

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

Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département Biochimie-Microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

***Thème : Les protéases microbiennes :
Intérêts biotechnologiques***

Réalisé par : M^{lle} BOUSMIA Lynda

M^{lle} MABA Fatimata

Devant le jury :

Présidente : M^{me} HELLAL Z.

M.AA à l'UMMTO

Examinatrice : M^{me} BENZAOUZ K.

M.C.B à l'UMMTO

Promoteur : Mr OUELHADJ A.

Professeur à l'UMMTO

Année universitaire : 2020-2021

*Remerciements et
dédicaces*



Remerciements

En premier, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donné la santé, le courage et la patience pour être ce que nous sommes aujourd'hui et pour mener à terme ce modeste travail ;

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre promoteur monsieur OUELHADJ A. professeur au département de Microbiologie et Biochimie à l'UMMTO pour son aide, ses conseils et ses orientations.

Nous remercions aussi très sincèrement, la présidente madame HELLAÏ Z. maître assistante classe A à l'UMMTO et l'examinatrice madame BENAZZOÛZ K, maître conférence classe B à l'UMMTO d'avoir bien voulu accepter d'évaluer notre travail ;

Nous voudrions aussi témoigner notre reconnaissance et exprimer toute notre gratitude à nos enseignants qui ont participé pour une grande part dans notre formation ;

Nous adressons un grand merci à nos familles, nos amis et à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire :

A mes chers parents pour leurs sacrifices, amours, soutiens et prières tout au long de mes études.

A la mémoire de mon cher grand père BOUSENOU Mouhand oulhadj et ma chère grand-mère KHICHA Malha qui sont toujours vivants dans nos cœurs, paix à leur âme.

A mes chers frères, Ferhat, Youcef, Faredj pour leurs soutiens sur tous les plans.

A ma sœur Houa pour ses mots d'encouragement

A mes camarades ainsi que les professeurs et le personnel du département de Biochimie et Microbiologie.

A tous mes amis en particulier BAZ Titem et ma chère binôme MABA Fatimata.

Merci a tous d'être toujours là pour moi.

BOUSMIA Lynda

Dédicaces

Une volonté de fer et un moral d'acier décrivent mon parcours jusqu'ici. Pour atteindre ce niveau d'études, j'ai dû faire face à d'innombrables obstacles. Dieu merci j'ai bien été entourée et je tiens à dédier ce mémoire :

A mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu et pour qui les mots ne sont pas assez forts pour exprimer toute la gratitude et l'estime que je leur dois.

A mon oncle Badra Alou pour son aide, ainsi que le reste de la famille MABA

A mes enseignants et camarades du Lycée Bè-Kpota à Lomé pour leurs aides, amours, enseignements et encouragements

A mes frères, sœurs, cousins, cousines, tantes et oncles pour leurs soutiens moraux

A mes professeurs ainsi que camarades du département de Biochimie et Microbiologie

A tous mes amis (es) sans exception surtout ma binôme BOUSMIA Lynda

A la mémoire de tous les êtres chers que nous avons perdus.

Fatimata MABA

*Liste des
tableaux, figures,
et abréviations*

Tableau I : La classification des protéases	11
Tableau II : La spécificité du substrat de certaines enzymes protéique utilisées dans la recherche en biologie moléculaire	15
Tableau III : Nouveaux micro-organismes producteurs de protéase aux propriétés intéressantes	36
Tableau IV : Application des protéases dans différentes industries	37

Figure 1 : Distribution des ventes des enzymes

Figure 2 : Classification enzymatique avec réactions catalysées et groupe principal d'enzymes

Figure 3 : Enzyme protéolytique

Figure 4 : Action des aminopeptidases et carboxypeptidases éliminant les résidus d'acides aminés terminaux ainsi que les endopeptidases sur un substrat polypeptidique. Les flèches rouges montrent que les liaisons peptidiques doivent être clivées

Figure 5 : Mécanisme d'action des protéases à sérine

Figure 6 : Mécanisme d'action des protéases à cystéine

Figure 7 : Mécanisme d'action des protéases à aspartique

Figure 8 : Mécanisme d'action des métalloprotéases

Figure 9 : Diagramme montrant la procédure générale de purification des protéases microbiennes et de l'amylase

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

EC : Enzyme commission

ATP : Adénosine triphosphate

pH : Potentiel hydrogène

DFP : Diisopropylfluorophosphate

PDA : Potato Dextrose Agar

DAEA : Diéthylaminoéthyle

CM : Carboxyméthyle

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomique

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

PI : Point isoélectrique

ARN : Acide ribonucléique

Sommaire

Introduction.....	01
-------------------	----

Chapitre I : Protéases

I.1. Généralités sur les enzymes.....	03
I.1.1. Définition.....	03
I.1.2. Marché des enzymes.....	03
I.1.3. Origine et découverte des enzymes industrielles.....	04
I.1.4. Nomenclature et classification des enzymes.....	04
I.1.5. Classes et propriétés des enzymes.....	05
I.2. Enzymes protéolytiques.....	06
I.2.1. Généralités.....	06
I.2.2. Propriétés.....	07
I.2.3. Classifications et nomenclature.....	08
I.2.3.1. Classifications en fonction du site d'action enzymatique.....	08
I.2.3.2. Classification en fonction de la nature de résidu impliqué dans le site actif.....	10
I.2.3.3. Classification en fonction du pH d'activités.....	11
I.2.3.4. Classification selon la localisation cellulaire.....	12
I.2.3.5. Classification selon leur besoin en ATP.....	12
I.2.4. Sources des protéases.....	12
I.2.4.1. Protéases d'origine animale.....	12
I.2.4.2. Protéases d'origine végétale.....	13
I.2.4.3. Protéases d'origine microbienne.....	13

Chapitre II : Protéases microbiennes

II.1. Généralités.....	17
II.1.1. Caractéristiques des protéases microbiennes.....	17
II.1.2. Types de protéases microbiennes.....	18

II.1.2.1. Protéases alcalines.....	18
II.1.2.2. Protéases acides.....	19
II.1.2.3. Protéases neutres.....	19
II.1.3. Différentes classes de protéases et leurs mécanismes d'action.....	20
II.1.3.1. Protéases à sérine.....	20
II.1.3.2. Protéase à cystéine.....	21
II.1.3.3. Protéases aspartiques.....	22
II.1.3.4. Métalloprotéases.....	23
II.2. Production des protéases microbiennes.....	24
II.2.1. Production de protéases par les bactéries (<i>Bacillus Sp.</i>).....	25
II.2.1.1. Matériel et méthodes.....	25
II.2.2. Production de protéases par les champignons (<i>Aspergillus Sp.</i>).....	27
II.2.2.1. Matériel et méthodes.....	27
II.2.3. Production de protéases par la levure (<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>).....	29
II.2.3.1. Matériel et méthodes.....	29
II.3. Techniques de purifications des protéases.....	30
II.3.1. Chromatographie par filtration sur gel.....	30
II.3.2. Chromatographie d'affinité.....	31
II.3.3. Chromatographie échangeuses d'ions.....	31
II.3.4. Chromatographie à système biphasé aqueux.....	31
II.3.4. Chromatographie en phase liquide haute performance.....	31
II.3.5. Chromatographie liquide rapide des protéines.....	31
II.4. Ingénierie des protéases.....	32
II.5. Génie génétique des protéases microbiennes.....	33
II.5.1. Bactérie (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>).....	33
II.5.2. Champignons (<i>Tritirachium album Limber</i>).....	34
II.5.3. Levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	35

II.5.4. Virus (<i>Picornavirus</i>).....	35
--	----

Chapitre III : Intérêts biotechnologiques

III.1. Applications des protéases dans différentes industries.....	37
III.1.1. Industries de détergents.....	38
III.1.2. Industries de cuir.....	39
III.1.3. Industries pharmaceutiques.....	39
III.1.4. Synthèses des protéines.....	40
III.1.5. Industries alimentaires.....	40
III.1.6. Biorémediation.....	41
III.1.7. Industries médicales.....	41
III.1.8. Industries photographiques.....	42
III.1.9. Autres applications.....	43
III.2. Amélioration des rendements.....	43
Conclusion.....	44
Références bibliographiques.....	45

Introduction

La biotechnologie est l'un des domaines scientifiques qui s'est le plus développé au cours des dernières décennies grâce à l'intégration des sciences biologiques, physico-chimiques et d'ingénierie afin de parvenir à une des systèmes biologiques. Elle offre la possibilité de mettre au point de nouveaux procédés industriels qui nécessitent moins d'énergie et sont basés sur des matières premières renouvelables. C'est une technologie importante qui a un impact considérable sur de nombreux secteurs industriels différents notamment l'agriculture, l'agroalimentaire, les industries (chimiques, pharmaceutiques, de détergents, de recyclage), la bioremédiation, etc. Ces procédés se caractérisent par l'application directe d'organismes vivants ou de substances produites par les micro-organismes (Bhunja *et al.*, 2014).

Durant les dernières décennies, l'utilisation des enzymes comme catalyseurs industriels a eu une croissance phénoménale, elles agissent pour accélérer les réactions chimiques. De nos jours, les enzymes ont une grande part sur le marché des produits fermentés. La production mondiale d'enzymes atteint 53000 tonnes par an (75% des enzymes industrielles sont hydrolytiques). Il y a deux entreprises au nom de Novozymes et Danisco au Danemark qui produisent 70% de la production mondiale d'enzymes (Al-Manhel, 2018).

Les enzymes protéolytiques (protéases ou peptidases) représentent un groupe d'enzymes très répandues et complexes, qui sont utilisées dans d'innombrables industries. Elles possèdent des propriétés qui les différencient des autres enzymes comme : la spécificité du substrat, le site actif est le mécanisme catalytique, les optimums de pH et de température ainsi que les profils de stabilité (Velooralappil *et al.*, 2013).

Les micro-organismes représentent une excellente source de protéases, étant également la principale source de production. Bien que les enzymes protéolytiques puissent être obtenues à partir d'animaux et de plantes, les micro-organismes sont les principaux producteurs en raison de leurs avantages économiques et techniques, leur diversité biochimique et la possibilité de manipulation génétique (Santos Aguilar et Sato, 2018). Selon les chercheurs, les protéases contrôlent l'activation, synthèse et le renouvellement de protéines pour réguler les processus physiologiques tels que la formation, la naissance, le vieillissement et même la mort (Razzaq *et al.*, 2019).

Les protéases microbiennes peuvent être extracellulaires ou intracellulaires et leur production est fortement influencée par les facteurs suivants : la souche microbienne, des facteurs nutritionnels et physico-chimiques tels que la température, le pH, les sources d'azote

et de carbone, les sels inorganiques, l'agitation et la concentration d'oxygène dissous (Kasana *et al.*, 2011). En outre, les protéases microbiennes ont une durée de conservation plus longue et peuvent être stockées dans des conditions moins qu'idéales pendant des semaines sans perte significative d'activité. Elles sont généralement de nature extracellulaire et s'expriment directement dans le milieu de fermentation. Cela permet de simplifier le traitement en aval des enzymes par rapport à leurs homologues végétaux et animaux. Les producteurs appropriés de ces enzymes pour une exploitation commerciale sont non-toxiques et non pathogène (Mienda *et al.*, 2014).

Les protéases d'origine microbienne sont préférées aux autres protéases pour les applications industrielles. En général, la production de protéases à partir de micro-organismes est constitutive ou partiellement inductible dans la nature. Les protéases de sources microbiennes ont trouvées des applications commerciales dans l'industrie de détergents, de la tannerie, l'industrie de cuir, la synthèse des peptides, la brasserie, l'industrie pharmaceutique et l'industrie de traitements des déchets (Singh *et al.*, 2016).

C'est dans cette perspective que nous nous sommes intéressés à l'étude des protéases microbiennes ainsi que leurs intérêts biotechnologiques. Ce mémoire se divise en trois chapitres et a pour objectifs de :

- Décrire les différentes sources de protéases
- Décrire les processus de production et de purification des protéases microbiennes
- Relater l'importance des protéases microbiennes dans les différentes industries.

Chapitre I

Protéases

I.1. Généralités sur les enzymes

I.1.1. Définition

L'organisme humain est le siège de nombreuses réactions chimiques sans qu'elles ne soient déclenchées par une source de chaleur. Le métabolisme catalyse ces réactions en utilisant des substances qui vont multiplier la vitesse de celles-ci. Ces substances sont appelées enzymes ou biocatalyseurs. Elles sont donc des acteurs incontournables de la vie de la cellule.

Une enzyme est une protéine capable d'accélérer les réactions chimiques du métabolisme se déroulant dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Elle appartient à la famille des catalyseurs. Elle agit sur la vitesse de réaction mais ne change pas avec cette dernière. Une enzyme, toute comme une protéine est synthétisée par les cellules vivantes à partir des informations codées dans l'ADN. Il existe plus de 3500 enzymes (Drouin, 2005 ; Robinson, 2015).

I.1.2. Marché des enzymes

Le marché global des enzymes industrielles et de spécialité conserve une forte croissance. Estimé à plus de 1,5 milliards US\$ en l'an 2000. Parmi les enzymes industrielles, les protéases occupent la part majeure des ventes des enzymes (figure 1), soit environ 60% (Rai et Mukherjee, 2010).

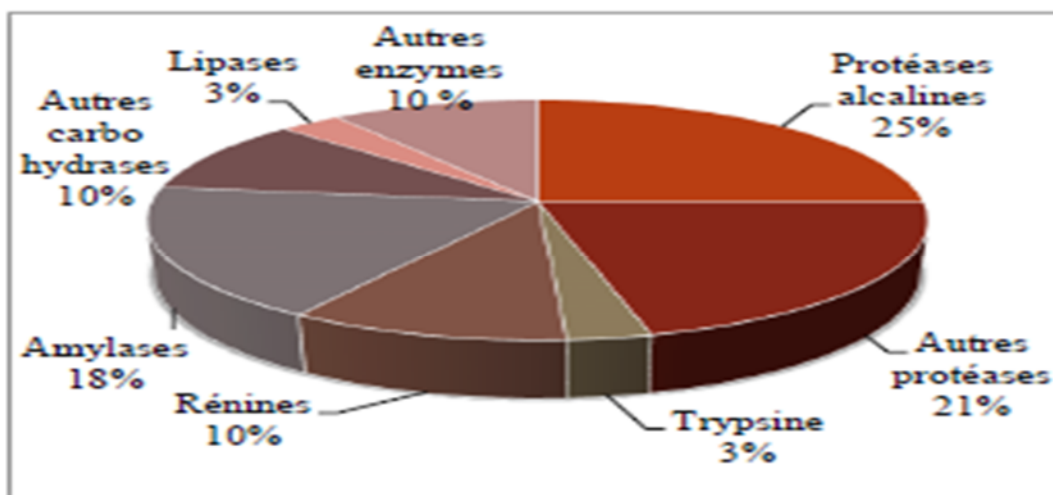


Figure 1 : Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

I.1.3. Origine et découverte des enzymes industrielles

Les enzymes présentes dans la nature sont utilisées depuis l'antiquité dans la production de produits alimentaires, tels que le fromage, le levain, la bière, le vin et le vinaigre, et dans la fabrication de produits de base tels que le cuir, l'indigo et le lin. Tous ces processus reposaient sur soit des enzymes produites par des micro-organismes se développant spontanément, soit des enzymes présentes dans des préparations ajoutées telles que le rumen de veau ou le fruit de papaye.

L'utilisation de la technologie des gènes recombinants a permis d'améliorer les procédés de fabrication et la commercialisation d'enzymes qui ne pouvaient pas être produites auparavant. En outre, les derniers développements de la biotechnologie moderne introduisant l'ingénierie des protéines et l'évolution dirigée, ont encore révolutionné le développement des enzymes industrielles.

Ces progrès ont permis de fournir des enzymes sur mesure présentant de nouvelles activités et adaptées à de nouvelles conditions de traitement, ce qui permet une nouvelle expansion de leur utilisation industrielle (Kirk *et al.*, 2002).

La nature fournit une grande quantité de ressources en enzymes microbiennes. La capacité à exploiter cette immense biodiversité dépend des outils disponibles pour étendre la recherche de nouvelles enzymes par : le criblage du métagénome, l'exploration du génome dans plus de 2000 génomes microbiens séquencés, et l'exploration de la diversité des extrêmophiles (Adrio et Demain, 2014).

I.1.4. Nomenclature et classification des enzymes

Le premier schéma de nomenclature enzymatique a été présenté au Congrès international de Biochimie en Bruxelles, où « *La Commission Enzymatique (CE)* » a été définie ; en 1961 la première version a été publiée. En 1992, l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a publié la sixième édition comprenant 3196 enzymes différentes (De souza Vandenberghe *et al.*, 2020).

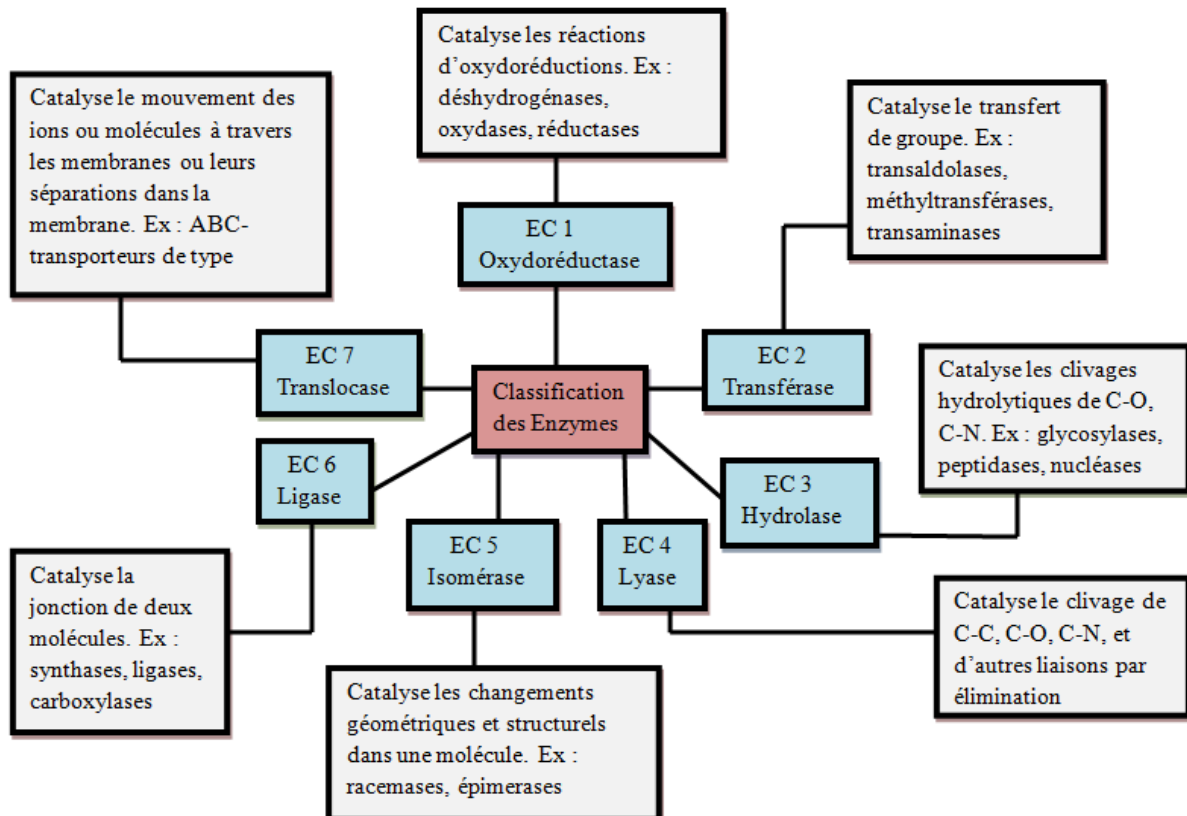
La classification des enzymes suit le numéro EC. Elles sont classées selon les réactions catalysées où le nom correspond à une seule protéine enzymatique et peut également être liée à un groupe de protéines ayant la même propriété catalytique. Six classes d'enzymes ou six niveaux d'EC ont été définis, y compris les oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases. En août 2018, EC a inclus une septième enzyme catégorie (EC 7), qui regroupait les translocases (De souza Vandenberghe *et al.*, 2020).

La classification des séquences d'enzymes et structures a été soutenue par des modèles évolutifs et biophysiques, ce qui a permis la connaissance de séquence et similitude structurale. Le numéro d'EC, est composé de quatre (4) chiffres :

- Premier nombre indique la classe de l'enzyme ;
- Deuxième nombre donne la sous-classe ;
- Troisième numéro indique la sous-sous-classe ;
- Quatrième numéro est le numéro de série de l'enzyme dans sa sous-sous-classe.

I.1.5. Classes et propriétés des enzymes

Les sept classes d'enzymes sont décrites, y compris les réactions qu'elles catalysent, le groupe principal d'enzymes incluses dans chaque classe et certaines de leurs caractéristiques



(figure 2) (De souza Vandenberghe *et al.*, 2020).

Figure 2 : Classification enzymatique avec réactions catalysées et groupe principal d'enzymes (De souza Vandenberghe *et al.*, 2020).

I.2. Enzymes protéolytiques

I.2.1. Généralités

Les enzymes protéolytiques sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques entre les résidus d'acides aminés des protéines (figure 3). Elles sont souvent appelées protéases ou peptidases. L'Union Internationale de Biochimie et de la Biologie Moléculaire recommande cependant le terme peptidase. Les protéases sont utilisées depuis longtemps au profit des humains (Dhillon *et al.*, 2017).

Les peptidases ont la capacité de dégrader "in vitro" une multitude de substrats et parfois certaines dégradent "in vitro" un même substrat. Cette fonction provient du fait que la spécificité d'une protéase en général n'intervient peu ou pas au niveau de la conformation du substrat, mais plutôt au niveau de la liaison peptidique à cliver (Barry, 1997 ; Reginald *et al.*, 2000).

Les protéases sont omniprésentes, on les retrouve dans tous les organismes vivants et sont essentielles à la croissance cellulaire, au métabolisme, à la signalisation, à la différenciation et à d'autres fins physiologiques (Banerjee et Ray, 2017). La plupart des protéases sont produites sous forme de zymogène, la forme inactive. Les zymogènes sont activés par des signaux environnementaux ou par la rencontre de leur substrat spécifique, ce qui peut entraîner un changement de conformation (Dhillon *et al.*, 2017).

Les enzymes protéolytiques sont importantes parmi les enzymes industrielles. Elles sont résistantes à haute température avec activités spécifiques élevées puis des caractéristiques physiques et chimiques supérieures. Ces enzymes représentent environ 60% de la vente mondiale du marché total de l'enzyme (Figure 3) (Mukhtar et Haq, 2009).

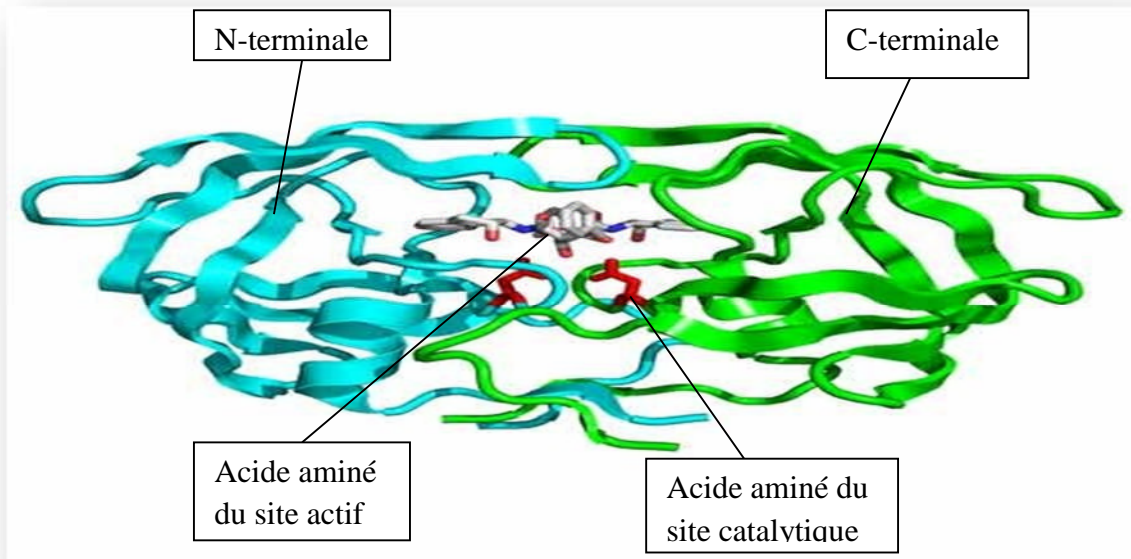


Figure 3 : Enzyme protéolytique (Holliday *et al.*, 2012).

I.2.2. Propriétés

La nature de l'acide aminé et d'autres groupes fonctionnels tels que aromatiques, aliphatiques ou la présence de sulfure autour de la liaison à hydrolyser régissent sur la spécificité d'action des enzymes protéolytiques (Sumantha *et al.*, 2006; Benedykt et Katarzyana, 2008).

L'une de leurs importances est qu'elles ne contrôlent pas seulement les réactions protéolytiques, mais aussi elles régulent les diverses cascades enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire (la décomposition des lipides et des glucides).

Les protéases peuvent être dangereuses pour les cellules en altérant leur environnement. De ce fait, la cellule a développé une large gamme des mécanismes pour contrôler l'activité protéolytique. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles, l'interaction avec les inhibiteurs et d'autres protéines) (Benedykt et Katarzyna, 2008).

I.2.3.1. Classification en fonction du site d'action enzymatique

Selon leur site d'action, les protéases peuvent être subdivisées en deux groupes : exopeptidases et endopeptidases (Mótyán *et al.*, 2013; Sethia, 2016).

A. Exopeptidase

Elle catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques à proximité des extrémités N- ou C-terminales du substrat. Elle est répartie en deux (aminopeptidases et carboxypeptidases).

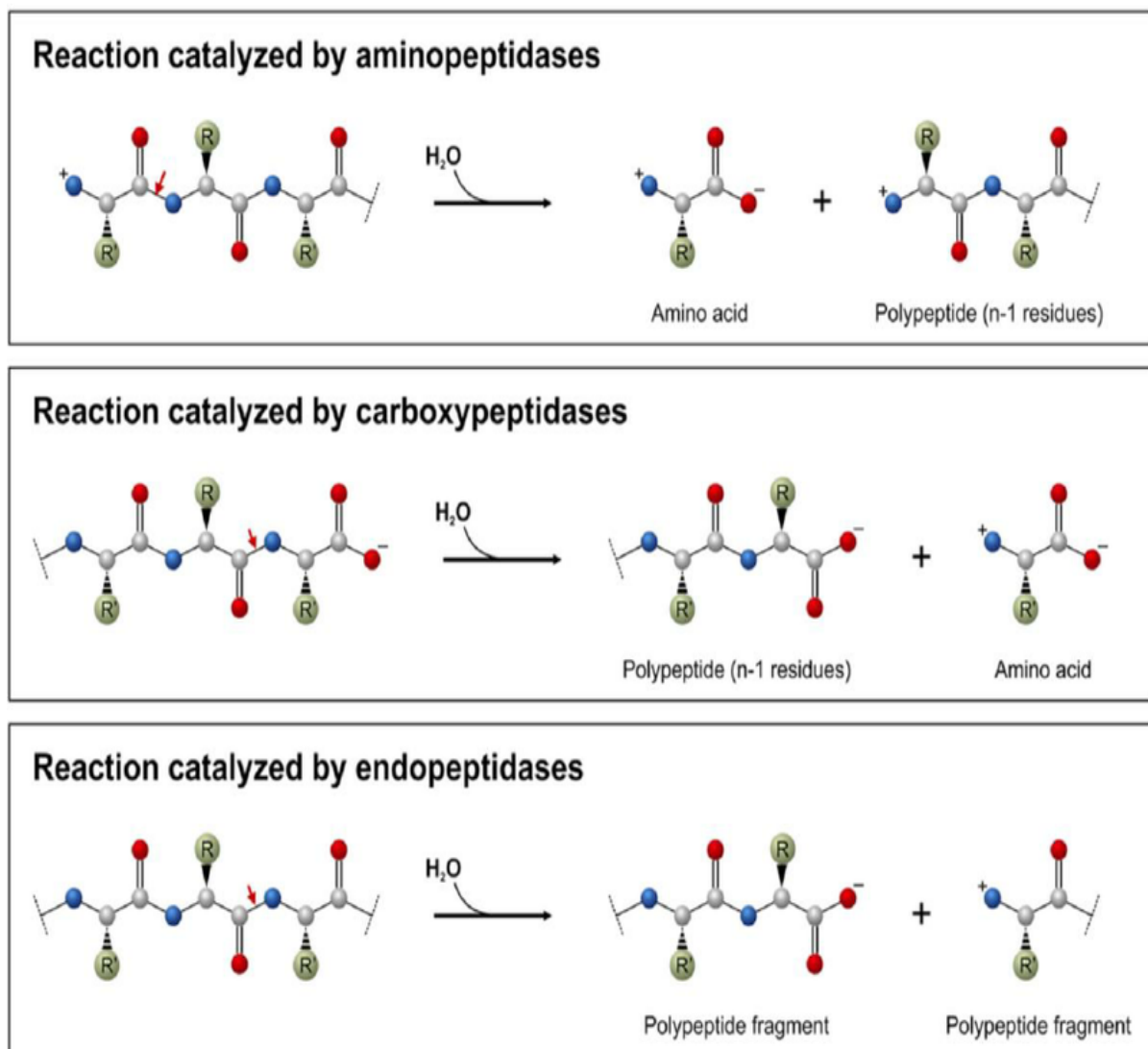
❖ **Les aminopeptidases** : elles agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé (aminopeptidase EC 3.4.11), un dipeptide ou tripeptide (dipeptidyl-peptidases et tripeptidyl-dipeptidases EC 3.4.14). Elles sont spécifiques pour la libération de résidu méthionine, en position N-terminale et qui est retrouvé dans les protéines recombinantes mais pas dans les protéines matures d'origine naturelle (figure 4) (Mótyán *et al.*, 2013).

❖ **Les carboxypeptidases** : celles-ci agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines, libérant ainsi un seul acide aminé (carboxypeptidases EC 3.4.16, EC 3.4.17 et EC 3.4.18) ou un dipeptide (peptidyl-dipeptidases EC 3.4.15) (Mótyán *et al.*, 2013).

Certaines exopeptidases sont spécifiques de dipeptides particuliers et sont nommées dipeptidases (EC 3.4.13). Il ya aussi les oméga peptidases (EC 3.4.19) qui hydrolysent les liaisons peptidiques impliquant un résidu terminal d'acide aminé qui est modifié, cyclisé ou lié par des ponts isopeptidiques (Cavasin *et al.*, 2004 ; Szeltner et Polgar, 2008 ; Bouacem, 2016).

B. Endopeptidase

Elle coupe les liaisons peptidiques à l'intérieur et à distance des extrémités d'une chaîne polypeptidique (Mótyán *et al.*, 2013). Elle est subdivisée en sept sous-sous-classes distinctes à savoir : endopeptidases à sérine (EC 3.4.21), endopeptidases à cystéine (EC 3.4.22), endopeptidases à acide aspartique (EC 3.4.23), endopeptidases à acide glutamique (EC 3.4.23), endopeptidases à asparagine (EC 3.4.23), endopeptidases à métal (E.C. 3.4.24), endopeptidase à thréonine (EC 3.4.25). D'autres endopeptidases dont le mécanisme catalytique reste inconnu, sont regroupées dans une classe à part (sous-sous-classe EC 3.4.99)



(Rao *et al.*, 1998 ; van der Hoorn, 2008 ; Bouacem, 2016).

Figure 4 : Action des aminopeptidases et carboxypeptidases éliminant les résidus d'acides aminés terminaux ainsi que les endopeptidases sur un substrat polypeptidique. Les flèches rouges montrent que les liaisons peptidiques doivent être clivées (Mótyán *et al.*, 2013).

I.2.3.2. Classification en fonction de la nature de résidu impliqué dans le site actif

Les enzymes protéolytiques peuvent être globalement regroupées en six types catalytiques basés sur la nature du nucléophile dans la réaction. En 1993, Rawlings & Barrett ont reconnu quatre types catalytiques: la sérine, la cystéine, l'aspartique et le métallo, un concept qui pourrait être retracé aux idées de Hartley.

Dans la sérine et la cystéine peptidase, le nucléophile est hydroxyle (OH) sur la chaîne latérale du site actif sérine ou le thiol (SH) sur la chaîne latérale du site actif cystéine. Dans l'aspartique et le métallopeptidase, le nucléophile est une molécule d'eau (H_2O), qui dans les peptidases aspartiques est activée par deux aspartates et dans les deux métallopeptidases par un ou deux ions métalliques (généralement le zinc, mais aussi le cobalt, le manganèse, le nickel, le cuivre et le fer).

En 1995, un cinquième type catalytique a été découvert lorsque la structure du protéasome a été résolue, et il a été découvert que trois des dix sous-unités différentes étaient des peptidases, possédant une thréonine N-terminale qui agissait comme nucléophile. Le sixième type catalytique a été identifié en 2004 lorsque certaines endopeptidases fongiques maintenant connues sous le nom d'éqolysines se sont révélées être des glutamates peptidases (Tableau 1) (Rawlings *et al.*, 2011).

Tableau I : La classification des protéases (Rao et *al.*, 1998 ; Kumar et *al.*, 2008 ; Bhunia et *al.*, 2014).

Protéase	EC
Exopeptidases	
▪ Aminopeptidases	3.4.11
- Dipeptidyl peptidase	3.4.14
- Tripeptidyl peptidase	3.4.14
▪ Carboxypeptidases	3.4.16 – 3.4.18
- Protéase de type sérine	3.4.16
- Métalloprotéase	3.4.17
- Protéase de type cystéine	3.4.18
- Peptidyl dipeptidase	3.4.15
- Dipeptidases	3.4.13
▪ Oméga peptidases	3.4.19
Endopeptidases	
	3.4.21 – 3.4.34
▪ Protéase à sérine	3.4.21
▪ Protéase à cystéine	3.4.22
▪ Protéase à aspartique	3.4.23
▪ Métalloprotéase	3.4.24
▪ Endopeptidases des mécanismes catalytiques inconnus	3.4.99

I.2.3.3. Classification en fonction du pH d'activités

Les enzymes protéolytiques sont classés selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéase neutres (pH optimal 7), acides (pH optimal inférieure à 7, entre 2 et 5) et alcalines (pH optimal supérieure à 7) (Sethia, 2016).

Les protéases alcalines produites à partir de micro-organismes jouent un rôle important dans les industries et le genre *Bacillus* est une source importante de ces protéases industrielles et il est probablement le seul genre commercialisé pour leur production.

Les protéases neutres sont principalement d'origine végétale avec une activité optimale à un pH compris entre 8 et au-dessus par contre les protéases acides sont produites principalement par les champignons et les meilleures de ces protéases sont obtenues dans un intervalle de pH de 2 à 5 (Alnahdi, 2012).

I.2.3.4. Classification selon la localisation cellulaire

Dans cette classification, nous avons les protéases intracellulaires et extracellulaires

A. Les protéases intracellulaires

Elles ont pour fonction essentielles l'élaboration et la régulation des processus cellulaires et métaboliques, ce genre de protéases est moins utilisé dans les industries car ces enzymes ont besoin d'une étape de lyse cellulaire pour en faire l'extraction.

B. Les protéases extracellulaires

Ces dernières catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides assimilables. Leur utilisation dans les industries sont intéressantes car elles ne nécessitent pas une lyse cellulaire pour l'extraction (Mala *et al.*, 1998).

I.2.3.5. Classification selon leur besoin en ATP

Ce groupe de protéases comprend celles qui sont composées de plusieurs sous unités contenant des domaines d'ATPase et des domaines protéolytiques. Ils existent des protéases qui n'appartiennent à aucun groupe de classement telles que les signaux peptidases des lipoprotéines (Kumar *et al.*, 1998).

I.2.4. Sources des protéases

Les enzymes protéolytiques sont produites par toutes les formes de vie : plantes, animaux et micro-organismes. Les enzymes protéolytiques de toutes ces sources ont été utilisées à un moment ou à un autre de l'histoire de l'humanité. Cependant, pour répondre à l'énorme demande des industries, les micro-organismes ont été le pilier de la source d'enzymes protéolytiques. Un rendement élevé des enzymes protéolytiques peut être obtenu par la culture de micro-organismes, qui se développent en peu de temps et nécessitent moins d'espace que les sources végétales ou animales (Dhillon *et al.*, 2017).

I.2.4.1. Protéases animales

Les protéases les plus familiers d'origine animales sont : les trypsines, les chymotrypsines, les pepsines et les rénines.

- La trypsine est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires.

- La chymotrypsine se trouve dans l'extrait pancréatique animal ; quand elle est pure, elle est coûteuse et n'est utilisée que pour des applications diagnostiques et analytiques
- La pepsine est une protéase acide se trouvant dans l'estomac de presque tous les vertébrés. Elle était utilisée dans les détergents à lessive dès 1913 mais maintenant elle est remplacée par un mélange de sérine et de protéase microbienne métallique qui semble être la moins dégradée par les savons, les conditions alcalines et les températures sont élevées.
- La rénine est une protéase de type pepsine qui est produite comme précurseur inactif dans l'estomac de tous les mammifères allaitants. Elle est convertie en rénine active sous l'action de la pepsine. Elle est largement utilisée dans l'industrie laitière pour produire un caillé stable avec une bonne saveur (Bhunia *et al.*, 2014).

I.2.4.2. Protéases végétales

Les enzymes protéolytiques des plantes sont impliquées dans des processus physiologiques clés tels que la photo-inhibition, la photomorphogenèse des graines et la sénescence (Dhillon *et al.*, 2017).

La papaïne, la bromélaïne, les cardosines, les cynarases, et les ficines représentent certaines des protéases bien connues d'origine végétale (Bhunia *et al.*, 2014). Les protéases d'origines végétales ont des applications dans les industries alimentaires et celles des détergents (Gaur *et al.*, 2010).

I.2.4.3. Protéases microbiennes

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre à la demande mondiale actuelle a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes. L'application commerciale de protéases microbiennes est intéressante en raison de la facilité relative de la production à grande échelle par rapport aux protéases de plantes et d'animaux. Les protéases microbiennes représentent environ 40% du total des ventes mondiales d'enzymes et sont en général de nature extracellulaire.

Les microorganismes représentent une source intéressante de protéases car ils peuvent être cultivés en grandes quantités en un temps relativement court par des procédés de fermentation établis produisant un approvisionnement régulier et abondant du produit

souhaité. En outre, ils peuvent être manipulés génétiquement pour générer de nouvelles enzymes (Bhunia *et al.*, 2014).

Elles peuvent être produites par les bactéries, les champignons, les levures (El enshasy *et al.*, 2008) et les virus (Joo *et al.*, 2007). Ces protéases sont de plus en plus utilisées à cause de leur importance et de leurs applications dans l'industrie et la biotechnologie (Krishna *et al.*, 2009).

A. Bactéries

Les protéases bactériennes sont les plus importantes par rapport aux protéases animales et fongiques. Parmi les bactéries, les espèces de *Bacillus* sont les producteurs spécifiques de protéases extracellulaires (Das et Prasad, 2010). Un grand nombre de protéases bactériennes a été découvert, purifié et caractérisé, mais très peu d'entre elles sont utilisées dans des procédés industriels à grande échelle en raison de leur coût élevé, la difficulté lors de la purification et surtout le fait que ces enzymes sont de nature fragile (Kumar *et al.*, 2008). Ces protéases sont neutres et sont actives dans la gamme de pH 5 à 8 et ont une faible thermostabilité par rapport aux protéases alcalines bactériennes (Dhillon *et al.*, 2017).

B. Champignons

Tout comme les protéases bactériennes, celles issues des champignons sont également très utilisées. Les champignons sont polyvalents dans la production d'enzymes et produisent des protéases acides, neutres et alcalines d'où le pH comprise en 4 et 11. La thermostabilité et la vitesse de réaction que possèdent les protéases fongiques ne sont pas élevées par rapport à celles des bactéries à l'exception de l'enzyme produite par le champignon thermophile *Malbranchea pulchella*. Un nombre important d'espèces d'*Aspergillus* sont connus pour leurs productions des protéases extracellulaires (Siala *et al.*, 2009).

C. Virus

Les protéases virales ont une grande importance en raison de leur implication fonctionnelle dans les traitements contre les virus qui causent certaines maladies mortelles comme le Sida et le cancer. Les protéases à sérines, aspartiques, cystéines, et les peptidases sont retrouvées dans différents virus. Les protéases sont classées sur la base de leurs mécanismes catalytiques, en outre, les principales sources et spécificités enzymatiques sont indiquées. Les flèches indiquent les sites des clivages (Tableau II) (Rao *et al.*, 1998).

Il y a également quelques protéases qui sont produites par les levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* et *Rhodotorula mucilaginosa*.

Tableau II : La spécificité du substrat de certaines enzymes protéolytiques utilisées dans la recherche en biologie moléculaire (Mótyán *et al.*, 2013).

ENZYME	SOURCE	SITE DE CLIVAGE
Endopeptidases		
<i>Protéases à sérine</i>		
Trypsine	Bovin	-Arg ou Lys↓non spécifique-
Chymotrypsine	Bovin	-Trp(ou Phe,Leu,Try)↓non-spécifique-
Enterokinase	Bovin	Asp-Asp-Asp-Lys↓non spécifique-
Endoprotéinase Arg-C	Microbienne	-Arg↓non spécifique-
Endoprotéinase Glu-C	Microbienne	-Glu(ou Asp) ↓non spécifique-
Endoprotéinase Lys-C	Microbienne	-Lys↓non spécifique-
Elastase	Porcin	-Ala(ou Val ou Gly) ↓non spécifique-
Subtilisine	Microbienne	-Trp(ou Tyr,Phe,Leu)↓non spécifique-
Protéinase k	Fongique	-aromatique, aliphatique↓nonspecifique-
Thrombine	Bovin	-Arg(ou Lys) ↓non spécifique-spécifique pour -Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser-
Facteur Xa	Bovin	-Arg(ou Lys) ↓non spécifique-spécifique pour -Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser-
Protéase WNV	E.coli	-Lys(ou Arg)-Arg↓Gly-Ser-
<i>Protéase à cystéine</i>		
Bromelaine	Végétale	-non spécifique↓non spécifique-
Papaine	Végétale	-Asp(ou Lys) ↓non spécifique-
Ficine	Végétale	-non spécifique↓non spécifique-
Rhinovirus 3C	E.coli	Dipeptide Gly-pro après la liaison scissile Très spécifique pour la liaison Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↓Gly-Pro-
Protéase TEV	E.coli	Spécifique pour -Gln-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly-
Protéase TVMV	E.coli	Spécifique pour -Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln↓Ser-

<i>Metalloprotéases</i>		
Endoprotéinase Asp-N	Microbienne	-Non spécifique ↓ Asp-
Thermolysine	Microbienne	-Leu(ou Phe) ↓ Leu(ou Phe, Val, Met, Ala, Ile)-
Collagenase	Microbienne	-Pro-neutre ↓ Gly-Pro-
Dipase	Microbienne	-non spécifique ↓ non polaire-
<i>Protéases aspartiques</i>		
Pepsine	Porcin	-Phe(ou Tyr, Leu, Trp) ↓ Trp(ou Phe, Tyr, Leu)-
Cathepsine	Bovin	-Phe(ou Leu) ↓ non spécifique (pas de Val, Ala)-
Exopeptidase		
<i>Protéases à sérines</i>		
Carboxypeptidase Y	Levure	-Non spécifique ↓ non spécifique
<i>Protéases à cystéines</i>		
Cathepsin C	Bovin	Enlève le dipeptide N-terminale
DAPase	Porcin	Enlève le dipeptide N-terminale
<i>Métalloprotéases</i>		
Carboxypeptidase A	Bovin	-Non spécifique ↓ aromatique ou ramifiée préféré
Carboxypeptidase B	Porcin	Spécifique pour C-terminale Arg ou Lys

Chapitre II
Protéases
microbiennes

II.1. Généralités

L'incapacité des protéases végétales et animales à répondre aux demandes mondiales actuelles a conduit à un intérêt accru pour les protéases microbiennes (Bhunia *et al.*, 2014). Elles sont plus préférées par rapport aux protéases végétales et animales à cause de la présence de toutes les caractéristiques souhaitées pour les applications industrielles (Razzaq *et al.*, 2019).

Les micro-organismes représentent une source attrayante de protéases car ils peuvent être cultivés en grandes quantités en un temps relativement court par des méthodes de fermentation établies produisant un approvisionnement abondant et régulier du produit souhaité.

En outre, les micro-organismes peuvent être manipulés génétiquement pour générer de nouvelles enzymes. Les protéases disponibles sur les marchés sont d'origine microbienne à cause de leur rendement élevé, de leur faible consommation de temps, de leur faible besoin d'espace, de leur manipulation génétique élevée et de leur rentabilité, qui les ont rendues appropriées pour les applications biotechnologiques sur le marché (Bhunia *et al.*, 2014).

II.1.1. Caractéristiques des protéases microbiennes

Les microorganismes vivent dans un environnement où les nutriments disponibles sont sous forme macromoléculaires (protéines, lipides et glucides), ils doivent donc les convertir en plus petites molécules. La décomposition de ces macromolécules est accomplie par l'action de différents types d'enzymes.

Les protéases sont des classes d'enzymes les plus importantes qui convertissent les protéines complexes en peptides plus petits ou en acides aminés (Banerjee et Ray, 2017). Celles produites par des sources microbiennes sont classées en groupes selon leurs propriétés acides ou basiques. Elles sont également classées en fonction de la présence de groupes fonctionnels et la position de la liaison peptidique. Un grand nombre de protéases intracellulaires sont produites par des microorganismes jouant un rôle vital dans la différenciation, le renouvellement des protéines, la régulation hormonale et le groupe de protéines cellulaires. Quant aux protéases extracellulaires, elles sont importantes dans l'hydrolyse des protéines, par exemple dans le traitement des films photographiques, la synthèse enzymatique sur la base de solvant et de détergents, dans la tolérance thermique et la production d'hydrolysats de zéine.

Les enzymes protéolytiques trouvées dans les microorganismes et les systèmes mammaliens sont de petites tailles, denses et structurellement sphériques. Habituellement, les protéases alcalines extracellulaires sont sécrétées par le producteur dans le bouillon liquide à

partir duquel ces protéases sont purifiées pour obtenir un produit final. En comparaison, les protéases produites par les plantes et les animaux demandent plus de travail que les protéases produites par les microorganismes (Razzaq *et al.*, 2019).

Ces enzymes rentrent dans la régulation de plusieurs réactions enzymatiques impliquées dans le métabolisme cellulaire tel que la décomposition des lipides et des glucides. Cette régulation peut être effectuée à n'importe quelle étape de l'expression des gènes (la transcription depuis l'opéron, la traduction, les modifications post-traductionnelles) (Réginald, 2000 ; Benedykt et Katarzyna, 2008).

II.1.2. Types de protéases microbiennes

II.1.2.1. Protéases alcalines

Le genre *Bacillus* est un producteur essentiel de la protéase alcaline (EC 3.4.21-24.99), commercialement importante qui est active à un pH alcalin compris entre 9 et 11. Ces producteurs de protéases alcalines sont distribués dans l'eau, le sol et les conditions hautement alcalines. L'industrie des détergents consomme le plus de protéases alcalines, qui sont des protéases à sérine dont le pH est alcalin.

Les protéases alcalines sont uniques par leur activité et maintiennent un pH alcalin constant tout en étant exploitées pour différentes formulations dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et autres. Un large éventail d'applications de ces protéases alcalines fait l'objet d'une plus grande attention des chercheurs dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches avec des propriétés uniques et une activité substantielle.

Deux types essentiels de protéases alcalines telles que la subtilisine Carlsberg et la subtilisine novo, sont obtenues à partir de *Bacillus Sp.* qui peuvent être utilisées comme enzyme industrielle pour produire des hydrolysats de zéine. Dans les sources halophiles, différentes espèces microbiennes sécrétant des protéases alcalines à base de sérine sont également rapportées.

Une souche de *Salinivibrio Sp.*, AF2004, produit une protéase de type métallo avec une tolérance thermique raisonnable et une large gamme de pH (5 - 10). Il s'agit d'une souche hautement recommandée en raison de ses propriétés thermiques et halophiles.

Une autre souche, *Bacillus clausii*, est également recommandée pour une utilisation à l'échelle commerciale pour la production de protéase alcaline avec l'utilisation de peptone, et du fructose comme seule source d'énergie. Le pH optimal et la température recommandés sont de 8 - 9 et 37- 40°C respectivement (Razzaq *et al.*, 2019).

II.1.2.2. Protéase acide

Les protéases acides sont stables et actives entre pH 3,8 et 5,6 et sont fréquemment utilisées dans la sauce soja, les hydrolysats de protéines, les aides digestives et dans la production d'assaisonnements. Le pH optimal des protéases acides est de (3 à 4) et le point isoélectrique (PI) se situe entre 3 et 4,5 avec un poids moléculaire de 30 à 45 kDa.

En comparaison aux protéases alcalines, ces protéases acides extracellulaires sont principalement produites par des espèces fongiques, comme *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus saitoi*. La plupart des protéases acides extracellulaires fongiques sont connues sous le nom d'opepsines d'*Aspergillus*. Les protéases aspartiques sont des protéases acides constituées de 380 à 420 longues chaînes de résidus d'acides aminés constituant le site actif pour l'activité catalytique.

Ces protéases acides sont des endopeptidases et sont regroupées en trois familles : pepsine, rétropepsine et enzymes des para rétrovirus. Une grande spécificité des protéases acides se manifeste contre les résidus d'acides aminés aromatiques situés des deux côtés de la liaison peptidique. Ces résidus d'acides aminés aromatiques avec des liaisons peptidiques sont similaires à la pepsine mais moins rigoureux dans leur action.

De manière générale, les protéases acides sont divisées en deux groupes : les enzymes de type pepsine et les enzymes de type rénine produites par *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Endothia* et *Mucor* (Razzaq et al., 2019).

II.1.2.3. Protéases neutres

Les protéases neutres sont définies telles qu'elles sont et sont actives à un pH allant de 5 à 8. La plupart des protéases neutres appartiennent au genre *Bacillus* et ont une thermotolérance relativement faible. Elles génèrent moins d'amertume lors de l'hydrolyse des protéines alimentaires en raison d'une vitesse de réaction moyenne ; elles sont donc précieuses dans les industries alimentaires.

La neutrase est incorporée dans l'industrie brassicole en raison de son insensibilité aux inhibiteurs de protéinase des plantes. Sur l'affinité élevée pour les acides aminés hydrophobes, les protéases neutres sont identifiées et caractérisées. Pendant la production d'hydrolysats alimentaires, il est légèrement avantageux de contrôler la réactivité des protéases neutres en raison de leur faible résistance à la chaleur. Un ion métallique divalent est nécessaire pour l'activité des protéases neutres appartenant au type métalloprotéase (Razzaq et al., 2019).

II.1.3. Les différentes classes de protéases et leurs mécanismes d'action

II.1.3.1. Les protéases à sérine

A. Propriétés

Les protéases à sérine possèdent un groupe sérine sur leur site actif. Elles sont abondantes et largement répandues parmi les virus, bactéries et eucaryotes, ce qui suggère leur importance vitale pour les organismes. Les protéases à sérine sont inactivées par les esters de phosphate organiques qui acylent le résidu actif de la sérine. Les protéases à sérine sont généralement actives à pH neutre et alcalin, ayant un optimum entre 7 et 11 (Chander, 2019).

B. Mécanisme d'action

Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine à une telle façon que le groupement carbonyle soit proche de la sérine (figure 5). Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine prend le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se met en place, ensuite l'enzyme est désacylée et l'extrémité C-terminale est cédée (Lopez, 2008).

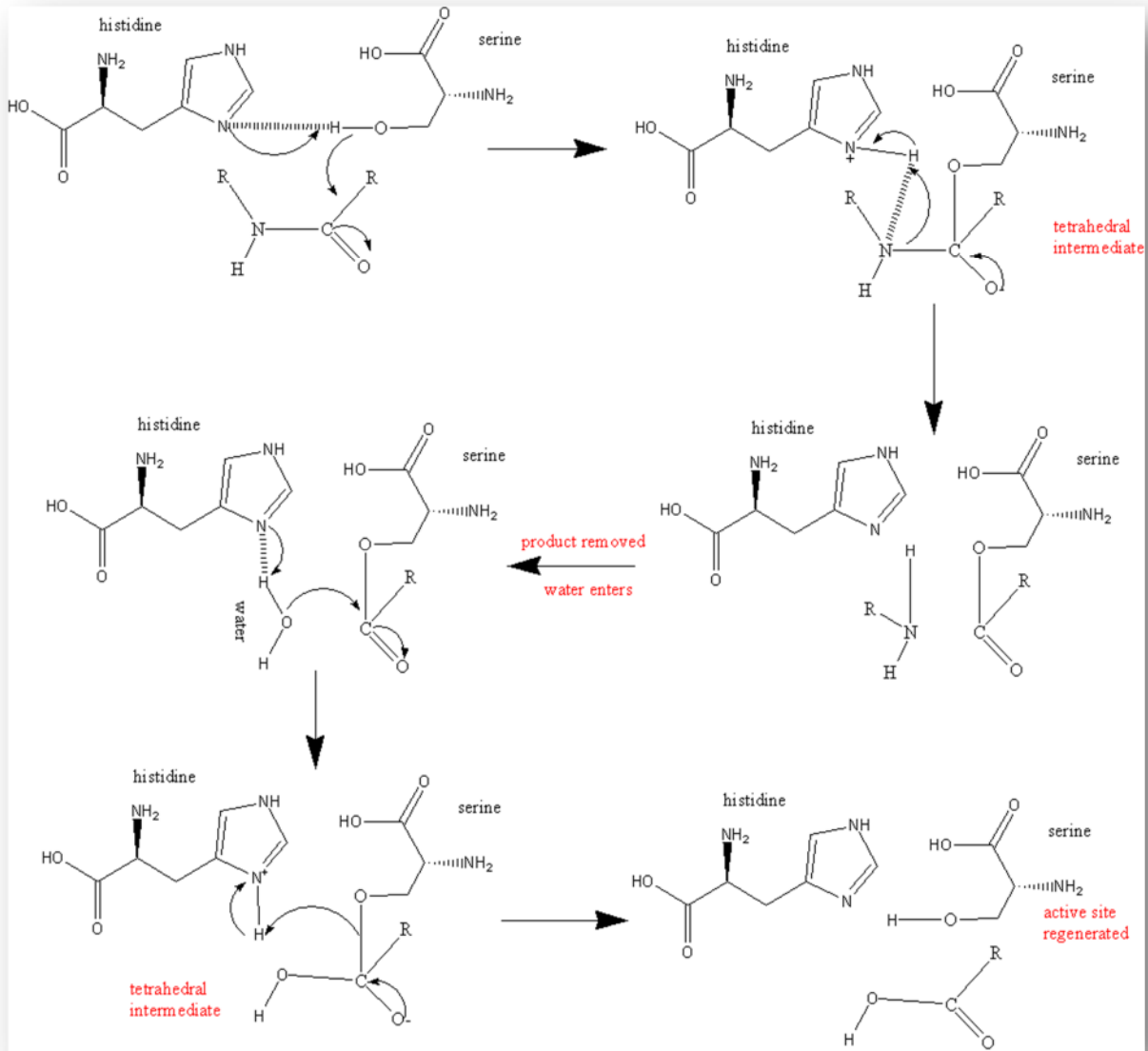


Figure 5 : Mécanisme d'action des protéases à sérine (Snellios, 2006).

II.1.3.2. Protéase à cystéine

A. Propriétés

Les protéases à cystéine sont présentes aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Elles possèdent de la cystéine dans leur site actif et ont un pH optimal compris entre 6 et 8. Elles sont activées par des agents réducteurs tels que l'acide cyanhydrique et sont inhibées par des agents oxydants. Elles sont sensibles à l'agent thiol (SH) mais ne sont pas affectés par le DFP et les agents chélateurs de métaux. L'activation par les agents réducteurs est due à la régénération du groupe SH. Leur température optimale se situe entre 50 et 70°C (Chander, 2019).

B. Mécanisme d'action

Le mécanisme catalytique primordial des protéases à protéase est la déprotonisation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme qui est effectué par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (parfois c'est une histidine) (figure 6).

Le deuxième mécanisme consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupement carbonyle du substrat. Au cours de cette étape, un fragment du substrat est libéré du coup l'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonisée et un intermédiaire thiolester lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison de thioester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Lopez, 2008).

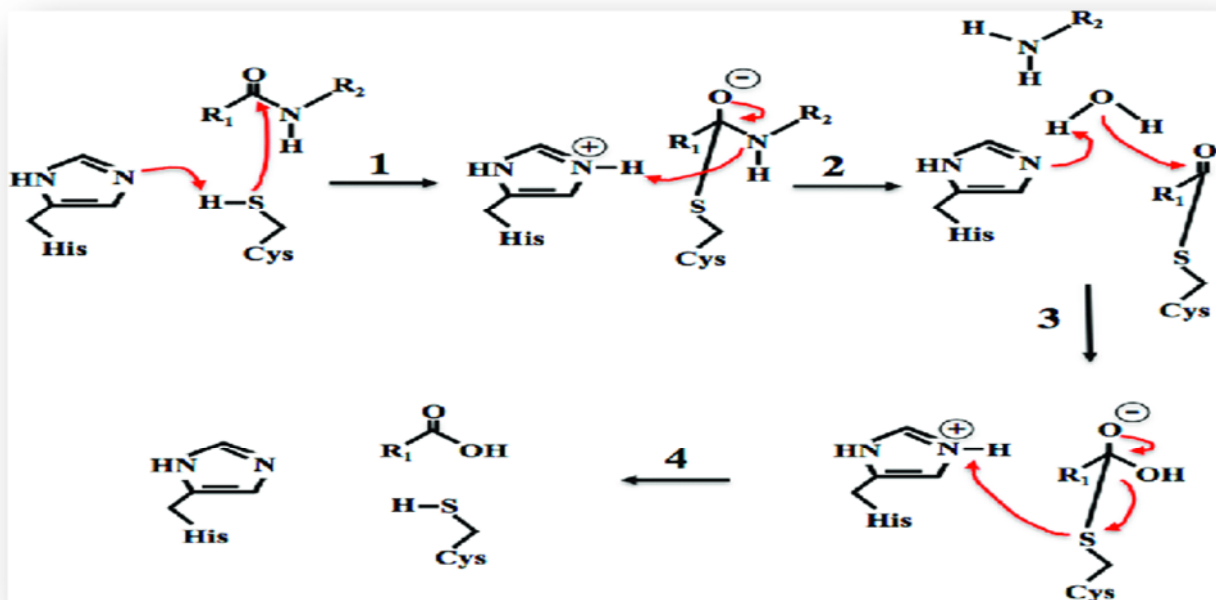


Figure 6 : Mécanisme d'action des protéases à cystéines (Clark, 2016).

II.1.3.3. Les protéases aspartiques

A. Propriétés

Ces protéases sont largement répandues dans les cellules des animaux, des levures et des moisissures, mais on les trouve rarement dans les bactéries. Elles sont communément appelées protéases acides et possèdent des résidus d'acide aspartique sur leur site actif. Elles présentent une spécificité envers les résidus d'acides aminés aromatiques ou volumineux des deux côtés de la liaison peptidique et ont des pH optimal compris entre 3 et 4.

Les protéases aspartiques sont inhibées par la pepstatine. Les protéases aspartiques microbiennes sont encore divisées en deux groupes, produits par les moisissures et les levures : protéases de type pepsine et protéase de type rénine (Chander, 2019).

B. Mécanisme d'action

Leurs mécanismes d'action est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (figure 7). Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliver donnant alors un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Lopez, 2008).

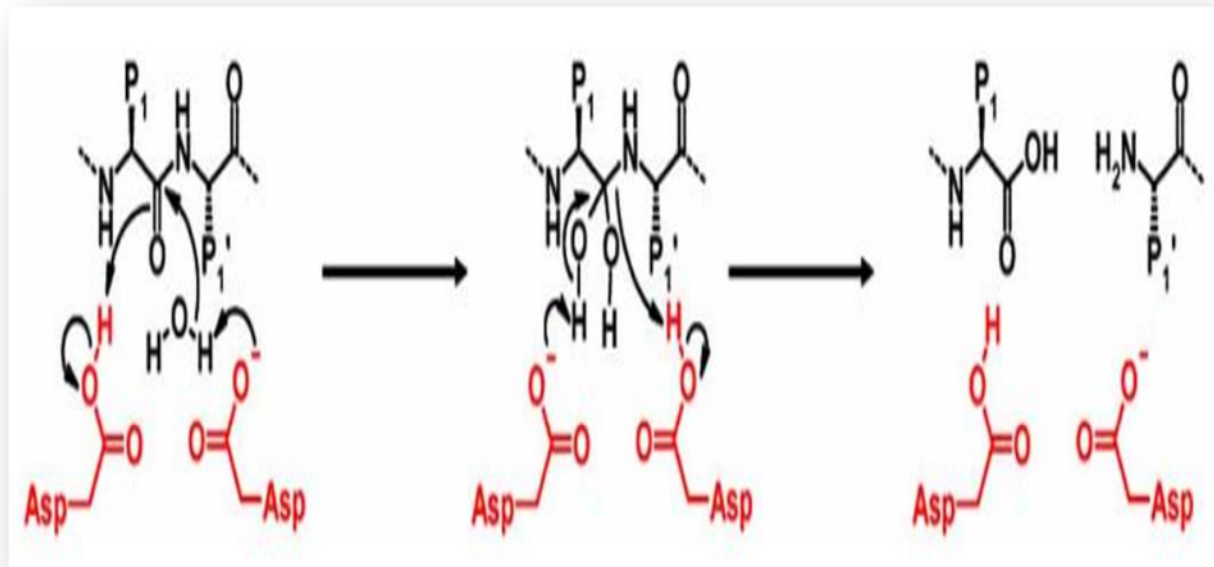


Figure 7 : Mécanisme d'action des protéases à aspartique (Mandujano-González *et al.*, 2016).

II.1.3.4. Métalloprotéases

A. Propriétés

Les métalloprotéases sont les plus diversifiées des types catalytiques de protéases. Elles sont caractérisées par le besoin d'un ion divalent pour leur activité. Ces enzymes sont sensibles aux agents chélateurs mais insensibles aux agents sulfhydriques, les esters de phosphate ont un ion métallique impliqué dans leur mécanisme catalytique. Les protéases neutres et alcalines de nombreuses sources microbiennes appartiennent à ce groupe d'enzymes (Chander, 2019).

B. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des métalloprotéases (figure 8) se fait en trois étapes :

- L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase à sérine). L'histidine active une molécule d'eau. La molécule d'eau à son tour attaque la liaison peptidique.
- Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP3 et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C- terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.
- L'azote N-terminal est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide et comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre les deux groupes (Lopez, 2008).

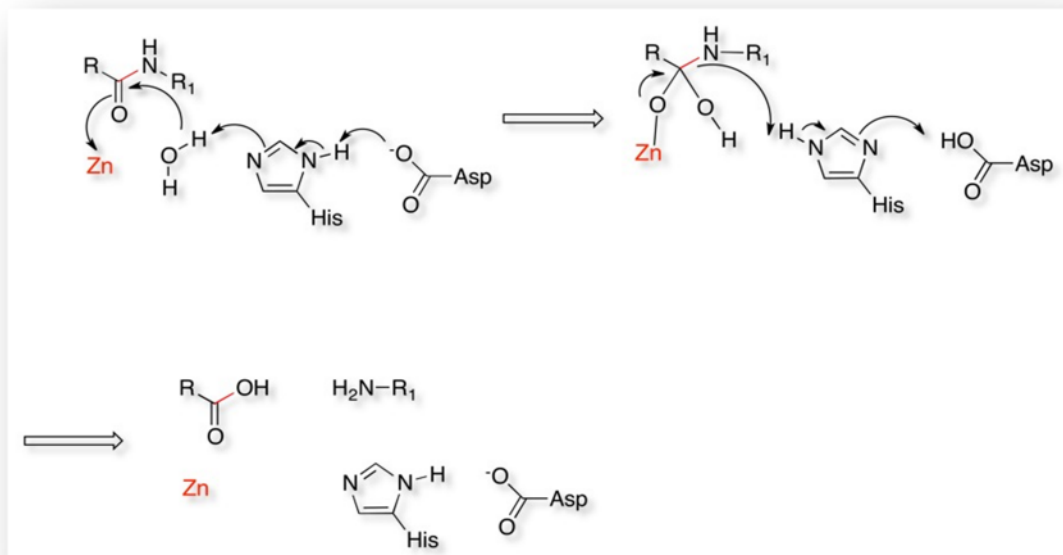


Figure 8 : Mécanisme d'action des métalloprotéases (Chen, 2019).

II.2. Production des protéases microbiennes

La production d'enzymes protéolytiques microbiennes dépend du micro-organisme, de la composition du milieu, des propriétés physico-chimiques et de la méthode de production du microorganisme. On estime qu'environ 30 à 40 % du coût de production des enzymes industrielles peut être attribué au coût du milieu de croissance (Dhillon *et al.*, 2017).

La sélection du micro-organisme est importante pour obtenir le produit souhaité. Le micro-organisme doit être capable de sécréter de grandes quantités d'enzymes protéolytiques et donner des rendements adéquats dans un court laps de temps. La production d'enzymes

protéolytiques est également affectée par les propriétés physico-chimiques telles que le pH, la température, l'humidité et la teneur en eau, la période d'incubation, la taille de l'inoculation et l'aération (Dhillon *et al.*, 2017).

La production de protéases a été largement étudiée par des procédés de fermentation submergée (SmF) ainsi que par des procédés de fermentation à l'état solide (SSF). La fermentation submergée comprend une grande variété de procédés microbiens avec ou sans agitation, où la biomasse est complètement entourée dans le milieu de culture liquide par contre, la SSF suscite beaucoup plus d'intérêt, car il s'agit d'un procédé plus simple et qui peut utiliser des déchets ou des substrats agro-industriels tels que le soja dégraissé, le son de blé, le son de riz, etc. (Sandhya *et al.*, 2005).

II.2.1. Production de protéases par les bactéries (*Bacillus Sp.*)

La production microbienne de protéases alcalines par l'utilisation de *Bacillus subtilis* isolé a été exercée industriellement. *B. subtilis*, qui produit une protéase alcaline extracellulaire, a été isolé à partir de la surface de viande achetée sur les marchés locaux égyptiens (Chander, 2019).

L'activité enzymatique maximale a été obtenue lorsque la bactérie a été cultivée sur de la liqueur de maïs (2 % P/V) au lieu de la farine de soja (2 %), puis sur de l'hydrolysate de caséine (2 % P/V) et 12 % de mélasse de la canne à sucre comme source de carbone, à un pH de 10 et 37°C, pendant une période d'incubation de 24 heures (production maximale d'enzyme à 48 heures).

L'enzyme a un pH optimal d'environ 10 et a maintenu sa stabilité sur une large gamme de pH entre 5 et 12. Sa température optimale est d'environ 37°C, et elle a présenté une stabilité jusqu'à 50°C (Chander, 2019).

II.2.1.1. Matériel et méthodes

A. Entretien des micro-organismes et des cultures

Les bactéries ont été isolées de la surface des échantillons de rencontre, criblées à l'aide d'une gélose nutritive et ensuite dans un bouillon alcalin. Les cultures mères de l'isolat ont été conservées dans du glycérol à 20 % à une température de -70°C. Avant chaque expérience, la bactérie a été subcultivée à partir des stocks congelés sur de la gélose alcaline (pH 10,5) contenant : 10g/l de glucose, 5g/l de peptone, 5g/l de l'extrait de levure, 1g/l de KH_2PO_4 , 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10g/l de Na_2CO_3 , et 15g/l d'agar. Le bouillon alcalin a été utilisé comme milieu de base pour les études préliminaires de la croissance bactérienne et de la production de protéases.

B. Technique de la zone de dégagement de la gélatine

L'activité enzymatique de la protéase a été déterminée par El-Safey et Ammar en 2002 brièvement, selon la technique de la zone de dégagement de la gélatine (GCZ). Dans ce test, de la gélatine soluble (1 % P/V) a été émulsionnée et complétée avec (1,5 % P/V) de Bacto-agar, le pH a été ajusté selon les besoins avec un tampon approprié (par exemple un tampon phosphate à pH 7).

Des tasses ont été préparées (3 tasses optimales) dans chaque plaque. Des quantités égales de 0,1 ml d'enzyme extraite (ou de solution enzymatique) ont été introduites dans chaque coupelle. Les plaques ont été incubées à 35°C pendant 24h. A la fin du temps d'incubation, les plaques ont été inondées avec du chlorure mercurique (HgCl) préparé au préalable dans du HCl. (HgCl, 15g et 20 ml de HCl 6N complétés à 100 ml avec de l'eau distillée), et les diamètres moyens des zones d'éclaircissement enregistrées ont été calculés.

C. Milieu de croissance

Le milieu alcalin (pH 10) utilisé pour la production de protéase contenait

- 6% P/V de glucose,
- 2% P/V de farine de soja,
- 0,04% P/V de CaCl₂,
- 0,02% P/V de MgCl₂,
- 0,09% P/V de NaH₂PO₄,
- 0,62% P/V de Na₂HPO₄.

Après autoclavage et refroidissement du milieu, 10 ml d'une solution d'oligo-éléments contenant 10 g/l de Na₂C₂H₃O₇, 0,1 g/l (NH₄)₂MO₇O₂₄, 2g/l de FeSO₄-7H₂O, 0,2g/l de CuSO₄-5H₂O, et 0,2g/l de ZnCl₂, a été ajouté à un litre (1l) du milieu. Les conditions opératoires ont été maintenues à une température de 37°C et une agitation de 150 tr /min sur l'incubateur à secousses pendant 48 h.

D. Test de protéase

L'activité protéolytique de l'enzyme a été mesurée quantitativement par une méthode modifiée de Joo *et al.*, 2002. La solution de substrat était composée de 1 % de caséine dans un tampon de 0,1M de Tris-HCl à pH 9. Le mélange de dosage était composé de 450 µl de solution de substrat et de 50 µl de solution enzymatique (surnageant de culture) convenablement diluée avec un tampon de 0,1M de Tris-HCl au pH 9.

Le mélange a été incubé à 35°C pendant 10 minutes et la réaction a été terminée par l'ajout de 500 µl d'acide trichloracétique (TCA) à 10 %, suivi d'une centrifugation à 5000×g

pendant 15 minutes pour éliminer le précipité. L'activité protéasique a été déterminée comme la quantité de tyrosine libérée par les surnageants à 275 nm. Une unité d'activité enzymatique a été définie comme la quantité d'enzyme entraînant la libération de 1 µg de tyrosine par min par ml à 37°C dans les conditions de réaction.

E. Différents facteurs affectant la production de protéase par les isolats bactériens

L'étude a été réalisée dans des flacons coniques de 250 ml contenant chacun 25 ml de milieu de croissance. Les flacons ont été inoculés par 0,5 ml d'inoculum préparé et incubés à une température spécifique dans un agitateur rotatif (180 tr/min). A la fin de la période de fermentation, le milieu de culture a été centrifugé pour obtenir le filtrat de culture qui a été utilisé comme source d'enzyme. Dans toutes les expériences, le poids sec de la biomasse, le pH final et la production de protéase ont été contrôlés (Chander, 2019).

II.2.2. Production de protéases par les champignons (*Aspergillus Sp.*)

Les champignons élaborent une plus grande variété d'enzymes que les bactéries ; par exemple, *Aspergillus oryzae* produit des protéases acides, des protéases neutres et alcalines. Les protéases fongiques sont activées dans une large gamme de pH allant de 4 à 11 et présentent une large spécificité de substrat. Cependant, elles ont une vitesse de réaction plus faible et une moins bonne tolérance à la chaleur que les enzymes bactériennes. Les enzymes fongiques peuvent être facilement produites par un processus de fermentation à l'état solide.

Les protéases acides fongiques ont un pH optimal de 4 et 4,5 et sont stables entre pH 2,6 et 6. Les protéases neutres fongiques sont des métalloprotéases qui sont actives à pH 7 et sont inhibées par les agents chélateurs. En raison de leur activité peptidase et leur fonction spécifique d'hydrolyse des liaisons hydrophobes des acides aminés, les protéases neutres fongiques complètent l'action des protéases végétales, animales et bactériennes en réduisant l'amertume des protéines alimentaires par des hydrolysats. Les protéases alcalines fongiques sont également utilisées pour modifier les protéines alimentaires.

Il existe diverses sources de protéases, car elles sont présentes naturellement dans tous les organismes. Les haricots verts sont couramment cultivés en Inde et sont assez riches en protéines et en minéraux. Les farines d' haricots français peuvent donc être modifiées de manière appropriée pour la croissance des espèces fongiques. Leur étude soutient le fait que les haricots français sont un type modéré de substrat de fermentation à l'état solide pour la production de protéases par *Aspergillus Sp.* (Chander, 2019).

II.2.2.1. Matériel et méthodes

A. Collecte des échantillons et isolement d'*Aspergillus Sp.*

Divers légumes et fruits ont été collectés sur le marché, présentant des altérations telles que les téguments et la peau extérieure sont très endommagés. L'échantillon a été examiné au microscope, après les échantillons infectés par des champignons ont été sélectionnés et les prélèvements ont été inoculés sur de la PDA (Potato Dextrose Agar) et cultivés à température ambiante pendant 7 jours.

Les plaques PDA montrant une croissance intense des mycéliums avec des spores brunes à noires profuses ont été sélectionnées et purifiées à plusieurs reprises sur PDA pour obtenir des cultures axéniques (Chander, 2019).

B. Caractérisation et confirmation des isolats

Les cultures fongiques axéniques présentant des spores brunes à noires ont été soumises à un examen microscopique par coloration au bleu de coton lactophénolique. Un montage humide a été préparé sur la lame avec la culture provenant des plaques PDA. Le montage a été coloré avec quelques gouttes de bleu de coton et recouvert d'une lamelle. La morphologie typique d'*Aspergillus* a été observée au microscope.

L'espèce d'*Aspergillus* a été confirmée en la soumettant à la technique standard de culture sur lame. Une couche épaisse de PDA a été déposée sur les lames de manière aseptique, puis elles ont été inoculées avec les isolats fongiques. Les lames ont été placées dans des boîtes de Pétri stériles et incubées à température ambiante pour le développement d'hyphes verticaux puis un examen microscopique des lames a été effectué pour confirmer la présence d'*Aspergillus Sp*(Chander, 2019).

C. Fermentation à l'état solide du haricot et estimation de l'activité protéasique.

Quelques modifications, notamment les graines décortiquées ont été converties en un parasite semi-solide à l'aide d'un broyeur variable, le produit obtenu a été mélangé avec un tampon phosphate et une solution minérale. La protéase a été estimée par le réactif de Folin en utilisant la tyrosine comme standard.

D. Production de protéase sur un milieu de fermentation synthétique à base de farine du haricot

Les cultures axéniques des plaques PDA ont été transférées sur des plaques PDA fraîches et ils ont été permis de former des spores en les incubant à température ambiante. Les spores ont été mises en suspension dans 10ml de tampon mélangé et versées dans des flacons de fermentation contenant du milieu de fermentation synthétique de farine de haricot français. Les flacons ont été cultivés à température ambiante dans des conditions statiques pendant une période prolongée de 360 heures.

L'échantillon a été prélevé par intermittence dans une aliquote de 10ml et centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes. Le surnageant a été recueilli et considéré comme une enzyme brute ; il sera également dilué de manière appropriée et appelé enzyme diluée. La quantité d'activité enzymatique a été déterminée selon la procédure décrite dans la méthodologie (Chander, 2019).

E. Production de protéase par un milieu de fermentation synthétique modifié

Les conditions du milieu de fermentation ont été modifiées par l'ajout de chlorure de sodium comme décrit dans la méthodologie. L'isolat d'*Aspergillus* a été cultivé sur PDA comme décrit précédemment et 10 ml de suspension de spores ont été inoculés dans le milieu de fermentation synthétique modifié. Les flacons ont été incubés à température ambiante pendant 72 heures. La matière fermentée a été centrifugée, comme décrit précédemment, et le surnageant a été utilisé pour l'estimation des enzymes (Chander, 2019).

II.2.3. Production de protéases par la levure (*Rhodotorula mucilaginosa*)

La majorité des levures produisent des aspartyl-protéases acides, tandis que quelques-unes produisent des sérine-peptidases ou des protéases neutres et alcalines. Les protéases fongiques sont principalement de nature acide et sont donc préférées dans les industries alimentaires et pharmaceutiques mais la production industrielle de protéases de levure n'a pas été exploitée dans une large mesure (Chaud *et al.*, 2016).

La souche de levure, précédemment isolée d'une algue marine est identifiée taxonomiquement comme *Rhodotorula mucilaginosa* sur la base du gène de l'ADNr 26S. La souche a été déposée dans la collection brésilienne de microorganismes environnementaux et industriels sous le numéro d'accès CBMAI 1528. La levure a été maintenue sur de la gélose Sabouraud dextrose à 15°C dans le laboratoire (Lario *et al.*, 2015).

II.2.3.1. Matériel et méthodes

A. La culture

L'inoculum a été préparé à partir de cellules cultivées pendant 24 heures sur Sabouraud glucose agar contenant : 17g/l d'agar, 20g/l du glucose et 10g/l de la peptone à 25°C (température optimale de croissance pour *R. mucilaginosa* L7). Les cellules fraîchement cultivées ont été transférées dans un erlenmeyer de 1000 ml contenant 400 ml de bouillon de glucose Sabouraud (20g/l du glucose et 10g/l de la peptone) à pH 5,5, et incubées à 25°C dans un agitateur rotatif à 150 tr/min. Après 24h de culture, les cellules de levure ont été récoltées par centrifugation à 2000 g pendant 15mn.

B. Conditions de croissance

Les cellules ont été lavées deux fois et remises en suspension dans de l'eau stérile. L'inoculum standardisé de 1.10^8 ml de cellules a été transféré dans des flacons Erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de milieu de culture et incubé pendant 120 h sous agitation à 150 tr/min. Des aliquotes ont été prélevés toutes les 24 h, et le bouillon a été centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes pour éliminer les cellules. Les surnageants ont été utilisés pour déterminer la concentration en protéines, l'activité protéasique, le pH et la teneur en sucre en fonction de temps (Chaud *et al.*, 2016).

II.3. Techniques de purifications des protéases

Après la production d'enzymes, la purification de ces enzymes est un processus très complexe. Un certain nombre de méthodes sont en ligne pour leur purification (figure 9). Plusieurs techniques sont appliquées pour la récupération d'enzymes de produits à valeur ajoutée. Le choix de la technique dépend de la source de l'enzyme, qu'elle soit extracellulaire ou intracellulaire. Au cours de la production et la purification d'enzymes, la considération fondamentale est de produire des produits finis rentables et de grande valeur en utilisant des techniques économiques.

Habituellement, la méthode de précipitation est utilisée pour récupérer les protéines à partir d'un mélange biologique brut. Différents réactifs, tels que des sels et des solvants organiques, sont utilisés. La pratique la plus courante est l'utilisation du sulfate d'ammonium pour la précipitation des protéines (Razzaq *et al.*, 2019).

II.3.1. Chromatographie par filtration sur gel

C'est une méthode très courante de purification des enzymes. Plusieurs types de gels ont été utilisés pour le remplissage des colonnes comme le Sephadex (G-25, G-50, G-75, G-100, G-200), Sepharose, Sephacryl, etc. Le choix du matériau de garnissage dépend du poids moléculaire de l'enzyme. Par exemple, les enzymes de faible poids moléculaire (10-80 kDa) nécessitent le Sephadex G-25 à G-75. Alors que les enzymes ayant une masse plus élevée nécessitent G-100 à G-300. Le remplissage de la colonne est très important pour une purification. La présence de bulles dans la colonne entrave le débit et donc, avant le remplissage, le gel doit être correctement dégazé (Banerjee et Ray, 2017).

II.3.2. Chromatographie d'affinité

C'est une méthode très populaire pour la purification des enzymes et des protéines. Plusieurs types de matrices sont utilisés en fonction de la nature des molécules. Les matrices les plus courantes pour les enzymes neutres bactériennes sont le Sephadex-4-

phénylbutylamine. Les autres matrices disponibles sont l'agarose de caséine, le N-benzoyloxycarbonyl, la lectine, etc. Les principaux inconvénients de la chromatographie d'affinité sont le coût élevé de la purification et la nature labile de certains ligands (Razzaq *et al.*, 2019).

II.3.3. Chromatographie échangeuses d'ions

En chromatographie échangeuses d'ions, la séparation ou la purification des enzymes dépendent de la nature ionique (positive ou négative). Deux types de billes sont généralement utilisés, DEAE-sephadex/cellulose (anion) et CM-Sephadex/cellulose (cation). La plupart du temps, les enzymes microbiennes sont chargées positivement et nécessitent un échangeur d'anions. L'élution des molécules liées est effectuée en augmentant la concentration de sel (généralement NaCl et CaCl₂) ou un gradient de pH (Banerjee et Ray, 2017).

II.3.4. Chromatographie à système biphasé aqueux

La protéase alcaline microbienne peut être purifiée en utilisant une combinaison de deux mélanges tels que le polyéthylène glycol (PEG) et le dextran ou le PEG et différents types de sels. Cette méthode présente plusieurs avantages : elle offre des conditions douces pour les macromolécules biologiques, une concentration plus élevée, une durée plus courte et un bon rapport coût-efficacité (Razzaq *et al.*, 2019).

II.3.4. Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) et la chromatographie liquide à basse performance (LPLC) sont des techniques sophistiquées de purification des protéines. La HPLC diffère de la LPLC en termes de pression. Ces deux techniques sont utiles pour la purification de protéines de qualité moléculaire. Selon le but recherché, la HPLC peut être divisée en trois catégories en trois catégories : analytique, semi-préparative et préparative.

II.3.5. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

Il s'agit de l'un des instruments de chromatographie les plus populaires, généralement utilisé pour purifier les protéines et les enzymes. Comme la chromatographie liquide, elle contient également une phase mobile ou un tampon (tampon phosphate et tampon citrate) et une phase stationnaire qui contient une résine. Le débit du tampon est contrôlé par une pompe volumétrique. Le choix de la colonne est important dans la chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) et peut être varié (exclusion de taille, hydrophobie, échange d'ions, phase inverse, etc.) en fonction de la nature des molécules à séparer (Banerjee et Ray, 2017).

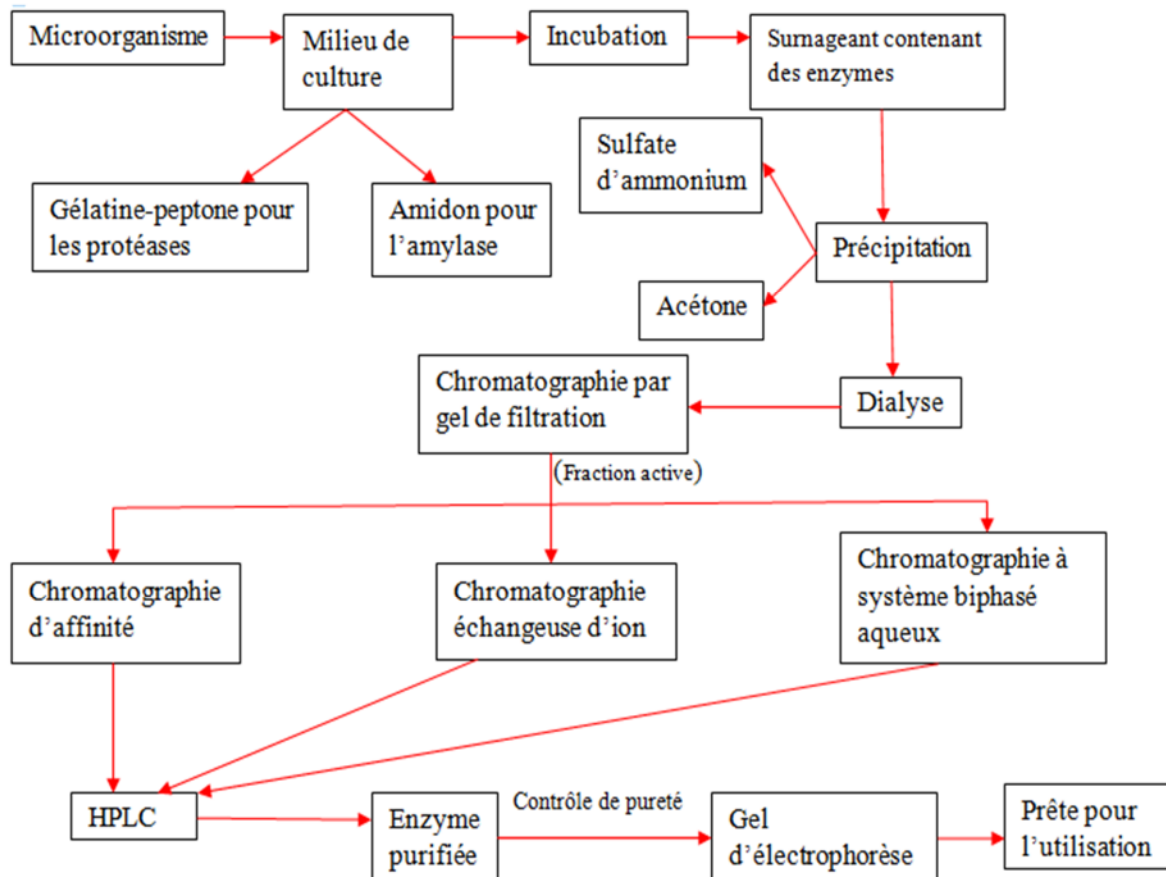


Figure 9 : Diagramme montrant la procédure générale de purification des protéases microbiennes et de l'amylase (Banerjee et Ray, 2017).

II.4. L'ingénierie des protéases

L'ingénierie des protéases est une étape importante qui conduit au développement de nouveaux outils pour des applications thérapeutiques et biotechnologiques. En général, l'activité et la stabilité de toute enzyme, y compris les protéases, dépendent de la composition en acides aminés et de leur position respective. L'ingénierie des protéines modifie la structure de la protéase de manière à améliorer l'activité, la spécificité et la stabilité des protéases.

L'ingénierie des protéases à des fins industrielles diverses a fait l'objet de nombreuses recherches. Actuellement, deux méthodes différentes sont utilisées pour fabriquer des protéases modifiées : l'évolution dirigée et la conception aléatoire.

La stabilité thermique de la protéase a de l'importance et peut être augmentée en utilisant différentes stratégies d'ingénierie telles que la formation de liaisons disulfure, la modification des acides aminés du substrat, la modification du site de liaison aux métaux et la comparaison de l'homologie de la séquence avec d'autres enzymes produites par des mésophiles et des thermophiles. De même, la stabilité au pH (ingénierie des charges de

surface) et l'activité dans un environnement de solvant organique (ingénierie des liaisons disulfure) des protéases ont également été étudiées.

Cummings, Murata, Koepsel et Russell en 2014 ont utilisé l'ingénierie des protéines à base de polymères à double bloc pour améliorer le pH et la stabilité thermique de la protéase. Les besoins en biocatalyseurs varient considérablement (en termes de stabilité et d'activité à différentes températures et à différents pH) d'une industrie à une autre et l'ingénierie des protéines est le moyen de le rendre possible (Banerjee et Ray, 2017).

II.5. Génie génétique des protéases microbiennes

Le clonage de gènes est une technologie qui progresse rapidement et qui a contribué à améliorer notre compréhension de la relation structure-fonction des systèmes génétiques. Il fournit une excellente méthode pour la manipulation et le contrôle des gènes. Plus de 50 % des enzymes importantes pour l'industrie sont maintenant produites à partir de micro-organismes génétiquement modifiés. Plusieurs rapports ont été publiés sur l'isolement et la manipulation des gènes de protéase microbienne dans le but de :

- Surproduire des enzymes par effet de dosage,
- Etudier la structure primaire de la protéine et son rôle dans la pathogénicité du micro-organisme sécréteur,
- Localiser les résidus du site actif pour la modification des propriétés de l'enzyme en fonction de ses applications commerciales par l'ingénierie des protéases.

Les gènes de protéase des bactéries, des champignons et des virus ont été clonés et séquencés.

II.5.1. Bactérie (*Pseudomonas aeruginosa*)

Le *Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène et peut provoquer des infections mortelles chez des hôtes fragilisés. Cette virulence est liée à la sécrétion de plusieurs protéines extracellulaires. *P. aeruginosa* sécrète deux protéases, une protéase alcaline et une élastase.

Les gènes de la protéase alcaline (apr) de *P. aeruginosa* IFO 3455 et PAO1 ont été clonés dans *E. coli*. Le fragment de l'ADN (8.8 kb) codant pour la protéase alcaline de la souche PAO1 a été exprimé dans *E. coli* sous le contrôle d'un promoteur Tac. L'enzyme active a été trouvée synthétisée et sécrétée dans le milieu en absence de lyse cellulaire.

La protéase Las A (dégradation de l'élastine) de *P. aeruginosa* contribue également à la pathogénie de cette bactérie. Cette enzyme présente un niveau élevé d'activité staphylolytique. Le gène Las A de la souche FRD1 a été surexprimé dans *E. coli*. Il code pour un précurseur,

prepro-Las A, d'environ 45kDa. L'analyse de la séquence N-terminale a permis d'identifier un peptide signal de 31 aa. Pro-Las A (42 kDa) ne subit pas de traitement autoprotéolytique et possède une faible activité anti-staphylococcique (Tableau III) (Rao *et al.*, 1998).

Tableau III : Nouveaux micro-organismes producteurs de protéases aux propriétés intéressantes (Drouin, 2005).

Souches bactériennes	Caractéristiques de la protéase
<i>Nocardopsis Sp.</i>	Protéase très stable en présence de surfactants et d'agents blanchissants
<i>Bacillus Sp.</i>	Protéase hautement thermostable avec pic d'activité à 90°C
<i>Bacillus horikoshii</i>	Nouvelle protéase alcaline
<i>Bacillus Sp.</i>	Protéase très stable en présence d'agents blanchissants
<i>Bacillus brevis</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable
<i>Bacillus sphaericus</i>	Nouvelle protéase stable en présence de chlore
<i>Bacillus licheniformis</i>	Nouvelle souche qui produit des kératinases
<i>Bacillus staerothermophilus</i>	Nouvelle protéase alcaline thermostable
<i>Bacillus mojavensis</i>	Protéase alcaline stable en présence d'agents blanchissants
<i>Bacillus subtilis K2</i>	Capacité du micro-organisme à croître dans des effluents de tannerie et protéase efficace pour le traitement de peaux
<i>Tetrahymena thermophila</i>	Protozoaire produisant des protéases extracellulaires
<i>Bacillus clausii</i>	Micro-organismes capable de croître dans des conditions hautement alcalines

II.5.2. Champignon (*Tritirachium album* Limber)

La protéinase K est une endoprotéinase à sérine excrétée par le champignon *Tritirachium album* Limber. L'enzyme est capable d'hydrolyser rapidement les protéines natives et est active en présence de détergents (urée, dodécylsulfate de sodium, etc.), ce qui fait de la protéinase K l'un des outils les plus utiles en biologie moléculaire. L'enzyme présente une forte similitude avec les subtilisines bactériennes. L'ADN génomique ainsi que l'ADNc codant pour la protéinase K de *T. album* Limber ont été clonés dans *E. coli*, et la séquence nucléotidique complète de la région codante y compris les régions flanquantes 59 et 39, a été déterminée.

L'analyse de la séquence nucléotidique a révélé que le produit sécrété primaire est un zymogène contenant une séquence signal de 15 aa et un pro-peptide de 90 aa. Le pro-peptide est vraisemblablement éliminé dans les étapes ultérieures du processus de sécrétion ou lors de la sécrétion dans le milieu.

Il a été démontré que le gène de la protéinase K est composé de deux exons et d'un intron de 63 pb situé dans la région pro. Le gène de la pro-protéinase K a été exprimé dans *E. coli* sous le contrôle du promoteur Tac. La séquence codante de la protéinase T de *T. album* Limber a été montrée comme étant interrompue par deux introns. La séquence d'acides aminés déduite a montré 53% d'identité à celle de la protéinase K.

La présence de quatre cystéines dans la protéinase mature, probablement sous la forme de deux liaisons disulfures, explique la stabilité thermique de la protéinase T. L'ADNc de la protéinase T a été exprimée dans *E. coli*, et l'authenticité du produit a été confirmée par Western blotting et analyse N-terminale du produit recombinant (Rao *et al.*, 1998).

II.5.3. Levures (*Saccharomyces cerevisiae*)

La carboxypeptidase de levure (CPY) est une protéase vacuolaire de levure glycosylée qui est utilisée commercialement dans la synthèse des peptides. La CPY est codée par le gène PRC1. Pour augmenter la production de CPY chez *S. cerevisiae*, PRC1 a été placé sous le

contrôle du promoteur GAL1 de la levure, qui est fortement régulé sur des plasmides multicopies et introduit dans des souches mutantes *npl1*.

Une augmentation d'environ 200 fois du niveau de CPY sécrétée (40 mg/l) a été obtenue par rapport au niveau dans un mutant *npl1* portant une seule copie du gène PRC1 de type sauvage. L'électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium et de polyacrylamide a révélé deux formes de CPY actif sécrété, probablement en raison des différents niveaux de glycosylation.

Le gène structural PRB1, codant pour la protéase vacuolaire B de *S. cerevisiae*, a été cloné par complémentarité de la mutation *prb1-1122*. PRG1, un gène de levure codant pour le protéasome de 32 kDa, qui présente une homologie de séquence de 55,6 % avec 80 % du produit du gène RING10 (protéasome humain), a été identifié. La disruption génomique de PRG1 a révélé qu'il est essentiel à la croissance de la levure (Rao *et al.*, 1998).

II.5.4. Virus (*Picornavirus*)

Le clonage de gènes de protéases virales a été entrepris pour l'isolement et la surexpression du gène, puis le criblage de composés inhibiteurs qui peuvent être utilisés dans le développement d'agents chimiothérapeutiques. La protéase virale est responsable de la transformation des précurseurs de la polyprotéine en protéines structurales du virion mature. Parmi les virus, les rapports sur le clonage des gènes de protéase se limitent principalement aux virus animaux (Rao *et al.*, 1998).

Le rhinovirus humain est un membre de la famille des picornavirus (petits ARN). Le rhinovirus a une importance commerciale puisqu'il est l'agent responsable d'environ 15 % des cas de rhume. Un ADNc codant pour la protéase virale provenant de la région 3C du rhinovirus humain de type 14 a été exprimé dans *E. coli* à l'aide d'un vecteur de sécrétion périplasmique (Binford *et al.*, 2007).

Chapitre III

Intérêts

biotechnologiques

III.1. Applications des protéases dans différentes industries

Depuis l'avènement de l'enzymologie, les protéases protéolytiques microbiennes sont les enzymes les plus étudiées. Les protéases d'origine microbienne sont considérées comme les enzymes hydrolytiques les plus importantes (Razzaq *et al.*, 2019). Pour répondre à la demande sans cesse croissante de protéases pour diverses applications, les microorganismes sont préférés aux sources végétales et animales pour la production de protéases en raison de leur grande spécificité de substrat et de leur facilité de manipulation génétique. Les protéases issues de microorganismes constituent le plus grand groupe d'enzymes industrielles et représentent plus de 60% du total des ventes mondiales d'enzymes (Singh *et al.*, 2016).

Les enzymes microbiennes, en particulier les protéases, jouent un rôle important dans des secteurs industriels tels que la papeterie, le traitement de cuir, la préparation de détergents liquides, l'industrie alimentaire et le secteur médical (Banerjee et Ray, 2017). En outre, elles sont également impliquées dans la gestion des déchets d'activités domestiques et industrielles (Singh *et al.*, 2016).

Tableau IV: Applications des protéases dans différentes industries (Singh *et al.*, 2016).

Industrie	Applications
Food	Amélioration de la digestibilité, de la solubilité, de la saveur, de la palatabilité et des propriétés viscoélastiques ; amélioration de la récupération de l'huile dans les fruits de mer, attendrissement de la viande, réduction de l'allergénicité.
Détergents	Amélioration du lavage
Synthèse des peptides	Synthèse peptidique, enantiosélective
Textile	Dégommage, développement de la texture
Cuir	Traitement du cuir : déshuilage, battillage, tannage
Bioremédiation	Traitements des déchets
Produits Pharmaceutiques	Agents anticancéreux, anti-inflammatoires, thrombolytiques
Autres	Récupération de l'argent, dégomme de la soie

III.1.1. Industries des détergents

Les protéases ont été largement utilisées à l'échelle commerciale dans l'industrie des détergents. Les différents produits de l'industrie des détergents contenant des protéases comme composant ou ingrédient essentiel ont été utilisés pour le nettoyage du linge domestique, des prothèses dentaires ou des lentilles de contact. Sur le total des ventes

d'enzymes, l'utilisation des protéases dans l'industrie des détergents représente 20%. En 1913, la toute première préparation pancréatique a été conçue et elle était composée d'un extrait pancréatique brut et de carbonate de sodium. Cette préparation enzymatique a été commercialisée pour la première fois en 1956 sous le nom de BIO-40 (Razzaq *et al.*, 2019).

L'alcalase dont le nom commercial est BIOTEX produite par *B. licheniformis* a été introduite sur le marché par l'industrie Novo A/S en 1960. La protéase produite par *B. cereus* BM1 a été signalée comme un bon ingrédient de détergent et montre une activité stable dans une solution de 10% de détergent commercial, ce qui suggère sa consommation commerciale. Les performances clés des protéases dans les détergents sont leur PI (Point Isoélectrique).

Le PI du détergent pour les protéases les plus performantes doivent coïncider, ce qui favorise l'application des enzymes dans le détergent. Les protéases de *Bacillus Sp alcalophiles* ont un point isoélectrique (PI) très élevé et peuvent donc résister à des plages de pH plus élevées. Les lipases, l'amylase et la cellulase, lorsqu'elles sont combinées ensemble, devraient augmenter l'efficacité de la production des protéases dans les détergents (Mienda *et al.*, 2014).

Le point isoélectrique est important pour la sélection des protéases pour la préparation des détergents. Les protéases présentent des résultats remarquables lorsque le pH et les points PI de ces enzymes sont approximativement concomitants. Il existe quelques autres paramètres tels que la compatibilité avec les tensioactifs, les agents de blanchissement et les parfums. Une bonne activité, le pH optimal et la température, la force ionique, la stabilité et le potentiel d'élimination de la tache, qui ont également été pris en compte pour le choix des protéases détergentes.

Traditionnellement, les détergents fonctionnent à température élevée, mais l'intérêt s'est accru pour rechercher et d'identifier des protéases alcalines travaillant dans une large gamme de température. En général, en présence d'un agent de blanchiment ou d'oxydation, les protéases disponibles dans le commerce ne sont pas stables. Récemment, la technologie de l'ADNr a été incorporée pour produire des protéases détergentes issues de la bio-ingénierie, plus stables, plus efficaces et une meilleure durée de conservation (Razzaq *et al.*, 2019).

Les protéases ont été utilisées non seulement comme détergents pour le linge, mais aussi pour le lavage de la vaisselle et le nettoyage dans les secteurs institutionnels et industriels. Toutes les protéases détergentes qui sont actuellement utilisées sur le marché sont des protéases à sérine produites par la souche *Bacillus*. L'avantage des protéases alcalines fongiques sur leurs homologues bactériennes est la facilité du traitement en aval pour préparer

une enzyme exempte de microbes. *Conidiobolus coronatus* produit une protéase alcaline qui est compatible avec les détergents commerciaux utilisés en Inde et a conservé 43% de son activité à 50°C pendant 50 min en présence de Ca²⁺ (25 mM) et de glycine (1M) (Mienda *et al.*, 2014).

III.1.2. Industries de Cuir

Le trempage, l'épilage des cuirs et des peaux et le battage sont traditionnellement effectués à l'aide de différents produits chimiques, ce qui représente un risque élevé de pollution des déchets de tannerie. Par conséquent, les protéases dont le pH optimal se situe autour de 9-10 sont largement utilisées dans le trempage pour faciliter l'absorption d'eau par la peau ou le cuir

Les protéases alcalines à activité élastolytique et kératinolytique sont utilisées pour les processus de déhousseage et de battage afin d'obtenir le grain souhaité, la souplesse et l'étanchéité du cuir en peu de temps. Les protéases alcalines avec une activité kératinolytique ont été signalées pour leurs remarquables propriétés de déhousseage.

Une nouvelle protéase présentant une activité kératinolytique à partir de *B. subtilis* a été étudiée comme un potentiel pour remplacer le sulfure de sodium dans le processus de déhousseage de l'industrie du cuir (Chander, 2019).

III.1.3. Industries pharmaceutiques

La grande diversité et la spécificité des protéases sont mises à profit pour développer des agents thérapeutiques efficaces. L'administration orale de protéases d'*Aspergillus oryzae* (Luizym et Nortase) a été utilisée comme aide digestive pour corriger certains syndromes de déficience enzymatique lytique. La collagénase clostridiale ou subtilisine est utilisée en combinaison avec des antibiotiques à large spectre dans le traitement des brûlures et des plaies. L'asparginase isolée d'*E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine de la circulation sanguine dans les différentes formes de cancer. La circulation sanguine dans les différentes formes de leucémie lymphocytaire. Une protéase alcaline provenant de *Conidiobolus coronatus* s'est avérée capable de remplacer la trypsine dans les cultures de cellules animales (Rao *et al.*, 1998).

III.1.4. Synthèse des protéines

La synthèse des peptides par des méthodes chimiques présente des inconvénients, tels qu'un faible rendement, les problèmes de racémisation et les préoccupations de

l'environnement en raison de la nature toxique des solvants et des réactifs utilisés dans les procédés, alors que la synthèse peptidique à médiation enzymatique offre plusieurs avantages comme énantiosélectivité, absence de racémisation, des conditions de réaction respectueuses de l'environnement, etc.

La synthèse enzymatique des peptides a attiré beaucoup d'attention ces dernières années. Les protéases d'origine bactérienne, fongique, végétale et animale ont été appliquées avec succès à la synthèse de plusieurs petits peptides, principalement des dipeptides et des tripeptides. Les liaisons peptidiques peuvent être synthétisées en utilisant des protéases, soit d'une manière contrôlée thermodynamiquement, soit d'une manière cinétiquement contrôlée.

Les protéases d'origine microbienne ont été utilisées de manière satisfaisante pour la synthèse de liaisons ainsi que l'hydrolyse de liaisons peptidiques. Ces protéases ont également établi leur potentiel pour la synthèse de peptides dans un système d'eau minimal. Les petits peptides tels que les di ou tripeptides synthétisés par des processus enzymatiques sont utilisés pour la nutrition et dans les produits pharmaceutiques (Singh *et al.*, 2016).

III.1.5. Industries alimentaires

Les protéases sont utilisées dans l'industrie alimentaire pour une large gamme d'applications. Ces enzymes sont efficacement impliquées dans la modification des propriétés des protéines alimentaires pour améliorer la valeur nutritionnelle, la solubilité, la digestibilité, le goût, la palatabilité et la réduction des composés allergènes (Singh *et al.*, 2016).

Les protéases alcalines sont largement utilisées pour la production d'hydrolysats de protéines depuis plus de 40 ans. Les hydrolysats peuvent être utilisés comme additifs aux denrées alimentaires et aux aliments composés pour animaux afin d'améliorer leur valeur nutritionnelle. En médecine, ils sont administrés aux patients souffrant de troubles digestifs et d'allergies alimentaires (Chander, 2019). Les hydrolysats de protéines peuvent être obtenus à partir de divers substrats tels que le lactosérum, la viande, le soja et la caséine (Chander, 2019).

Dans l'industrie laitière, les protéases sont principalement utilisées dans la fabrication du fromage pour hydrolyser des liaisons peptides spécifiques pour produire de la caséine et des macropeptides. La capacité des protéases à hydrolyser les tissus conjonctifs et les protéines des fibres musculaires est utilisée pour attendrir la viande. Les protéases alcalines jouent un rôle important dans la production de la sauce soja et d'autres produits à base de soja.

Dans l'industrie de la boulangerie, elles sont ajoutées pour assurer l'uniformité de la pâte, réduire la consistance de la pâte, maintenir la force du gluten dans le pain et améliorer la saveur et la texture du pain. Ces enzymes hydrolytiques sont utilisées pour dégrader le complexe de turbidité résultant des protéines dans les jus de fruits et les liqueurs à base d'alcool, dans la gélatine, l'hydrolyse et la récupération des protéines de la viande (Singh *et al.*, 2016).

III.1.6. Biorémediation

L'utilisation de produits chimiques dans les industries est préjudiciable à l'environnement. Cette utilisation dangereuse de produits chimiques appelle une solution alternative et écologique pour le traitement et la gestion des déchets. Les plumes de volaille contiennent une structure kératinique très rigide, représentent 5 % du poids du corps et constituent une riche source de protéines pour l'alimentation humaine et animale (Chander, 2019).

Les déchets de volaille peuvent être dégradés en aliments pour animaux et en denrées alimentaires par le processus kératinolytique (Chander, 2019). Pour l'épilation et le nettoyage des poils des canalisations et des tuyaux bouchés, une formulation contenant des enzymes hydrolytiques isolées de *B.subtilis*, de *B. amyloliquefaciens* et de *Streptomyces Sp.* préparée et brevetée sous le nom de Genex (Razzaq *et al.*, 2019).

III.1.7. Industries médicales

Dans le monde entier, l'application des protéases dans le secteur médical est acceptée. Les protéases provenant de sources microbiennes ont été détectées comme étant efficaces dans le traitement de diverses maladies comme les tumeurs, les inflammations, le cancer, etc. *A. oryzae* est un important isolat de champignon qui produit une nouvelle protéase qui est utile dans le traitement de certains syndromes de déficience enzymatique.

Les protéases sont considérées à part l'activité catalytique comme étant des agents importants dans plusieurs domaines biochimiques et physiologiques telles que la signalisation cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire, l'adhésion cellulaire et les métastases. Les recherches ont montrées que l'inactivation de ces protéases à l'aide d'un inhibiteur de protéase microbien pourrait être une voie alternative dans le développement de médicaments anticancéreux.

Il a été rapporté que la collagénase clostridiale ou la subtilisine ont été utilisées de manière aléatoire dans la préparation de plusieurs antibiotiques, tandis que l'asparginase, une

protéase qui élimine l'asparagine, produite par *E. coli* est efficace dans le traitement de la leucémie lymphocytaire.

Les protéases jouent également le rôle d'agent anti-inflammatoire. La bactérie *Serratia Sp.* a produit une protéase spéciale appelée serratiopeptidase, qui est capable de réduire l'inflammation rapidement. Il a été déclaré que les bactéries génétiquement modifiées sont très efficaces dans différents types de thérapies contre le cancer, y compris l'inhibition ciblée de la signalisation cellulaire par une protéase bactérienne, comme la production de streptokinase (Banerjee et Ray, 2017).

III.1.8. Industries photographiques

L'argent est l'un des métaux précieux et nobles utilisés en grande quantité à de nombreuses fins, notamment dans l'industrie photographique. Les déchets de films radiographiques/photographiques contenant de l'argent métallique noir étalé dans de la gélatine sont une très bonne source de récupération de l'argent par rapport aux autres types de films.

Les différentes méthodes traditionnelles de récupération de l'argent sont : la combustion directe des films, l'oxydation de l'argent métallique après électrolyse, le décapage de la couche de gélatine-argent avec utilisation de différentes solutions chimiques. Mais cette méthode présente de graves inconvénients pour l'environnement (Chander, 2019).

Les protéases alcalines produites par *B. subtilis*, *Streptomyces avermectinus*, et *Conidiobolus coronatus* ont été rapportées avec succès pour récupérer l'argent des films radiographiques, ce qui garantit que ce procédé est plus écologique que l'utilisation de produits chimiques.

La récupération de l'argent par l'utilisation efficace d'une protéase alcaline mutante thermostable produite par *Bacillus Sp.*B21-2 a également été rapportée pour son potentiel (Razzaq et al., 2019).

III.1.9. Autres applications

Les protéases provenant de source biologique ont été utilisées de manière aléatoire à des fins de recherche comme la protéase alcaline produite par *C. coronatus* qui remplace la trypsine dans les cultures de cellules animales (Banerjee et Ray, 2017).

Outre leurs applications industrielles et médicinales, les protéases jouent un rôle important dans la recherche fondamentale. Elles sont également utilisées pour le clivage de la liaison peptidique afin d'élucider le lien entre la structure et la fonction des peptides et des protéines. Les protéases alcalines isolées de *Vibrio metschnikovii* RH530 peuvent être utilisées comme alternative à la protéinase K dans l'isolation de l'ADN (Razzaq *et al.*, 2019).

III.2. Amélioration des rendements

Le frein majeur à l'application des protéases dans les industries est le coût de la production d'enzyme. Les rendements des protéases ont été améliorées par la projection des souches hyperproductives et/ ou l'optimisation du milieu de fermentation. La souche par mutagenèse conventionnelle ou par la technologie de l'ADN recombinant ont été utiles pour améliorer la production de protéases. L'augmentation du rendement des protéases virales est particulièrement importante pour le développement d'agents thérapeutiques contre des maladies dévastatrices comme la malaria, le cancer et le SIDA. Bien que les microbes soient abordés par des méthodes conventionnelles et nouvelles de manipulation génétique, il n'existe pas de solutions entièrement satisfaisantes et beaucoup de ces problèmes restent sans réponse (Rao *et al.*, 1998).

Conclusion

En raison du progrès de la biotechnologie et de l'industrialisation massive, il y a une augmentation rapide de la demande d'enzymes. Les enzymes protéolytiques microbiennes sont les plus étudiées depuis l'avènement de l'enzymologie. Ces dernières ont suscité de l'intérêt non seulement en raison de leur rôle vital dans les activités métaboliques mais aussi en raison de leur immense potentiel d'innovation.

Dans ce travail, nous avons décrit les différentes sources des protéases microbiennes tout en expliquant leurs processus de production, de purification et résumé leur importance dans divers secteurs (textiles, pharmaceutiques, cuir, aliments, détergents,...). La production de protéases à partir de différents groupes tels que les animaux, les végétaux, et les micro-organismes a été établie, mais les gens sont le plus intéressés par les protéases d'origine microbiennes à cause de leur production plus élevée par fermentation, la disponibilité, la diversité, la stabilité, le coût inférieur et la facilité de la manipulation génétique pour générer de nouvelles enzymes avec propriétés souhaitables.

Bien que la production de ces enzymes ait été améliorée de manière significative par utilisation de souches de champignons et de bactéries hyper-productrices, des efforts sont encore déployés pour trouver de nouvelles enzymes, de meilleures méthodes de production et de nouvelles applications de ces enzymes dans des domaines inexplorés.

*Références
bibliographiques*

- Adrio, J.L., Demain, A.L. 2014.** Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. *Biomolecules*, **4**, 117-139.
- Al-Manhel, A.J.A. 2018.** Application of microbial enzymes in dairy products: A review. *Basrah Journal of Agriculture Sciences*, **31**(1), 20-30.
- Alnahdi, S. 2012.** Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus sp.* *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **2** (9), 71-74.
- Banerjee, G., Ray, A.K. 2017.** Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*.
- Barry, I. 1997.** Les protéases multifonctionnelles de la famille des insulinasés. *Biochimie métabolisme signale médecine/sciences*, **13**(4), 601-609.
- Benedykt, W., Katarzyana, P. 2008.** Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **13**, 212-229.
- Bhunja, B., Basak, B., Chakraborty, S., Dey A. 2014.** A review on application of microbial protease in bioremediation. *Industrial & Environmental Biotechnology*, Chapter 14.
- Binford, S.L., Weady, P.T., Maldonado, F., Brothers, M.A., Matthews, D.A., Patick, A.K. 2007.** In vitro resistance study of rupintrivir, a novel inhibitor of Human Rhinovirus 3C protease. *American Society for Microbiology*, **51**(12), 4366-4373.
- Bouacem, K. 2016.** Caractérisation de souches bactériennes isolées à partir de sources thermales du Nord-Algérien : Etude des propriétés enzymatiques. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée, USTHB.
- Cavasin, M.A., Rhaleb, N.E., Yang, X.P., Carretero, O.A. 2004.** Prolyl oligopeptidase is involved in release of the antifibrotic peptide Ac-SDKP. *Hypertension*, **43**(5), 1140-1145.
- Chander M. 2019.** Recent advances in microbial production of proteases. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*.
- Chaud, L.C.S., Lario, L.D., Bonugli-Santos, R.C., Sette, L.D., Junior, A.P., de A.Felipe, M.G. 2016.** Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *New Biotechnology*, **33**, 807-814.
- Chen, A.J., Adamek, R.N., Dick, B.L., Credille, C.V., Morrison, C.N., Cohen, S.M. 2019.** Targeting metalloenzymes for therapeutic intervention. *Chemical Reviews*, **119**(2), 1323-1455.
- Clark, A.C. 2016.** Caspase allostery and conformational selection. *Chemical Reviews*, **116**(11).

Das, G., Prasad, M.P. 2010. Isolation, purification & mass production of proteases enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int. Res. J. Microbiol.*, **1** (2), 26-31.

De Souza Vandenberghe, L.P., Karp, S.G., Pagnoncelli, B.M.G. 2020. Classification of enzymes and catalytic properties. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*, 11-30.

Dhillon, A., Sharma, K., Rajulapati, V., Goyal, A. 2017. Proteolytic enzymes. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering : Production, Isolation and Purification of Industrial Products*.

Drouin, M. 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. *Thèse de magistère*.

El enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S., El Azaly Y. 2008. Optimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scales. *Australian J. Basic. Appli. Sci.*, **2** (3), 583-593.

El-Safey, E.M., Ammar, M.S. 2002. α -amylase production using Nile hyacinth under solid state fermentation(SSF) conditions. *Int. Conf. Devel. Env. Arab World*, 101-13.

Ishtiaq, A. 2011. Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes. *Bio Ressources*, **6**(4), 4505-4522.

Gaur S., Agrahari S., Wadhwa N. 2010. Purification of protease from *Pseudomonas thermaerum* GW1 isolated from poultry waste site. *Open Microbiol. J.*, **4**, 67-74.

Gençkal, H. 2004. Studies on alkaline protease production from *Bacillus* sp. *Thesis of magisterium. Institut of Technology. Izmir-Turkey*.

Holliday, G.L., Andreini, C., Fischer, J.D., Rahman, S.A., Almonacid, D.E., Williams, S.T., Pearson, W.R. 2012. MACiE : exploring the diversity of biochemical reactions. *Nucleic Acids Research*, **40**, 783-789.

Joo, H., Kook, B., Park, K.I., Bae, S.H., Yun J.W., Chang, C.S., Choi, J.W. 2007. Cloning and expression of the cathepsin F-like cysteine protease gene in *Escherichia coli* and its characterization. *J. Microbiol.*, **45**(2), 158-167.

Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C.S. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshi*. *Pro. Biochem.*, **38**, 155-159.

- Kasana, R.C., Salwan, R., Yadav, S.K. 2011.** Microbial Proteases : detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in microbiology*, **37**(3), 262-276.
- Kumar, A.G., Swarnalatha, S., Gayathri, S., Nagesh, N., Sekaran, G. 2008b.** Characterization of an alkaline active-thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *Journal of Applied Microbiology*, **104**(2), 411-9.
- Kumar, C.G., Malik, R.K., M.P., T. 1998.** Novel enzyme-based detergents : an indian perspective. *Current Science*, **75**, 1312-1318.
- Kumar, D., Savitri., Thakur, N., Verna, R., Bhalla, T.C. 2008.** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, **3**(12), 661-672.
- Kirk, O., Borchert, T.V., and Fuglsang, C.C. 2002.** Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 345- 351.
- Krishna, K.V., Gupta, M., Gaudani, H., Trivedi, S., Patil P., Gupta, G., Khairnar Y., Borasate A., Mishra, D. 2009.** Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. *Int. J. Microbiol. Res.*, **1**, 14-18
- Lario, L.D., Chaud, L., Almeida, M.G., Converti, A., Duraes Sette, L., Pessoa, A. 2015.** Production, purification, and characterization of an extracellular acid protease from the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. *British Mycological Society*.
- Mala, B. 1998.** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol and Molecular Biology Review*, **62** (3), 597-635.
- Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M.A., Mercado-Flores, Y. 2016.** Secreted fungal aspartic proteases : A review. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Mienda, B.S., Galadima, I., Yahya, A., Shamsir. S. 2014.** An overview of microbial proteases for industrial applications. *Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*
- Mótyán, J.A., Tóth, F., Tózsér, J. 2013.** Research Applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, **3**, 923-942.
- Mukhtar, H., Haq, I. 2009.** Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Zoological Society*, **41**(4), 253-260.
- 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 (Alzwpirase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, **48**, 173-180.

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), 597-653.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. 2011. MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, **40**, 353-50.

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., Ashraf M. 2019. Microbial proteases applications. *Bioengineering and Biotechnology*.

Reginald, H., Garrett, C., Grisham, M. 2000. Biochimie, (Vol : 1). *Belgique : Edition de Boeck Supérieure*

Robinson, P.K. 2015. Enzymes : principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.*, **59**, 1-41.

Sandhya, C., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2005. Microbial proteases. *Methods Bio Technol.*, **17**,165-179.

Santos Aguilar, J.C., Sato, H.H. 2018. Microbial proteases : production and application in obtaining proteins hydrolysates. *Food Research International*, **103**, 253-276.

Sethia, K. 2016. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus*. *Journal of Taibah University for Science*, **10** (15), 571-583.

Siala, R., Kamoun, A.S., Hajji, M., Abid, I., Gharsallah, N., Nasri, M. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II : purification and characterization. *African J. Biotechnol.*, **8** (18), 4582-4589.

Singh, R., Mittal, A., Kumar, M., Mehta, P.K. 2016. Microbial proteases in commercial applications. *Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, **4**(3), 365-374.

Snellios. 2006. Serine protease mechanism.

Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases : a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, **44** (2), 211-220.

Szeltner, Z., Polgar, L., 2008. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Current Protein and Peptide Science*, **9**(1), 96-107.

Van der Hoorn, R.A. 2008. Plant Proteases : From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review Plant Biology*, **59**, 191-223.

Velooralappil, N.J., Robinson, B.S., Selvanesan, P., Sasidharan, S., Kizhakkepawothail, N.U., Sreedharan, P., Moolakkarijil, S.J., Sailas, B. 2013. Versability of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*.

Wilkesman, J., Kurz, L. 2009. Protease Analysis by Zymography : a review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, **3**,175-184.

https://www.cambridgemedchemconsulting.com/resources/hit_identification/focus/metalloprotease_inhib_files/metallo_mech.png

<https://images.app.goo.gl/42ELpbJ9dqJfc6i59>

https://www.researchgate.net/figure/Classical-cysteine-protease-reaction-mechanism_fig1_290168681

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Serine_protease_mechanism_by_snellios.png

<https://3.imimg.com/data3/LI/XO/MY-5119523/proteases-enzyme-500x500.jpg>

Résumé

La demande d'enzymes dans les secteurs industriels augmente rapidement en raison de leurs avantages économiques et écologiques. Les micro-organismes produisent différentes types d'enzymes pour maintenir leur propre métabolisme, leur défense et leur état physiologique normal. Parmi plusieurs enzymes, les protéases ont fait l'objet d'une attention particulière dans les secteurs industriels surtout celles obtenues à partir des micro-organismes en raison de leur faible coût, leur taux de production élevé, leur disponibilité, leur stabilité et leur diversité. Les protéases microbiennes sont le plus utilisées dans plusieurs industries comme l'industrie pharmaceutique, de détergents, de cuirs, alimentaires, photographiques. Notre travail décrit les techniques de production de protéases microbiennes et étudie également leurs applications dans diverses industries.

Les mots clés : Enzymes, protéases microbiennes, biotechnologie, application industrielle.

Abstract

The demand for enzymes in industrial sectors is rapidly increasing due to their economic and ecological advantages. Microorganisms produce different types of enzymes to maintain their own metabolism, defense and normal physiological state. Among several enzymes, proteases have received special attention in industrial sectors especially those obtained from microorganisms due to their low cost, high production rate, availability, stability and diversity. Microbial proteases are most used in several industries such as pharmaceutical, detergents, leather, food, photographic. Our work describes the production techniques of microbial proteases and also studies their applications in various industries.

Key words : Enzymes, microbial proteases, biotechnology, industrial application.

ملخص

يتزايد الطلب على الإنزيمات في القطاعات الصناعية بسرعة بسبب مزاياها الاقتصادية والبيئية. تنتج الكائنات الحية الدقيقة أنواعًا مختلفة من الإنزيمات للحفاظ على التمثيل الغذائي الخاص بها والدفاع والحالة الفسيولوجية الطبيعية. من بين العديد من الإنزيمات، حظي البروتياز باهتمام خاص في القطاعات الصناعية وخاصة تلك التي تم الحصول عليها من الكائنات الحية الدقيقة بسبب تكلفتها المنخفضة ومعدل إنتاجها المرتفع وتوافرها واستقرارها وتنوعها. تستخدم البروتياز الميكروبية في العديد من الصناعات مثل الأدوية والمنظفات والجلود والمواد الغذائية والتصوير الفوتوغرافي. يصف عملنا تقنيات إنتاج البروتياز الميكروبية ويدرس أيضًا تطبيقاتها في مختلف الصناعات.

: الكلمات المفتاحية الإنزيمات، البروتياز الجرثومي، التكنولوجيا الحيوية، التطبيقات الصناعية.