissance de la souche C3 est étudiée à travers l'évolution dans le temps de la DO de croissance à 680 nm et de la production de la protéase extracellulaire.

Evolution de la biomasse :

L'évolution de la biomasse en fonction du temps est présentée par la figure 11. Elle se traduit par une courbe de croissance classique avec ses trois phases : exponentielle, stationnaire et de déclin.

La phase exponentielle dure 72h (du premier jusqu'aux troisièmes jours), elle est caractérisée par une croissance rapide où la DO à 680 nm, atteint une valeur maximale de 0.30.

La phase stationnaire s'étale du troisième aux septièmes jours et se caractérise par une DO presque constante allant de 0.30 à 0.23 ; celle-ci correspond à l'égalité du nombre des cellules viables durant le temps. La croissance se termine par la phase de déclin à partir du septième jour où la biomasse diminue jusqu'à une DO de 0.20 (aux huitièmes jours); le nombre des cellules viables diminue à cause de l'épuisement du milieu.

Evolution de l'activité protéolytique :

La cinétique de production de la protéase en fonction du temps (figure 11) montre que la production s'amorce du premier jour, puis elle augmente tout au long des phases de croissance exponentielle et cette phase atteint au l'optimum d'un pic de 19.26 mm de diamètre au troisième jour, puis elle se presque stabilise jusqu'au septième jour ensuite elle diminue jusqu'à une valeur 13.32 mm au huitième jour. Ces résultats indiquent que la production des protéases est étroitement associé à la croissance, ce qui prouve que c'est un métabolite primaire. La production maximale de l'enzyme est observée après 3 jours d'incubation.

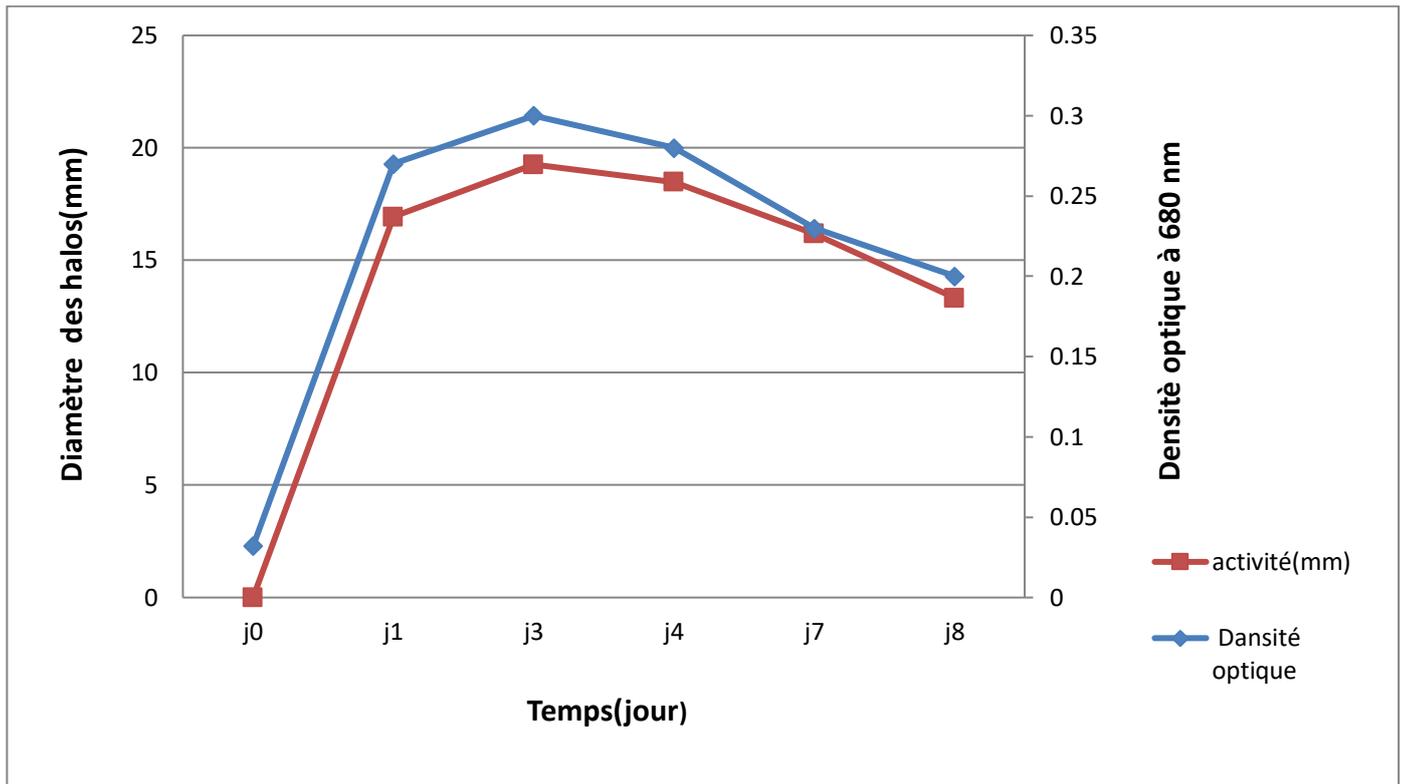


Figure 11: courbe de résultat de l'activité protéolytique et la densité optique de la souche C3

4. Production et caractérisation de l'activité protéolytique

4.1 Production de la protéase :

- Test de localisation :

Le surnagent et le lysat ont été centrifugés puis testés par la méthode des puits de diffusion sur gélose.

Les résultats montrent que les halos de dégradation apparaissent seulement autour des puits contenant le surnagent. Cependant aucune zone de dégradation n'a été détectée autour des puits contenant l'extrait du culot cellulaire. (figure 12). Ces résultats indiquent que l'enzyme étudiée est un exoenzyme.

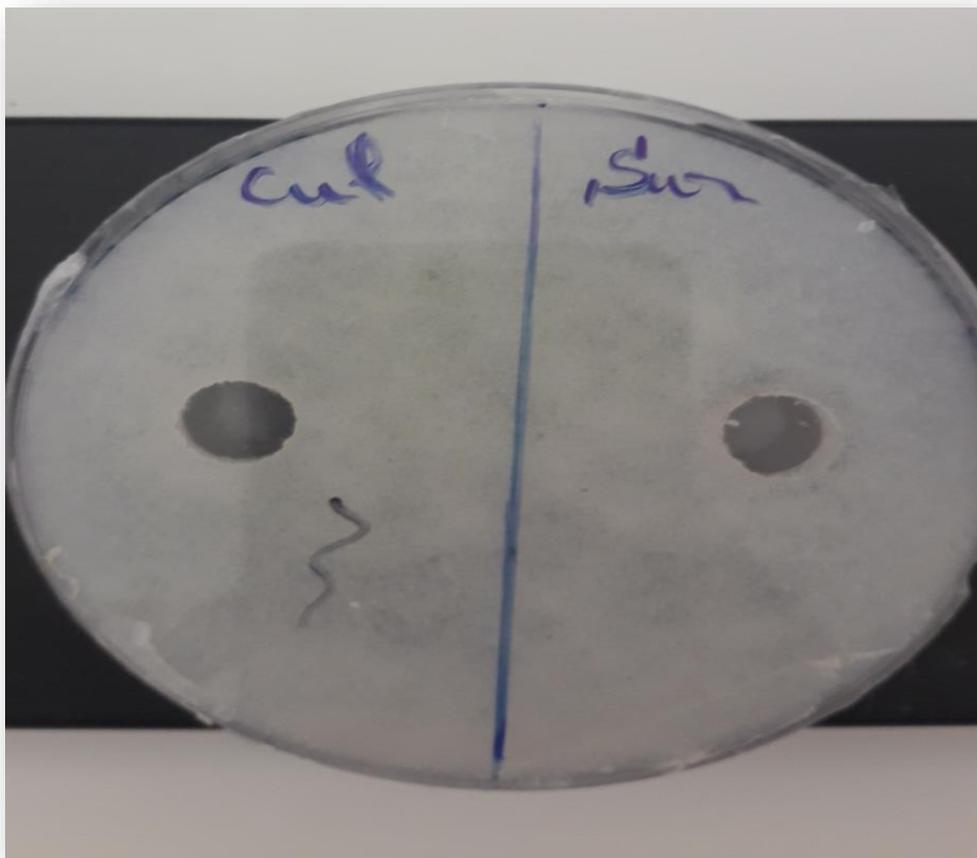


Figure 12 : résultat de test de localisation de l'activité protéase

5. Caractérisation de protéase

5.1 Cinétique de dialyse :

Une Cinétique de dialyse à été effectuée afin d'affirmer ou de confirmer les deux hypothèses proposées, cette cinétique permet de faire un suivi de l'enzyme au cours du dessalage de la solution protéique. la présence de l'enzyme dans le boudin au cours du dessalage se traduit par une présence d'activité dans les différents moments sélectionnés au cours de la dialyse . Les résultats de cette cinétique sont représentés dans la figure 13.

Après 72H d'incubation , toujours à température de 40 °C l'activité protéolytique est absente à partir de cette observation .on conclut que l'enzyme requière une haute concentration en sel pour son activité ce qui confirme la deuxième hypothèse de ce fait l'enzyme est considérée comme étant une haloenzyme .

Après avoir effectué le dessalage de la solution protéique, on ajoute de sel avec différents concentration allant de 0-5 M Aucune activité n'a été détectée ce qui suggère que non seulement l'activité de l'enzyme dépend du sel mais encore à de fortes concentration,

Aussi la stabilité de l'enzyme est liée a la présence de sel car cette dernière a subit une dénaturation irréversible en son absence.

A partir de ces données obtenus il a été trouvé que la concentration en Na Cl a ses effet profond sur l'activité enzymatique. la protéase secrétées par *Haloferus mediterranei* est complètement inactive à de faible concentration en sel et la dénaturation est irréversible comme dans le cas observé dans les autres protéine halophiles (Manjula, 2014) et qui est d'ailleurs notre cas.

En réalité, les bactéries halophiles extrêmes qui ont un optimum de concentration en sel à 20 % ont été rapportées qu'ils ont des enzymes qui sont inhibées par des concentrations de sel inférieur à 3 % (Manjula ,2014).

5.2 Effet du Na Cl sur l'activité protéolytique :

L'influence de la concentration en Na Cl sur l'activité protéolytique à été testé dans la gamme de 0-5 en utilisant une préparation d'enzyme dialysé .il n'y avait aucune activité protéolytique détecté en présence du Na Cl ajouté avec différents concentration (0-1-2-3-4-5M) donc à partir de ce résultat deux hypothèse ont été proposées : soit l'enzyme étant trop

petite et a été perdu au cours de la dialyse soit l'activité de l'enzyme dépend du sel (sel dépendent) afin de vérifier les hypothèses suggérées .

Discussion : Effet du Na Cl sur l'activité enzymatique

L'effet de la concentration en NaCl sur l'activité enzymatique est représenté dans la figure 13 aucune activité optimale à été remarquée de 0-5 M dans notre cas par contre ce résultat est différent de celui obtenu par (Padmavathi,2013) pour les protéases de *bacillus sps* qui a une large gamme de salinité 0à4 molaire, et celui obtenu par Sekar et al (2016) pour les protéases des bactéries modérément halophiles qui est de gamme allant de (0.2-4M) avec un optimum de 2 M .

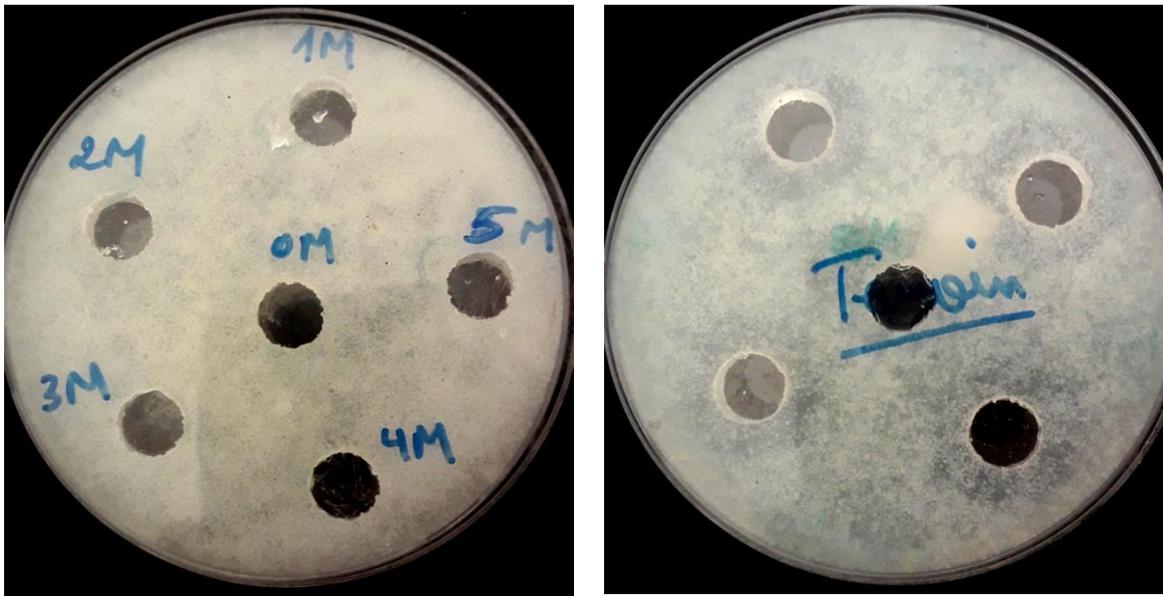


Figure13: Résultat du test de salinité effectué sur le dialysat (obtenu en utilisant une membrane avec un Cut-off de 14 KDa).

5.3 .Test de confirmation

Un autre test a été réalisé pour la confirmation des résultats obtenus ci-dessus. Dans ce test, un MSH minimum liquide a été utilisé à la place de l'eau distillée afin de garder la même concentration en sel de part et d'autre du boudin.

La figure 14 représente le résultat d'activité protéolytique. On a remarqué l'apparition des halos d'activité dans tous les puits (5min, 10min, 30min, 1h et 2h). C'est-à-dire la présence d'enzyme durant les deux heures du test. Ce résultat indique que l'activité de l'enzyme dépend du sel parce qu'on a stabilisé la concentration de sel contenue dans le surnageant et cela à l'intérieur du boudin. Au cours des trois tests effectués (salinité, cinétique de dialyse et test de confirmation) , On conclue que les protéases produites par la souche C3 sont des halo-enzymes car l'activité de l'enzyme dépend du sel et même plus que ça, lors de l'ajout de NaCl (0.5-5M) (figure 14) aucune activité n'a été détectée impliquant ainsi que la stabilité de l'enzyme dépend du sel et l'absence de l'activité se traduit par une dénaturation irréversible de l'enzyme le résultat est le même que celui obtenu par (Manjula, 2014) pour la protéase sécrétée par *Haloferax mediterranei* car elle aussi est complètement inactivée à de faible concentration en sel et la dénaturation est irréversible comme dans le cas observé dans les autres protéines halophiles et qui est d'ailleurs notre cas.

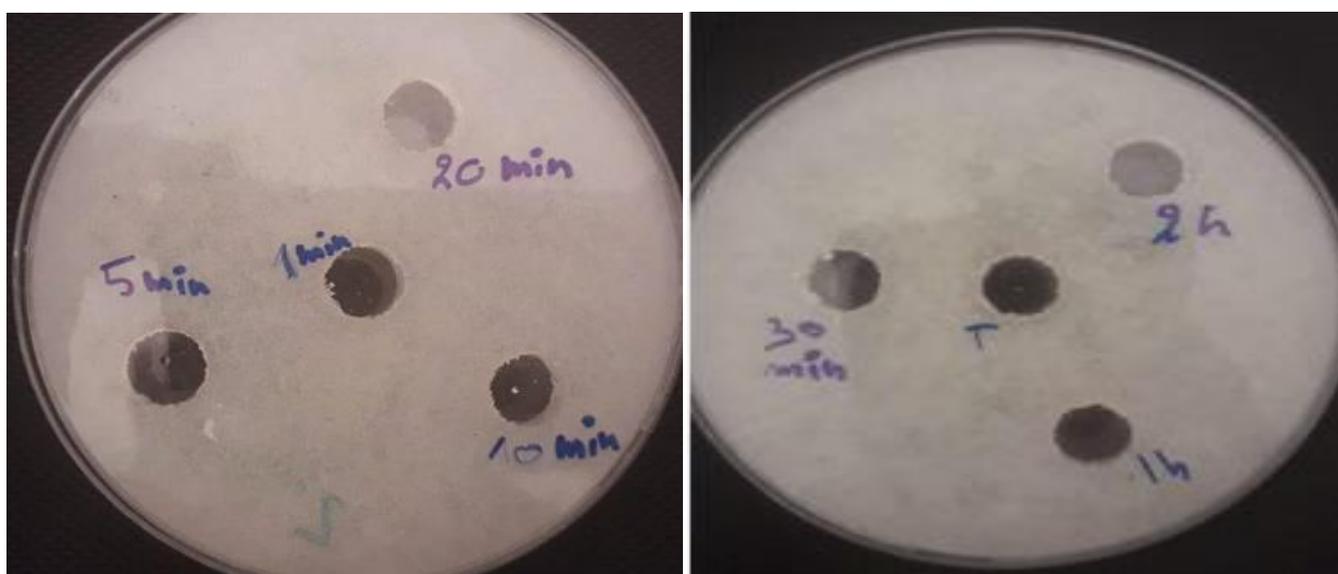


Figure14 : résultat de test de confirmation

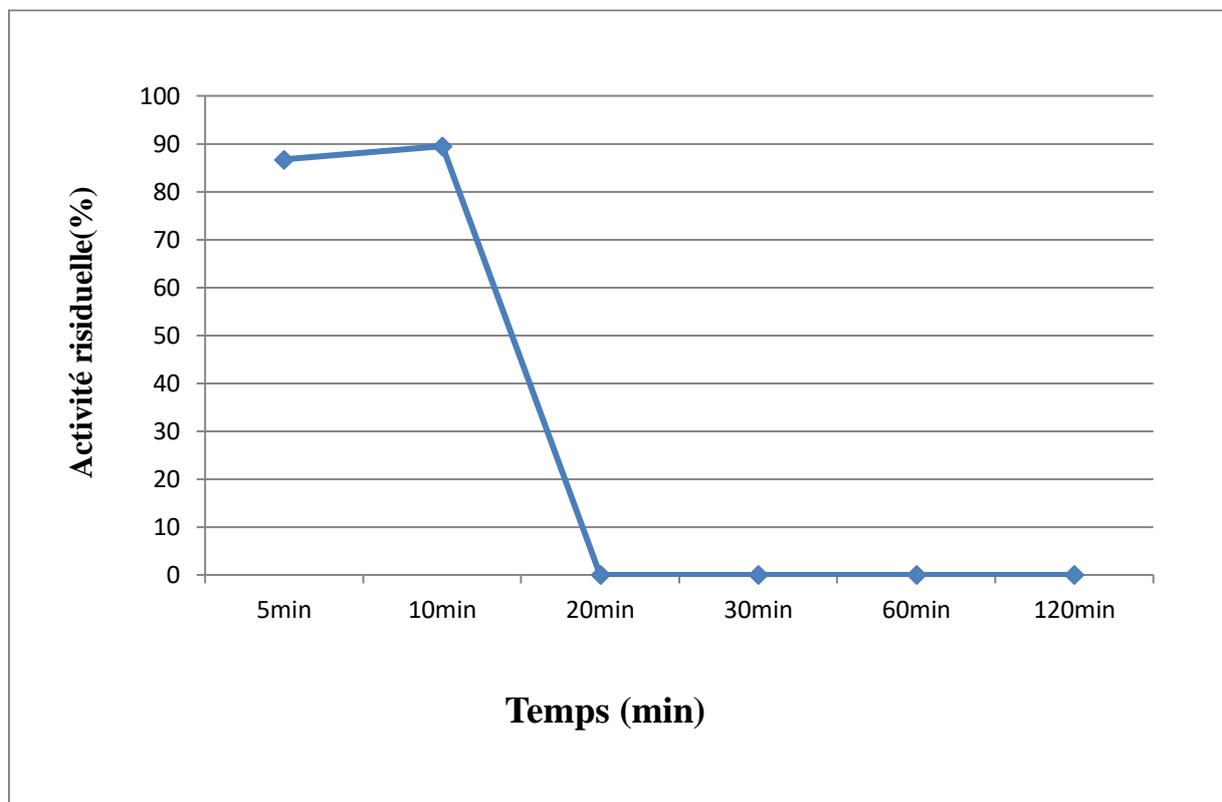


Figure15 : Résultat de la cinétique de dialyse.

5.4. Effet du pH sur l'activité protéolytique

On a fait un autre test dans le but de la caractérisation des protéases produites à partir de la souche sélectionnées : pH, pour voir l'effet de ce dernier sur l'activité protéolytique ainsi que la détermination de l'optimum de l'activité d'enzyme.

La protéase a été observée comme étant une augmentation dans une gamme de pH 3-7 avec une activité optimale de 100% à pH 7. Suivi d'une diminution presque de l'activité à un taux de pH supérieure à ce dernier. Il a été observé que dans des conditions de pH alcaline c'est-à-dire supérieur ou égale à pH 10, il y a une absence d'activité.

La caractéristique de l'enzyme dans de fortes conditions acides ou alcalines change la surface de la structure d'enzyme, lesquelles ont un impact sur les interactions entre le site actif et le substrat. Cette activité enzymatique peut être perdue à cause de la dénaturation de l'enzyme.

Discussion : Effet du pH sur l'activité d'enzyme

L'évolution de l'activité protéase en fonction du pH est représentée dans la figure 17 , on remarque le pH optimale de l'enzyme est de 7 est par contre inférieur à celui rapporté par Padmavathi ,(2013) qui est de 7.5 pour la protéase de *Basillus sp* (bactérie modérément halophile) , sekar *et al* ,2016 pour les protéases modérément halophiles et malado *et al* ,(2005) pour la protéase de *pseudomonas sp* CP76 .ces écarts de pH sont dus aux conditions expérimental différents (composition du milieu, pH , temps d'incubations ...).

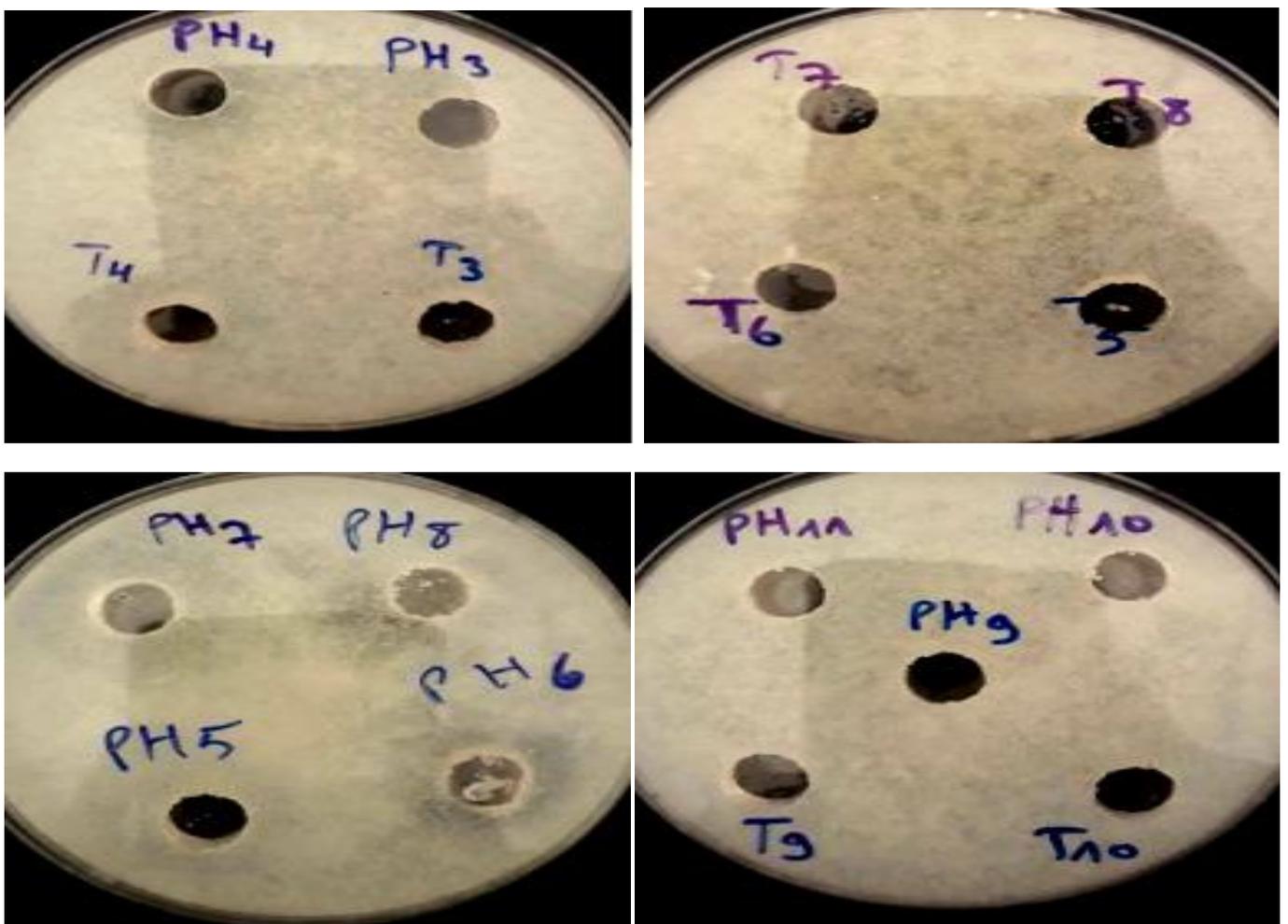


Figure 16 : Effet de pH sur l'activité protéolytique (T= témoin).

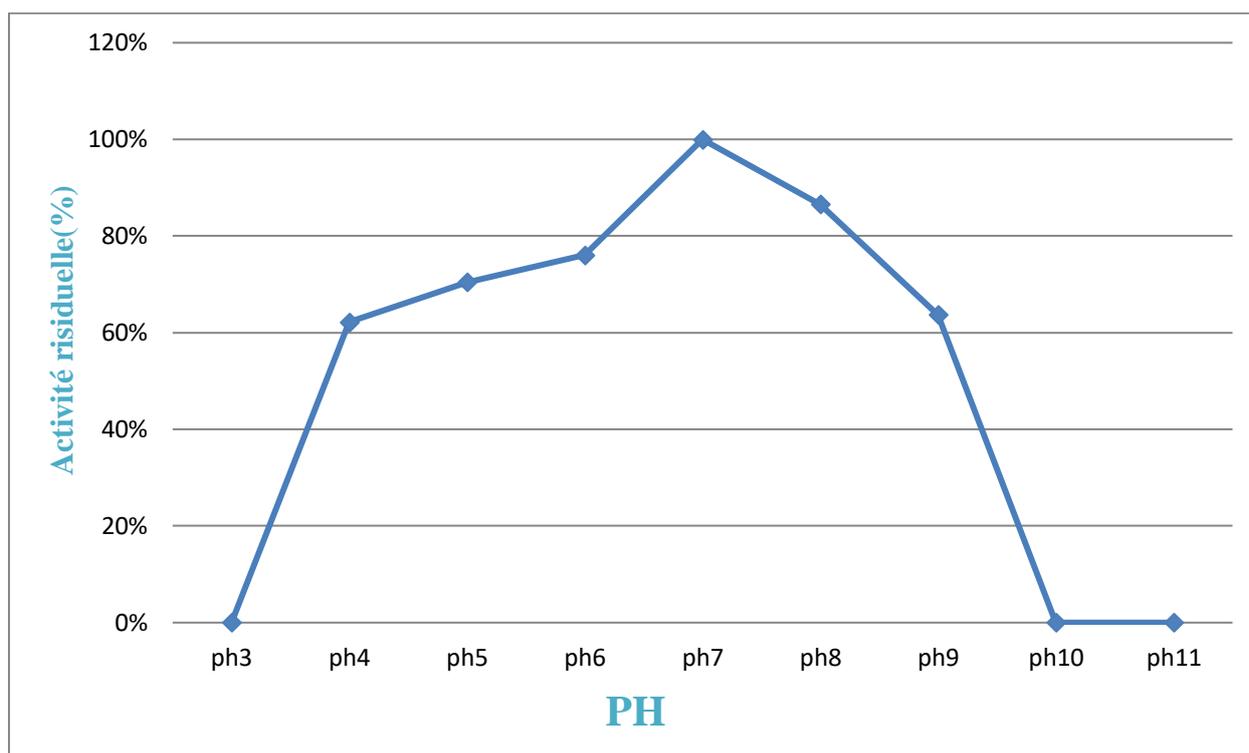


Figure 17 : effet de PH sur l'activité protéolytique.

5.5. Effet de la température sur l'activité protéolytique :

En ce qui concerne l'activité protéolytique à plusieurs températures la gamme exploitée était de 20 à 90 °c.

La protéase à été observée comme étant stable dans une gamme de la température allant de 20 à 70°C avec une activité optimale de 18.74 mm à une température 30°C suivi d'une diminution progressive de l'activité de 30 à 70 °C puis une diminution de l'activité à partir de cette dernier .il à été observé qu'à du température supérieur ou égale à 70°C , il y'à absence d'activité cela reflète probablement la thermo sensibilité de l'enzyme (figure 19).

Les caractéristique de l'enzyme dans les conditions à fort température change la surface de la structure de l'enzyme, lesquelles ont un impact sur les interactions entre le site actif et le substrat .cette activité enzymatique peut être à perdu à cause des dénaturations de l'enzyme. (Manjula, 2014)

Discussion : Effet de la température sur l'activité de l'enzyme

L'influence de la température sur l'activité protéolytique est représentée dans la figure19. l'activité de l'enzyme est maximale à 30°C dans une gamme testé entre 20à90°C elle est inférieur à celle obtenue par Sekar *et al* ,2016 pour les protéases des bactéries modérément halophile qui est de 45 °C et Karbalaeei-Heidari *et al* ,2009 pour les protéases d'*Halobacillus Karejensis* (bactérie modérément halophile) qui est de 50 °C . mais différence est due peut être aux conditions expérimentales (composition du milieu, conditions d'incubations...)

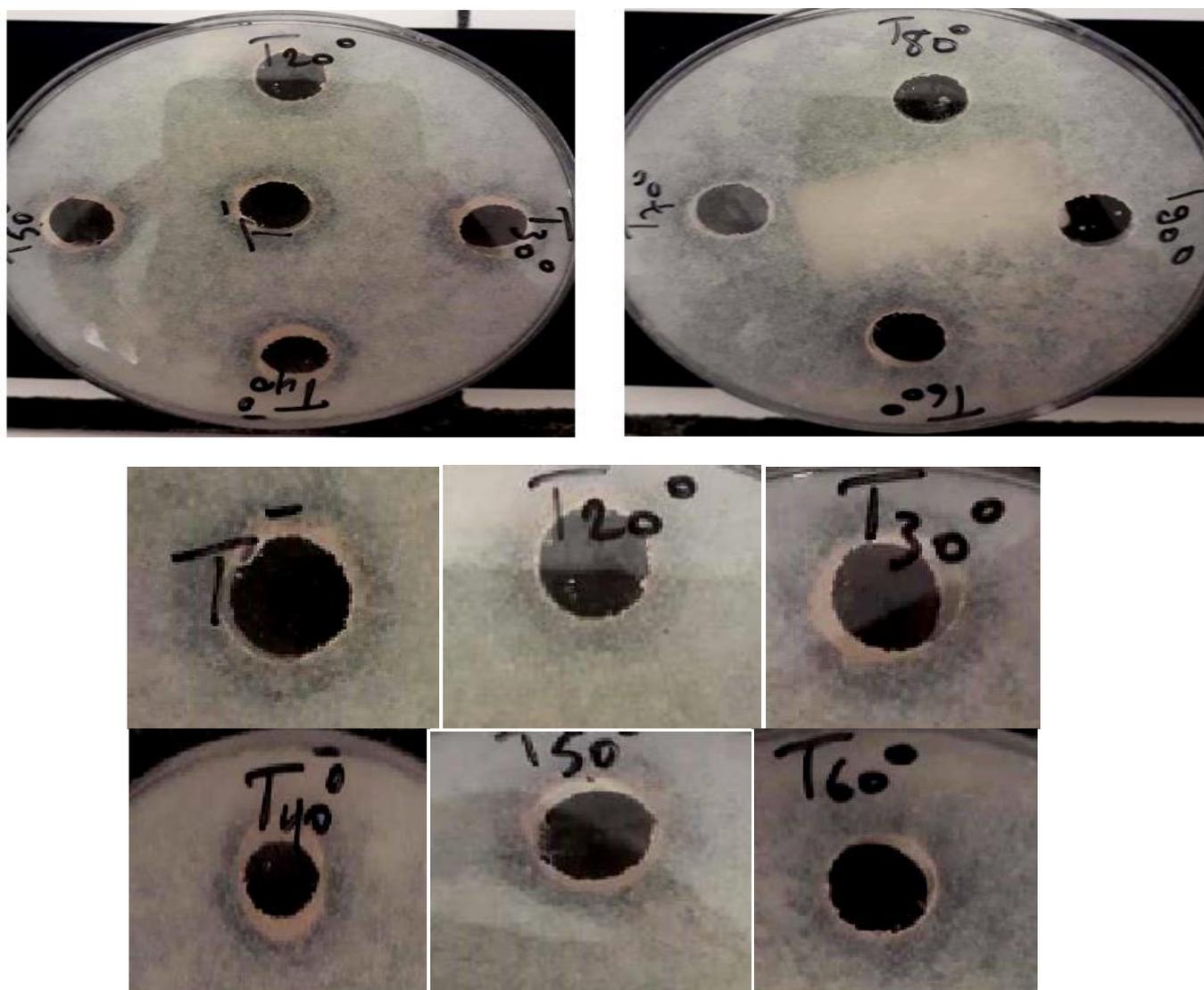


Figure18 : Effet de température sur test d'activité.

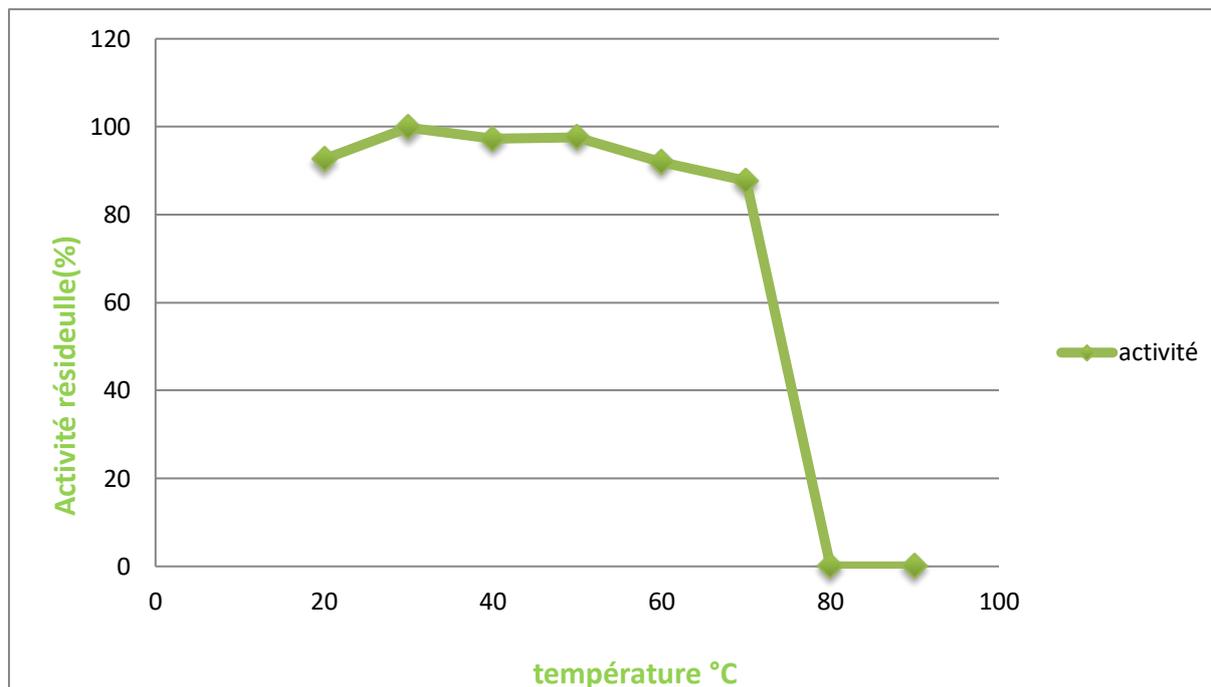


Figure 19 : courbe de l'effet de température sur l'activité protéolytique.

5.6. Test de thermo-stabilité de l'enzyme :

A partir du test précédent, on a remarqué que l'activité protéolytique disparaît après 70 °C. La question qui se pose : combien de temps cette activité reste-t-elle stable à cette température. Pour cela, un test de thermo-stabilité a été effectué à cette valeur. L'étude de la stabilité de l'enzyme est réalisée par l'incubation de l'enzyme à des temps variant de 10 à 220 min, à température 70°C. La figure 20 représente la thermo-stabilité de l'enzyme, cette dernière a été observée comme étant très stable à un intervalle de temps allant de 10 à 70 min et cela en préservant son activité initiale qui est de 100 %, puis cette dernière diminue progressivement à partir de 90 min et cela jusqu'à 220 min en ne gardant qu'environ 76.52 % de son activité initiale.

Les valeurs détectées dans la courbe de figure 21. Indiquent que l'enzyme reste stable au cours de 220 min. La durée de la stabilité de l'activité protéolytique à température 70 °C permet de confirmer la thermo-stabilité de l'enzyme.

Sachant que les protéines halophiles ont une surface très hydratée, cette couche d'hydratation renforcée (protégée) est formée à partir d'une accumulation de sel à leur surface permettant ainsi une capture des molécules d'eau nécessaire à leur remplissage, leur stabilisation, et leur solubilité et d'ailleurs la présence de cette cage a permis une stabilité de l'enzyme durant les 220 min à 70 °C .

Discussion 04 : Etude de la thermo-stabilité de l'enzyme

La figure 21 représente l'effet de la température en fonction du temps sur l'activité de la protéase. Elle montre qu'après 220min de chauffage, la protéase garde environ 76.52% de son activité initiale à 70°C. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Mellado *et al.*, 2005 pour les protéases de bactéries halophiles et d'archaea qui ont présenté une thermo-stabilité de l'enzyme (protéase alcaline) inférieure (55°C). Ces écarts de thermo-stabilité sont dus à la nature du substrat utilisé : dans notre cas le lait écrémé à 1% contenant la caséine comme substrat a été utilisé et Mellado *et al.*, 2005 ont utilisés la caséine et l'azo-caséine ou peut être due aux conditions expérimentales (temps d'incubation, composition du milieu, pH,...).

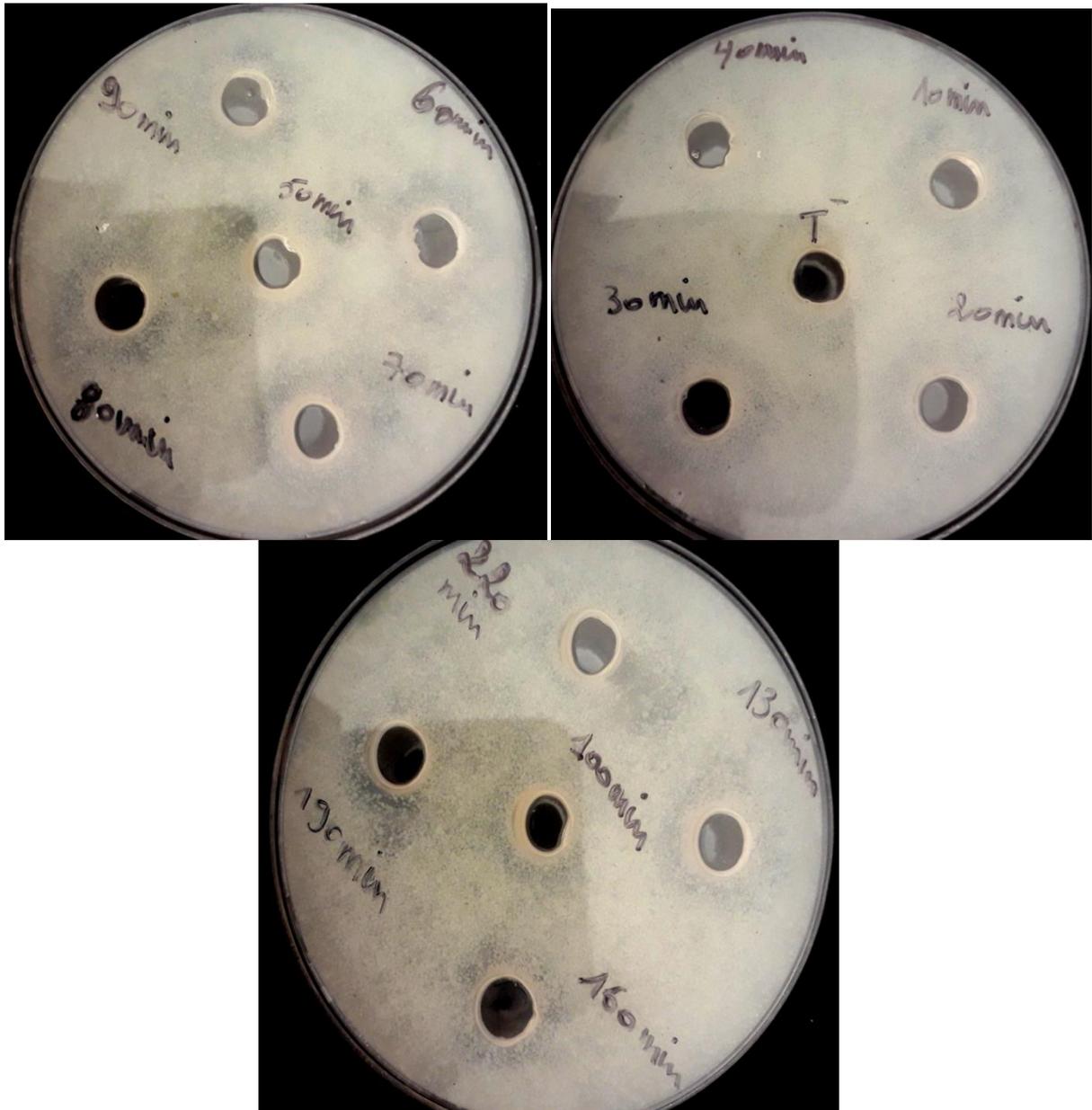


Figure20 : Thermo-stabilité de l'activité protéolytique à 70 C°.

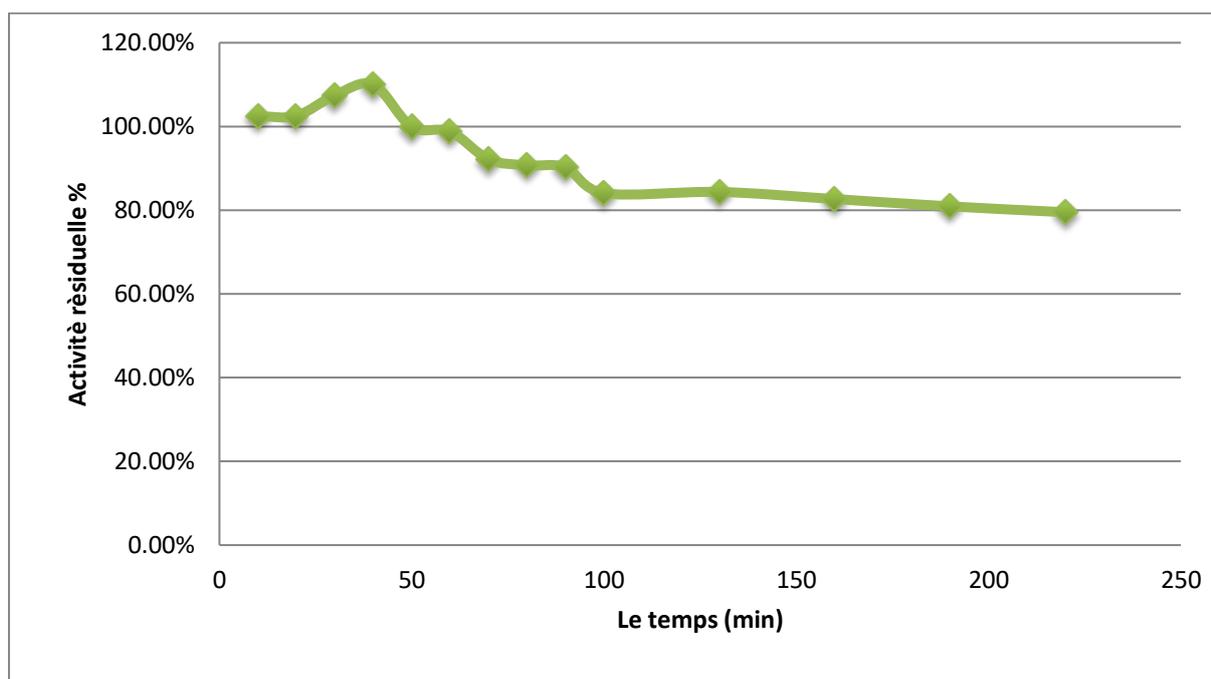


Figure 21: courbe la thermo-stabilité de l'activité protéolytique a 70⁰c

5.7. Test de l'EDTA

5.7.1. Effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique :

La figure 22 représente le résultat du test d'EDTA effectué. Ce test à été réalisé pour voir l'effet de l'effecteur Ethylène diamine tétra acétal acide sur l'activité protéolytique de l'enzyme. On a remarqué l'apparition d'un halo clair après avoir traité le surnageant avec l'EDTA, qui se traduit par la résistance d'enzyme à l'agent chélate (EDTA) en préservant l'activité enzymatique originale. Donc on conclut que ce résultat indique que la présence des ions métalliques (cofacteurs) dans le site actif de l'enzyme ne sont pas nécessaire pour l'activation et la stabilisation de cette dernière, donc l'enzyme n'est pas une métalloprotéine.

Discussion : Effet l'EDTA sur l'activité de l'enzyme

La figure 22 représente l'effet de l'EDTA sur l'activité protéolytique. La protéase n'étant pas inhibée par ce dernier garde environ 33.75 mm de son activité initial constatant ainsi qu'elle ne s'agit pas d'une métalloprotéine. Ce résultat est obtenu également par Cui et *al*, 2015 pour la protéase alcaline à partir d'une souche hautement productrice et modérément halophile de bactéries marines SD11 en ne gardant qu'environ 107% de son activité initial.



Figure22 : Effet d'EDTA sur l'activité protéolytique.

L'analyse de la diversité des communautés microbiennes d'environnements extrêmes ouvre des voies à la recherche de capacités biotechnologiques chez ces microorganismes.

Le but de cette étude est de produire et de caractériser les protéases extraites à partir de la souche C3. Une culture de la souche C3 sur MSH complet solide a permis une revivification de cette dernière. Les tests de croissance de la souche C3 ont donné une activité protéasique maximale de diamètre 8.22mm en 7 jours et demi qui est l'optimum de production.

La fermentation liquide a permis une production des protéases extracellulaires. Une centrifugation a été effectuée pour la récupération de l'enzyme. L'étude des propriétés physicochimiques de la protéase a donné les paramètres suivants : pH optimum de 7, température optimale de 30°C, thermo-stabilité de l'enzyme pendant 280 min à 70 °C, exigeant une forte concentration en NaCl (20% de NaCl); par ailleurs l'étude de l'effet de l'effecteur EDTA sur l'activité enzymatique a montré qu'il ne s'agit pas d'une métalloprotéine, du fait que l'enzyme est insensible à cette effecteur.

La stabilité aux hautes forces ioniques et à une température de 70°C et au pH neutre avec une tendance acide (3-7) fait que la protéase de la souche C3 soit une candidate appropriée pour les procédés industriels, utilisée comme additifs dans les détergents pour la lessive ayant pour but de faciliter la libération des matières protéiniques dans des taches comme celles du lait et du sang, les produits pharmaceutiques pour la préparation de médicaments, les produits alimentaires ces enzymes ont été utilisés à des fins diverses, les processus de gestion des déchets et les unités de récupération de l'argent (Dammak *et al.*, 2016) sont effectuées par plusieurs méthodes parmi elles : la combustion des films directement l'oxydation de l'argent métallique, puis l'électrolyse en décapant la couche de gélatine d'argent en utilisant des enzymes microbiennes spécifiquement des protéines alcalines et en éliminant la couche d'argent de gélatine en utilisant différents produits chimiques . La récupération de l'argent par la combustion des films crée la pollution de l'environnement et les risques pour la santé. D'autre part, l'enzyme provenant de la source microbienne casse la couche de gélatine intégrée à l'argent dans les films créant un décapage sans pollution (Sawant and Nagendran (2014)).

- [1].Amoozegar M.A, Makhdoumi-Kakhki A, Mehrshad M et al. (2015). Halovivax cerinus sp. nov , an extremely halophilic archaeon from a hypersaline lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.65, 65–70.
- [2].Atanasova.N.S., Oksanen.H.M., and Bamford. D.H. (2015). Haloviruses of archaea,bacteria, and eukaryotes. Curr. Opin. Microbiol. 25, 40–48.
- [3].Ayad, R. 2011. Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobies isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. Mémoire Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Alimentaires. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A). Mentouri-Constantine. 118 pages.
- [4].Besse.A. (2016). Interactions microbiennes et adaptations en milieu extrême : peptides antimicrobiens d'archées halophiles These de Doctorat de microbiologie Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227.
- [5].Christon J. Hurst C.J. (2016). Their World: A Diversity of Microbial Environments Advances in Environmental Microbiology Springer.
- [6].Cui, H., Wang, L., Yu, Y.(2015). Production and Characterization of Alkaline Protease from a High Yielding and Moderately Halophilic Strain of SD11 Marine Bacteria. Journal of chemistry.2015, 8.
- [7].Dammak, D., Smaoui, S., Ghanmi, F., Boujelben, I., Maalej, S. (2016). Characterization of halo-alkaline and thermos table protease from Halorubrum ezzemoulense strain ETR14 isolated from Sfax solar saltern in Tunisia. Journal of Basic Microbiology. 56, 337-346.
- [8].Dumorné K, Córdova DC, Astorga-Eló and M, Renganathan P. (2017). Extremozymes: A Potential Source for Industrial Applications, J. Microbiol. Biotechnol.(4), 649–659.
- [9].Ghai, R., Pašić, L., Fernández, A.B., Martín-Cuadrado, A.-B., Mizuno, C.M., McMahan, K.D., Papke, R.T., Stepanauskas, R., Rodriguez-Brito, B., Rohwer, F., et al. (2011). New abundant microbial groups in aquatic hypersaline environments. Sci. Rep. 1, 135.

- [10].Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, and Stetter KO. (2011) Extremophiles handbook. Springer, Tokyo.
- [11].Karbalaei-Heidari, H., Amoozegar, M.A., Hajighasemi, M., Ziaee, A., Ventosa, A.(2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium Halobacillus karajensis. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 36, 21-27.
- [12].Kumar S, Grewal J, Sadaf A, Hemamalini R and , Khare SK. (2016) Halophiles as a source of polyextremophilic α -amylase for industrial applications. AIMS Microbiol 2:1–26.
- [13].Kushner D.J., (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria, In: Vreeland R.H., Hochstein L.I. (ed) The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton, CRC Press.
- [14].Lefebvre, O., and Moletta, R. (2006). Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. Water Res. 40, 3671–3682.
- [15].Lynn J. Rothschild, Rocco L and Mancinelli. (2001). Life in extreme environments NATURE, VOL 409: :1092–1100
- [16].Manjula, R. (2014). Protease Production by haloarchaea Natrinema sp . BTSH10 isolated from salt pan of South India. . Thèse de Maîtrise présentée pour l'obtention du grade de docteur de philosophie en biotechnologie. Cochin University of Science and Technology Cochin - 22, Kerala, India. 183 pages.
- [17].Mathabatha, E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/halotolerant eubacteria. African Journal of Biotechnology. 9, 1555-1560.
- [18].Mellado, E., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A. (2005). Proteases Produced by Halophilic Bacteria and Archaea. Microbial Enzymes and Biotransformations. 17, 181-190.
- [19].Meliani, H . Morsli, A. (2016) . Etude de la biodeversité microbienne de la zone halomorphe du chott Zahrez El Gharbi .
- [20].Munawar N and Engel PC, (2013). Halophilic Enzymes: Characteristics, Structural Adaptation and Potential Applications for Biocatalysis, Current Biotechnology, 2, 334-344.
- [21].Oren A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. J Ind Microbiol Biotechnol 28: 56-63.

- [22].**Oren, A. (2013).** Life at high salt concentrations. In *The Prokaryotes*, E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 421–440.
- [23].**Padmavathi, M (2013).** Purification and Characterization of Protease Enzyme from Halophilic *Bacillus* sps. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 2, 2410-2415.
- [24].**Rodriguez-valera.F., Ruiz-Berraquero.F et cormenzana.R.A., (1980).**isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganicwith carbon sources. *Journal of general Microbiology*.119:535-538.
- [25].**Shrestha, N., Chilkoor, G., Vemuri, B., Rathinam, N., Sani, R.K., Gadhamshetty, V.,(2018).** Extremophiles for microbial-electrochemistry applications: a critical review, *Bioresource Technology*.
- [26].**Sekar, A., Packyam, M., Kim, K. (2016).** Halophile isolation to produce halophilic protease , protease production and testing crude protease as a detergent ingredient. *African Journal of Microbiology Research*. 10, 1540-1547.
- [27].**Setati M.E. (2010).** Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (11), pp. 1555-1560.
- [28].**Singh.A., Singh.A.K., (2017).** Haloarchaea: worth exploring for their biotechnological potential A.K. *Biotechnol Lett.* 39: 1793-1800.
- [29].**Stan-Lotter.H, and Fendrihan.S, (2015),** Halophilic Archaea: Life with Desiccation, Radiation and Oligotrophy over Geological Times. 5, 1487-1496.
- [30].**Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilc Archaea and its applications. *Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla*. P. 173.

Annexes

1/ Matériel et produits :

Matériel	Produits
Bec benzène	NaCl
Boîtes de pétris en plastique	CaCl ₂
Flacons de 250ml	MgCl
Micro-tubes	KCl
Agitateur-plaque chauffante	NaBr
Pipettes pasteurs	NaHco ₃
Micro pipette de 1ml, 200µl	MgSo ₄
Bain marie	Agar
Autoclave	Alcool
Chauffe ballon	EDTA
Erlenmeyer de 2000ml	Extrait de levure
Incubateur	Glycérol
Incubateur-agitateur	
Para film	
Sec en plastique	
Seringues	
Spectre	
Tube conique	
Vortex	
Compresse	
Coton cardé	
Papier aluminium	
Papier film	

2/Résultat de test d'activité de C3 :

jour	0	1	3	4	7	8
Activité	0	16.93	19.26	18.48	16.18	13.32

3/ Densité optique à 680 nm C3 :

jour	0	1	3	4	7	8
DO	0.032	0.27	0.30	0.28	0.23	0.20

4/Test de localisation :

	Halo (mm)
Surnagent	15.67
Culot	-

5/Test de Ph :

PH	Halo (mm)	Témoin	pourcentage%
PH3	0	0	0
PH4	13.86	0	62.5
PH5	15.71	0	70.44
PH6	16.96	0	76.05
PH7	22.30	0	100
PH8	19.30	0	86.54
PH9	14.21	0	63.72
PH10	0	0	0
PH11	0	0	0

6/ Test de température :

Température C°	Halo mm	Pourcentage
Témoin	18.78	100%
20	17.39	92.59%
30	18.74	99.78%
40	18.26	97.23%
50	18.33	97.60%
60	17.27	91.95%
70	16.26	87.64%
80	0	0
90	0	0

7/Test d'EDTA :

	Halo (mm)
Témoin	32.88
EDTA	33.75

8/Résultat de cinétique de dialyse :

Le temps (min)	Halo (mm)	Pourcentage %
Témoin	11.36	100
1	9.85	86.70
5	10.17	89.5
10	0	0
20	0	0
30	0	0
60	0	0
120	0	0

9/ Test de thermo-stabilité :

Le temps min	Diamètre des halos mm	Pourcentage%
Témoin	20.02	100
10	20.51	102.44
20	20.53	102.54
30	21.51	107.44

40	22.02	109.99
50	20	99.90
60	19.78	98.80
70	18.45	92.15
80	18.16	90.70
90	18.07	90.25
100	16.83	84.06
130	16.89	84.36
160	16.55	82.36
190	16.20	80.91
220	15.32	76.52

البروتيازات هي عبارة عن **انزيمات** تهدم الروابط الببتيدية التي تتواجد على مستوى البروتينات والببتيدات

في الاوساط المائية. التي تحتل أهمية محورية فيما يتعلق تطبيقاتها الصناعية. والغرض من هذه الدراسة هو إنتاج وتوصيف

البروتياز المستخرجة من سلالة C3. لذلك، حركية النمو والإنتاج متبعة باختبارات الأنشطة البروتينية حددت الإنتاج الأمثل. إن التخمر السائل المتكون أساساً على الحليب منزوع الدسم جعل الحصول على البروتياز، وهذه الأخيرة وقد مكنت مختلف التجارب المنجزة على إنزيم من توصيف هذه الأخيرة بأنها مستقرة وفاعلة في تركيز الملح العالية (القاسية) لأنه هي عبارة عن انزيمات ملحية، مع درجة الحموضة معتدلة (النشاط الأمثل في درجة الحموضة = 7.0)، ويحب درجة الحرارة المعتدلة (النشاط الأمثل عند درجة حرارة 30 درجة مئوية)، مستقرة عند 70 درجة مئوية لمدة 280 دقيقة وليست بروتياز معدنية (مقاومة لعامل المثبط الـ EDTA). في الختام، فإن سلالة C3 وهذه البروتياز خارج الخلية مع خصائص المعتدلة، وفعالة عند درجة الحرارة المعتدلة، يعني تطبيقها المحتمل في صناعة الأدوية والمواد الغذائية والمنظفات.

الكلمات المفتاحية: البروتياز، الانزيم، سلالة، التخمر السائل، انزيم ملحية.

Les protéases sont des enzymes qui clivent les liaisons peptidiques des protéines et des peptides dans des milieux aqueux. Lesquelles occupent une importance pivotante avec respect pour leurs applications industrielles.

Le but de cette étude est de produire et de caractériser les protéases extraites à partir de la souche C3. Pour cela, une cinétique de croissance et de production suivi de tests d'activités protéolytiques ont permis de déterminer l'optimum de production.

La fermentation liquide à base de lait écrémé à permis d'obtenir des protéases.

Les différents tests effectués sur l'enzyme ont permis la caractérisation de cette dernière comme étant stable et active à de fortes concentrations en sel (extremophiles). Il s'agit donc d'une haloenzyme, neutrophile (optimum d'activité à pH=7.0), mésophile (optimum d'activité à une température égale à 30°C), thermostable à 70°C pendant 280min et ne s'agit pas d'une métallo protéase (résistance à l'agent chélatant EDTA).

En conclusion, la souche C3 et ces protéases extracellulaires avec un caractère neutrophile, thermoactif, et thermostable signifie leur application potentielle dans l'industrie pharmaceutique, alimentaire et détergente.

Les mots clés : protéases, enzyme, souche, fermentation liquide, haloenzyme.

Proteases are enzymes that cleave the peptide bonds of proteins and peptides in aqueous media. Which occupy pivotal importance with respect for their industrial applications. The aim of this study is to produce and characterize the proteases extracted from C3 strain. For this, a kinetics of growth and production followed by proteolytic activity tests made it possible to determine the optimum of production. The liquid fermentation based on skimmed milk made it possible to obtain proteases. The various tests carried out on the enzyme allowed the characterization of the latter as being stable and active at high salt concentration (extremophiles) since it is a haloenzyme, neutrophil (optimum activity at pH = 7.0), mesophilic (optimum activity at a temperature of 30 ° C), thermostable at 70 ° C for 280 min and is not a metallo protease (resistance to the chelating agent EDTA). In conclusion, the strain C3 and these extracellular proteases with a neutrophilic, thermoactive, and thermostable character means their potential application in the pharmaceutical, food and detergent industry.

Keywords: proteases, enzyme, strain, liquid fermentation, haloenzyme.