

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE KOUBA ALGER



N° d'ordre : Doc/ /2016

---

## THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

---

Présentée par

Mme SOURAYA BOULKOUR eps TOUIOUI

---

# ÉTUDE DE LA PRODUCTION DES PROTÉASES ET D'ANTIBIOTIQUES PAR UNE SOUCHE DE *Streptomyces* sp. AH4 ISOLÉE D'UN SOL DE LA MITIDJA (ALGÉRIE)

---

Date de soutenance : 20 Février 2016

Devant le jury d'examen

<b>SABAOU Nasserline</b> , <i>Professeur, ENS-Kouba</i>	Président
<b>LAMARI Lynda</b> , <i>Professeur, ENS-Kouba</i>	Examinatrice
<b>DJIBAOUI Rachid</b> , <i>Maître de conférences A, Université de Mostaganem</i>	Examinateur
<b>JAOUADI Bassem</b> , <i>Maître de conférences A, CBS (Tunisie)</i>	Examinateur
<b>BADIS Abdelmalek</b> , <i>Professeur, Université de Blida 1</i>	Directeur de thèse
<b>BOUDJELLA Hadjira</b> , <i>Professeur, ENS-Kouba</i>	Codirecteur de thèse

2015 -2016

# TABLE DES MATIÈRES

---

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>5</b>
1. LE GENRE <i>STREPTOMYCES</i> ET LA SOUCHE AH4 DE <i>STREPTOMYCES SP.</i> .....	6
1.1. <i>Généralités sur les Actinobactéries et le genre Streptomyces</i> .....	6
1.1.1. Position taxonomique et description morphologique du genre <i>Streptomyces</i> .....	6
1.1.2. Écologie et distribution dans la nature .....	7
1.1.3. Intérêt des <i>Streptomyces</i> .....	8
1.2. <i>Présentation de la souche AH4 de Streptomyces sp.</i> .....	11
1.2.1. Origine et position taxonomique de la souche .....	11
1.2.2. Potentiel producteur de la souche AH4 .....	12
2. LES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES .....	13
2.1. <i>Généralités sur les protéases</i> .....	13
2.2. <i>Le marché mondial des enzymes</i> .....	13
2.3. <i>Origine des protéases</i> .....	14
2.4. <i>Nomenclature et classification des protéases</i> .....	15
2.4.1. Classification selon le mode d'action .....	15
2.4.2. Classification selon la nature du résidu nucléophile du site actif .....	16
2.5. <i>Différentes classes de protéases</i> .....	17
2.5.1. Peptidases à sérine .....	17
2.5.2. Peptidases à cystéine .....	17
2.5.3. Peptidases à acide aspartique .....	18
2.5.4. Peptidases à métal .....	18
2.5.5. Peptidases à thréonine .....	18
2.6. <i>Applications biotechnologiques</i> .....	19
2.6.1. Détergence .....	19
2.6.2. Tannerie .....	22
2.6.3. Industrie pharmaceutique .....	22
2.6.4. Traitement des rejets industriels .....	22

2.6.4.1.	Traitement de la soie .....	22
2.6.5.	Industrie alimentaire .....	23
2.7.	<i>Protéases et production des antibiotiques</i> .....	23
3.	LES ANTIBIOTIQUES .....	24
3.1.	<i>Les antibiotiques antifongiques</i> .....	26
3.1.1.	Les antifongiques luttant contre les mycoses.....	26
3.1.2.	Les antifongiques luttant contre les maladies cryptogamiques .....	28
3.2.	<i>Microorganismes producteurs de molécules antifongiques</i> .....	29
3.2.1.	Recherche de nouveaux antifongiques.....	30
3.3.	<i>Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques</i> .....	31
3.3.1.	Influence de l'inoculum .....	32
3.3.2.	Influence de la composition du milieu de culture .....	32
3.3.2.1.	Influence de la source de carbone .....	33
3.3.2.2.	Influence de la source d'azote .....	33
3.3.2.3.	Influence des éléments minéraux et oligoéléments .....	33
3.3.2.4.	Influence des conditions environnementales de culture .....	34
	<b>CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>37</b>
1.	LA SOUCHE AH4 DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. ....	38
1.1.	<i>Isolement</i> .....	38
1.2.	<i>Conservation de la souche</i> .....	38
2.	PRÉPARATION DE L'INOCULUM POUR LES CULTURES DE PRODUCTION .....	38
3.	LES PROTÉASES.....	39
3.1.	<i>Recherche de l'activité protéasique de la souche AH4 sur milieu solide</i> .....	39
3.2.	<i>Production de protéases en milieu liquide</i> .....	39
3.3.	<i>Dosage de l'activité protéolytique</i> .....	39
3.4.	<i>Recherche d'un milieu de Culture de production des protéases</i> .....	40
3.4.1.	Les sources de carbone.....	40
3.4.2.	Les sources d'azote.....	41
3.4.3.	Les sels minéraux et oligoéléments.....	41
3.5.	<i>Purification des protéases</i> .....	41
3.5.1.	Extraction de l'activité protéolytique .....	42
3.5.2.	Purification des protéases par traitement thermique .....	42
3.5.3.	Purification des protéases par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium .....	43
3.5.4.	Semi-purification par chromatographie sur colonne échangeuse de cations.....	43
3.5.5.	Purification par HPLC.....	43
3.6.	<i>Quantification et vérification de la pureté des protéases</i> .....	44
3.6.1.	Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.....	44
3.6.2.	Détection de l'activité protéasique sur zymogramme.....	45
3.7.	<i>Caractérisation des protéases</i> .....	45
3.7.1.	Effet des inhibiteurs sur les protéases.....	45
3.7.2.	Détermination des séquences N-terminales d'acides aminés des enzymes protéolytiques .....	46

3.7.3.	Détermination des masses moléculaires des protéases .....	46
3.7.4.	Détermination des substrats spécifiques pour les protéases .....	46
3.7.5.	Détermination des paramètres de La cinétique enzymatique.....	47
3.8.	<i>Étude de l'activité et de la stabilité des protéases à différents facteurs physico-chimiques.....</i>	47
3.8.1.	Effet du pH sur l'activité et la stabilité des protéases.....	47
3.8.2.	Effet des ions métalliques sur l'activité enzymatique.....	48
3.8.3.	Effet de la température sur l'activité et la stabilité des protéases .....	48
3.9.	<i>Étude de l'activité et la stabilité des protéases en présence de détergents .....</i>	48
3.9.1.	Effet de certains additifs de détergents sur l'activité et la stabilité des protéases .....	48
3.9.2.	Stabilité et activité des protéases en présence des détergents liquides .....	49
3.9.3.	Stabilité et activité des protéases en présence des détergents solides.....	49
4.	LES ANTIBIOTIQUES.....	49
4.1.	<i>Étude des propriétés antagonistes de la souche AH4 de Streptomyces sp. ....</i>	49
4.1.1.	Technique des stries croisées .....	50
4.2.	<i>Étude de la production de l'activité antifongique sur différents milieux de culture.....</i>	51
4.2.1.	Précultures et cultures de production des antibiotiques .....	51
4.2.2.	Mesure de l'activité antifongique, de la croissance et du pH.....	53
4.3.	<i>Étude de la stabilité des antibiotiques .....</i>	54
4.3.1.	Stabilité en fonction du pH .....	54
4.3.2.	Stabilité en fonction de la température.....	55
4.3.3.	Stabilité à la lumière .....	55
4.4.	<i>Purification des antibiotiques.....</i>	55
4.4.1.	Extraction des antibiotiques .....	56
4.4.1.1.	Extraction à partir du filtrat de culture .....	57
4.4.1.2.	Extraction à partir du mycélium .....	57
4.4.2.	Tests d'antibiogramme .....	57
4.4.2.1.	Méthode de diffusion des disques de papier .....	57
4.4.2.2.	Méthode de diffusion des puits .....	58
4.4.3.	Semi-purification des antibiotiques par chromatographie d'exclusion diffusion –HPLC.....	58
4.4.4.	Purification par HPLC sur colonne C18 .....	58
4.5.	<i>Caractérisation partielle des antibiotiques .....</i>	59
4.5.1.	Révélation microbiologique ou bioautographie .....	59
4.5.1.1.	Préparation des plaques de gel de silice .....	59
4.5.1.2.	Chromatographie sur plaques minces de gel de silice .....	60
4.5.1.3.	Bioautographie.....	60
4.5.2.	Révélation chimiques .....	61
4.5.3.	Caractérisation par Spectrophotométrie UV-visible.....	61
4.5.4.	Spectroscopie Infrarouge.....	61
4.6.	<i>Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques de la souche AH4</i>	62
4.6.1.	Préparation des suspensions .....	62
4.6.2.	Préparation des solutions mères des antibiotiques.....	62
4.6.3.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices .....	63

<b>CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>64</b>
1. PRODUCTION, PURIFICATION, ET CARACTÉRISATION DES PROTÉASES.....	65
1.1. Recherche de l'activité protéasique de la souche.....	65
1.2. Culture de production des protéases en milieu liquide.....	66
1.3. Recherche d'un milieu de culture de production optimale des protéases.....	68
1.3.1. Effet de différentes sources de carbone sur la production des protéases.....	68
1.3.2. Effet de la concentration de la caséine sur la production des protéases.....	69
1.3.3. Effet de différentes sources d'azote sur la production des protéases.....	71
1.3.4. Effet de la concentration d'extrait de levure sur la production des protéases par <i>Streptomyces</i> sp. AH4.....	72
1.3.5. Effet de la concentration en CaCl <sub>2</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> et en oligoéléments sur la production des protéases par la souche AH4.....	73
1.4. Purification des protéases.....	75
1.4.1. Extraction des protéases.....	75
1.4.2. Traitement thermique et précipitation fractionnée des protéines au sulfate d'ammonium.....	75
1.4.3. Semi-purification des protéases par chromatographie sur colonne échangeuse de cations.....	76
1.4.4. Purification des protéases par HPLC.....	77
1.5. Estimation de la taille des deux protéases et vérification de leur pureté par électrophorèse et zymogramme.....	79
1.6. Caractérisation des protéases.....	80
1.6.1. Effet des inhibiteurs et des agents réducteurs spécifiques sur l'activité des deux protéases.....	80
1.6.2. Détermination des séquences NH <sub>2</sub> - terminales d'acides aminés des protéases purifiées SAPS-P1 et SAPS-P2	82
1.6.3. Détermination des poids moléculaires des protéases SAPS-P1 et SAPS-P2 de <i>Streptomyces</i> sp. AH4.....	84
1.6.4. Détermination de la spécificité des deux protéases vis-à-vis des substrats protéiques.....	85
1.6.5. Détermination des paramètres de la cinétique enzymatique.....	86
1.7. Étude de l'activité et de la stabilité des protéases à différents facteurs physico-chimiques.....	88
1.7.1. Effet du pH sur l'activité des enzymes protéolytiques.....	88
1.7.2. Effet du pH sur la stabilité des enzymes protéolytiques.....	89
1.7.3. Effet des ions métalliques sur l'activité des SAPS-P1 et SAPS-P2.....	90
1.7.4. Effet de la température sur l'activité des protéases SAPS-P1 et SAPS-P2.....	91
1.7.5. Thermostabilité des deux protéases.....	92
1.8. Étude des deux protéases en vue d'une application dans le domaine de la détergence.....	94
1.8.1. Étude de l'effet de certains additifs de détergent sur l'activité et la stabilité des protéases.....	95
1.8.2. Activité et Stabilité des protéases en présence des détergents commerciaux liquides et solides.....	97
2. PRODUCTION, PURIFICATION, ET CARACTÉRISATION DES ANTIBIOTIQUES.....	100
2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche <i>Streptomyces</i> sp. AH4 sur milieu solide	100
2.2. Étude de la production de l'activité antifongique en milieux de culture agités.....	103
2.2.1. Cinétiques de production en milieux de culture complexes.....	103
Milieu Bennett.....	105
Milieu ISP2 (International <i>Streptomyces</i> Project).....	105
Milieu GAY (Glycerol-Arginine-Yeast extract).....	106

Milieu 333 .....	106
Milieu TSB (Tryptic Soy Broth).....	107
2.2.2. Cinétiques de production avec différentes sources de carbone.....	110
Milieu MSS additionné de fructose .....	111
Milieu MSS additionné de glucose .....	111
Milieu MSS additionné de saccharose.....	113
Milieu MSS additionné de Maltose .....	113
Milieu MSS additionné de Mannose .....	113
Milieu MSS additionné de glycérol.....	114
Milieu MSS additionné d'amidon .....	114
Milieu MSS additionné de Galactose.....	115
2.2.3. Effet de la concentration du fructose sur la production des antifongiques .....	119
Milieu MSS-fructose à 10 g/L .....	119
Milieu MSS-fructose à 20 g/L .....	120
Milieu MSS-fructose à 25 g/L .....	120
Milieu MSS-fructose à 30 g/L .....	121
2.2.4. Cinétiques de production avec d'autres sources de carbone .....	125
Milieu MSS additionné d'acide arachidonique.....	125
Milieu MSS additionné d'acide linoléique .....	126
Milieu MSS additionné d'acide palmitique .....	126
Milieu MSS additionné d'huile de maïs.....	126
Milieu MSS additionné d'huile d'olive.....	127
Comparaison entre les deux sources de carbone, le fructose et l'huile d'olive .....	131
2.2.5. Cinétique de production avec différentes sources d'azote .....	132
Milieu MSS-Fructose additionné de Proline .....	132
Milieu MSS-Fructose additionné de leucine.....	133
Milieu MSS-Fructose additionné de caséine .....	133
Milieu MSS-Fructose additionné de peptone.....	133
Milieu MSS-Fructose additionné d'extrait de malt.....	135
Milieu MSS-Fructose additionné à l'extrait de levure .....	135
Milieu MSS-Fructose additionné de nitrate d'ammonium $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .....	136
Milieu MSS-Fructose additionné de tryptone .....	136
2.2.6. Effet de la concentration de la tryptone sur la production des antifongiques par la souche <i>Streptomyces</i> sp. AH4	140
Milieu MSS-fructose additionné de tryptone à 2 g/L .....	141
Milieu MSS-fructose additionné de tryptone à 4 g/L .....	141
Milieu MSS-fructose additionné de tryptone à 6 g/L .....	141
Milieu MSS-fructose additionné de tryptone à 10 g/L .....	142
2.2.7. Effet des oligo éléments et des sels minéraux sur la production des antifongiques de la souche <i>Streptomyces</i> sp. AH4	146
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....	146
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	147
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	147
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $\text{MoO}_3$ .....	147

Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $MnSO_4 \cdot H_2O$ .....	148
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $ZnCl_2$ .....	148
Milieu MSS fructose-tryptone additionné en oligo éléments .....	149
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	151
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $K_2HPO_4$ .....	151
Milieu MSS fructose-tryptone additionné de $Na_2HPO_4$ .....	152
Milieu MSS fructose-tryptone additionné en sels minéraux .....	152
2.2.8. Influence des paramètres physicochimiques de culture sur la production de l'activité antifongique .....	159
1- Effet de la température d'incubation .....	159
2- Effet du pH.....	162
3- Effet de la vitesse d'agitation .....	165
2.3. <i>Etude de la stabilité de l'activité antifongique</i> .....	169
2.3.1. Effet du pH.....	169
2.3.2. Effet de la température .....	170
2.3.3. Effet de la lumière .....	171
2.4. <i>Extraction des antibiotiques</i> .....	172
2.4.1. Extraits organiques .....	172
2.4.2. Extraits aqueux .....	173
2.4.3. Extrait méthanolique du mycélium .....	174
2.5. <i>Détection des polyènes dans l'extrait brut à l'hexane</i> .....	174
2.6. <i>Purification des antibiotiques antifongiques</i> .....	175
2.6.1. Semi purification des antibiotiques par chromatographie d'exclusion diffusion .....	175
2.6.2. Activité antimicrobienne des produits semi purs .....	177
2.7. <i>Purification de la fraction F5 par HPLC sur colonne C18</i> .....	177
2.8. <i>Caractérisation des antibiotiques antifongiques</i> .....	180
2.8.1. Révélations chimiques .....	180
2.8.2. Caractérisation par spectroscopie UV-visible .....	182
2.8.3. Caractérisation par spectroscopie infrarouge .....	182
2.9. <i>Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques F5-1 et F5-2</i> .....	184
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES</b> .....	<b>187</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>193</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>220</b>
ANNEXE 1. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE .....	221
ANNEXE 2. SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE DES MACROLIDES POLYÉNIQUES.....	223
ANNEXE 3. LES MALADIES CAUSÉES PAR LES CHAMPIGNONS.....	224
ANNEXE 4. PROFIL DE RÉSISTANCE.....	226
ANNEXE 5. RÉVÉLATEURS CHIMIQUES UTILISÉS POUR LES ANTIBIOTIQUES (MERCK, 1975) .....	228
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>229</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>µg :</b>	Micogramme	<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>2-ME :</b>	2-mer-captoéthanol	<b>CTAB :</b>	Héxadécyl triméthylammonium bromide
<b>A.M :</b>	Acétate d'éthyle-méthanol	<b>DFP :</b>	Diiodopropyl fluorophosphates
<b>Ac :</b>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<b>DTNB :</b>	5,5-dithio-bis-(2-nitro benzoïque acide)
<b>Af :</b>	<i>Aspergillus flavus</i>	<b>E10 :</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>Alt :</b>	<i>Alternaria</i>	<b>E13 :</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>AmB :</b>	Amphotéricine B	<b>E16 :</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<b>An :</b>	<i>Aspergillus niger</i>	<b>E32 :</b>	<i>Salmonella enterica</i>
<b>Ap :</b>	<i>Aspergillus penicilloides</i>	<b>E40 :</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>At :</b>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<b>E52 :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ATEE :</b>	N-acetyl-L-tyrosine éthyle ester monohydrate	<b>Ec :</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>Aw :</b>	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	<b>EDTA :</b>	Ethylène-diaminetetraacétique acide
<b>B.A.E :</b>	n-butanol-acide acétique-eau	<b>Ef :</b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>BAEE :</b>	N- benzol-L-arginine éthyle ester	<b>EGTA :</b>	Ethylène glycol-bis (β-aminoéthyl éther)- N, N, N', N'-tétraacétique acide
<b>BCEE :</b>	S-benzyl-L-cystéine éthyle ester hydrochloride	<b>EPNP :</b>	1,2-époxy-3-(p-nitrophénoloxo) propane
<b>Bcf :</b>	<i>Botrytis cinerea</i> (fève)	<b>F :</b>	Fraction
<b>Bcv :</b>	<i>Botrytis cinerea</i> (vigne)	<b>Fc :</b>	<i>Fusarium culmorum</i>
<b>Bs :</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	<b>Fg :</b>	<i>Fusarium graminearum</i>
<b>BTEE :</b>	N- benzol-L-tyrosine éthyle ester	<b>Fm :</b>	<i>Fusarium moliniforme</i>
<b>Ca200 :</b>	<i>Candida albicans</i> IPA200	<b>Foa :</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>albedinis</i>
<b>CaM1 :</b>	<i>Candida albicans</i> M1	<b>Fol :</b>	<i>Fusarium . oxysporum</i> f.sp. <i>lini</i>
<b>CaM2 :</b>	<i>Candida albicans</i> M2	<b>Fp :</b>	<i>Fusarium proliferatum</i>
<b>CaM3 :</b>	<i>Candida albicans</i> M3	<b>Fs :</b>	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur couche mince	<b>GAY:</b>	Glycerol-Arginine-Yeast extract
<b>CFU :</b>	Colony forming unit	<b>h :</b>	Heure
<b>CHAPS :</b>	3-3-cholamidopropyl diméthylammonio]-1-propane sulfonate		
<b>cm :</b>	Centimètre		



<b>ISP :</b>	International <i>Streptomyces</i> Project
<b>kDa :</b>	Kilo dalton
<b>Kp :</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>L :</b>	Litre
<b>LAS :</b>	linéaire alkylbenzène sulfonate
<b>LD-DTT :</b>	LD-dithiothreitol
<b>Lm :</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>m :</b>	Mètre
<b>M :</b>	Molarité
<b>MA :</b>	Mycélium aérien
<b>MCB:</b>	Milieu Complexe B
<b>min :</b>	Minute
<b>mL :</b>	Millilitre
<b>mm :</b>	Millimètre
<b>Mpa :</b>	Millipascale
<b>MS :</b>	Mycélium du substrat
<b>MSS :</b>	Milieu Semi-Synthétique
<b>N :</b>	Normalité
<b>NA :</b>	Non actif
<b>NEM :</b>	<i>N</i> -éthylmaléimide
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>p/v :</b>	Poids/volume
<b>Pa :</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Pe :</b>	<i>Penicillium expansum</i>
<b>Pg :</b>	<i>Penicillium glabrum</i>
<b>pH :</b>	Potentiel hydrogène
<b>PMSF :</b>	Phényl méthane sulfonyl fluoride
<b>q.s.p :</b>	Quantité suffisante pour
<b>Rf :</b>	Rapport frontal
<b>rpm :</b>	Rotation par minute
<b>S :</b>	<i>Streptomyces</i>
<b>Sa :</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<b>SAPS-P1 :</b>	<i>Streptomyces</i> alcaline protéase à sérine-protéase1
<b>SAPS-P2 :</b>	<i>Streptomyces</i> alcaline protéase à sérine-protéase2
<b>SBTI :</b>	Soy bean trypsin inhibitor
<b>Sc :</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SDS :</b>	Dodécyl sulfate de sodium
<b>Se :</b>	<i>Salmonella enterica</i>
<b>STPP :</b>	Sodium tripolyphosphate
<b>T :</b>	Témoin
<b>T° :</b>	température
<b>TAED :</b>	Tétra acétylène éthylène diamine
<b>TCA :</b>	Acide trichloro-acétique
<b>TLCK :</b>	<i>N</i> α- <i>p</i> -tosyl L-lysine chlorométhyl kétone
<b>TPCK :</b>	<i>N</i> α- <i>p</i> -tosyl L-phénylalanine chlorométhyl kétone
<b>Tr :</b>	Temps de rétention
<b>TSB :</b>	Tryptic Soy Broth
<b>TTAB :</b>	Tetradécyl triméthylammonium bromides
<b>U :</b>	unité
<b>Ur :</b>	<i>Umbelopsis ramannianus</i>
<b>UV :</b>	Ultraviolet-Visible
<b>V :</b>	Volume
<b>v/v :</b>	Volume/volume

## LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE MOLÉCULES BIOACTIVES PRODITES PAR LE GENRE <i>STREPTOMYCES</i> . .....	9
TABLEAU 2 : EXEMPLES D'ENZYMES PRODITES PAR LES <i>STREPTOMYCES</i> . .....	10
TABLEAU 3 : MAXIMA D'ABSORPTION EN UV-VISIBLE DES POLYÈNES (MARTIN, 1979). .....	27
TABLEAU 4 : QUELQUES EXEMPLES D'ANTIFONGIQUES SÉCRÉTÉS PAR LES SOUCHES DU GENRE <i>STREPTOMYCES</i> . .....	30
TABLEAU 5 : EFFET DE DIFFÉRENTES SOURCES DE CARBONE SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE ET SUR LA PRODUCTION DES PROTÉASES DE LA SOUCHE AH4. ....	69
TABLEAU 6 : EFFET DE LA CONCENTRATION DE LA CASÉINE SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE ET SUR LA PRODUCTION DES PROTÉASES PAR LA SOUCHE AH4 DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. ....	70
TABLEAU 7 : EFFET DE DIFFÉRENTES SOURCES D'AZOTE SUR LA PRODUCTION DES PROTÉASES DE LA SOUCHE AH4... ..	71
TABLEAU 8 : EFFET DE LA CONCENTRATION D'EXTRAIT DE LEVURE SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE ET SUR LA PRODUCTION DES PROTÉASES PAR LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4. ....	73
TABLEAU 9 : BILAN DE PURIFICATION DES PROTÉASES APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE ET PRÉCIPITATION FRACTIONNÉE AU SULFATE D'AMMONIUM. ....	76
TABLEAU 10 : BILAN DE PURIFICATION DES PROTÉASES 1 ET 2 PAR CHROMATOGRAPHIE HPLC SUR GEL DE FILTRATION. ....	79
TABLEAU 11 : EFFET DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS ET DES AGENTS RÉDUCTEURS SUR LA STABILITÉ DES DEUX PROTÉASES PURES À PARTIR DE LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 (EN RESPECTANT UN RAPPORT MOLAIRE INHIBITEUR/PROTÉASE = 100). ....	81
TABLEAU 12 : LES SÉQUENCES NH <sub>2</sub> -TERMINALES DES PROTÉASES PURES SAPS-P1 ET SAPS-P2 DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 ET LEURS COMPARAISONS AVEC LES SÉQUENCES N-TERMINALES DES PROTÉASES DE <i>STREPTOMYCES</i> SPP. ....	83
TABLEAU 13 : SPÉCIFICITÉ DES PROTÉASES PURES SAPS-P1 ET SAPS-P2 VIS-À-VIS DES SUBSTRATS. ....	85
TABLEAU 14 : DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DES PROTÉASES PURIFIÉES : SAPS-P1, SAPS-P2, SAPB-L33I/T33S/N99Y, SUBTILISINE CARLSBERG, SG-XIV ET KERAB POUR L'HYDROLYSE DES PEPTIDES SYNTHÉTIQUES. ....	87
TABLEAU 15 : EFFET DE DIFFÉRENTS IONS MÉTALLIQUES SUR LA STABILITÉ DES PROTÉASES PURES .....	90
TABLEAU 16 : EFFET DE DIVERS ADDITIFS SUR LA STABILITÉ ENZYMATIQUE DES PROTÉASES SAPS-P1 ET SAPS-P2 PURES. ....	95
TABLEAU 17 : ACTIVITÉS DES FRACTIONS SEMI PURES OBTENUES APRÈS HPLC D'EXCLUSION DIFFUSION. ....	176
TABLEAU 18: ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE DES ANTIBIOTIQUES PURS F5-1 ET F5-2. ....	180
TABLEAU 19 : CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) DES DEUX ANTIFONGIQUES F5-1 ET F5-2. ....	184
TABLEAU 20 : LISTE DES CHAMPIGNONS CIBLES ET MALADIES. ....	224
TABLEAU 21 : LISTE DES BACTÉRIES CIBLES ET MALADIES. ....	225
TABLEAU 22 : PROFIL DE RÉSISTANCE DES SOUCHES-TESTS AUX ANTIBIOTIQUES UTILISÉS EN THÉRAPIE (TOUATI, 2006). ....	226
TABLEAU 23 : ORIGINE DES SOUCHES MULTIRÉSISTANTES (TOUATI, 2006). ....	227

## LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1 : ARBRE PHYLOGÉNIQUE BASÉ SUR L'ANALYSE DES SÉQUENCES DU GÈNE CODANT POUR L'ARNr 16S ET MONTRANT LA RELATION ENTRE LA SOUCHE AH4 DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. ET LES SOUCHES-TYPES DU GENRE <i>STREPTOMYCES</i> (FODIL ET AL., 2011). .....	12
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION DU MARCHÉ MONDIAL DES ENZYMES (RAO ET AL., 1998). .....	14
FIGURE 3 : SCHÉMA REPRÉSENTANT LE MODE D'ACTION DES PEPTIDASES SELON BARRETT (1998) EN ENDOPEPTIDASES ET EXOPEPTIDASES. ....	15
FIGURE 4 : STRUCTURE CHIMIQUE DE L'AMPHOTÉRICINE B. ....	27
FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA GRISÉOFULVINE (BARRETT, 2002). ....	28
FIGURE 6 : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DE LA PRODUCTION, EXTRACTION, PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PROTÉASES. ....	42
FIGURE 7 : PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DES CINÉTIQUES DE PRODUCTION DE LA SOUCHE AH4 SUR DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE. ....	53
FIGURE 8 : PROTOCOLE GÉNÉRAL DE PRODUCTION, D'EXTRACTION, PURIFICATION ET DE CARACTÉRISATION DES ANTIBIOTIQUES. ....	56
FIGURE 9 : MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE PRODUITE PAR LA SOUCHE BACTÉRIENNE AH4 SUR GÉLOSE NUTRITIVE AU LAIT (TEST SEMI QUALITATIF). ....	65
FIGURE 10 : CINÉTIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DE L'ACTIVITÉ PROTÉASIQUE EN MILIEU DE CULTURE LIQUIDE. ....	67
FIGURE 11 : PROFIL DE PURIFICATION DES PROTÉASES 1 ET PROTÉASE 2 PAR CHROMATOGRAPHIE HPLC GEL DE FILTRATION. ....	77
FIGURE 12 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC DE LA PREMIÈRE INJECTION DE LA PROTÉASE 1. ....	78
FIGURE 13 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC DE LA PREMIÈRE INJECTION DE LA PROTÉASE 2. ....	78
FIGURE 14 : ESTIMATION DE LA TAILLE DES DEUX PROTÉASES SUR SDS-PAGE (PHOTO DU GEL À GAUCHE) ET PROFIL DU ZYMOGRAMME (PHOTO DU GEL À DROITE) DES DEUX PROTÉASES PURES. ....	80
FIGURE 15 : LES SPECTRES DES MASSES MOLÉCULAIRE DES DEUX PROTÉASES SAPS-P1 (A) ET SAPS-P2 (B) DE LA SOUCHE AH4 DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. PAR MALDI-TOF/MS. ....	84
FIGURE 16 : EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ DES ENZYMES SAPS-P1 ET SAPS-P2. ....	88
FIGURE 17 : EFFET DU PH SUR LA STABILITÉ DES PROTÉASES SAPS-P1 ET SAPS-P2. ....	89
FIGURE 18 : EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'ACTIVITÉ DE SAPS-P1 ET SAPS-P2. ....	92
FIGURE 19 : ÉTUDE DE LA THERMOSTABILITÉ DE L'ENZYME SAPS-P1. ....	93
FIGURE 20 : ÉTUDE DE LA THERMOSTABILITÉ DE L'ENZYME SAPS-P2. ....	94
FIGURE 21 : STABILITÉ DES PROTÉASES SAPS-P1 ET SAPS-P2 EN PRÉSENCE DES DÉTERGENTS LIQUIDES À 7 MG/ML APRÈS UNE PRÉ-INCUBATION DE 2H À 40 °C. ....	98
FIGURE 22 : STABILITÉ DES PROTÉASES SAPS-P1 ET SAPS-P2 EN PRÉSENCE DES DÉTERGENTS SOLIDES À 7 MG/ML APRÈS UNE PRÉ-INCUBATION DE 2H À 40 °C. ....	98
FIGURE 23 : PHOTO ILLUSTRANT LA RECHERCHE DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 PAR LA TECHNIQUE DES STRIES CROISÉES. ....	101
FIGURE 24 : SPECTRE D'ACTIVITÉ ANTI-LEVURIENNE DE LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 PAR LA MÉTHODE DES STRIES CROISÉES. ....	101

FIGURE 25 : SPECTRE D'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 PAR LA MÉTHODE DES STRIES CROISÉES.....	101
FIGURE 26 : SPECTRE D'ACTIVITÉ ANTI-BACTÉRIENNE DE LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 PAR LA MÉTHODE DES STRIES CROISÉES .....	102
FIGURE 27 : CINÉTIQUES DE CROISSANCE, DE pH ET DE PRODUCTION DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS DIFFÉRENTS MILIEUX DE CULTURE COMPLEXES. ....	104
FIGURE 28 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEUX DE CULTUR COMPLEXES CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	108
FIGURE 29 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU BENNETT CONTRE AC ET UR.....	109
FIGURE 30 : CINÉTIQUE DE CROISSANCE, DE pH ET DE PRODUCTION DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 DANS LE MILIEU DE BASE MSS ADDITIONNÉ DE SOURCES DE CARBONE.....	113
FIGURE 31 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN SOURCES DE CARBONE CONTRE AC, PG, CAM1, ET UR. ....	116
FIGURE 32 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN FRUCTOSE CONTRE PG ET UR.....	117
FIGURE 33 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION ET DE pH DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS LE MILIEU MSS ADDITIONNÉ DE DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE FRUCTOSE. ....	122
FIGURE 34 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN FRUCTOSE À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	123
FIGURE 35 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION, DE CROISSANCE ET DU pH DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS LE MILIEU MSS ADDITIONNÉ D' ACIDES GRAS ET DES HUILES VÉGÉTALES.....	128
FIGURE 36 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ D' ACIDES GRAS ET DES HUILES VÉGÉTALES CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1. ....	129
FIGURE 37 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ D' HUILE D' OLIVE CONTRE UR ET PG.....	130
FIGURE 38 : COMPARAISON ENTRE LE FRUCTOSE À 30 G/L ET L' HUILE D' OLIVE LE JOUR OPTIMAL DE PRODUCTION...	132
FIGURE 39 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION, DE CROISSANCE ET DE pH DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS LE MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN SOURCES D' AZOTE. ....	135
FIGURE 40 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN SOURCES D' AZOTE CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1. ....	138
FIGURE 41 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ DE TRYPTONE CONTRE AC ET UR.....	138
FIGURE 42 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION, DE CROISSANCE ET DE pH DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS LE MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN TRYPTONE À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS. ....	143
FIGURE 43 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU MSS ADDITIONNÉ EN TRYPTONE À DIFFÉRENTES CONCENTRATION CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	144
FIGURE 44 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION ET DE pH DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS UN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN OLIGO ÉLÉMENTS. ....	151
FIGURE 45 : CINÉTIQUE DE PRODUCTION ET DE pH DES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DE LA SOUCHE AH4 CULTIVÉE DANS UN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN SELS MINÉRAUX.....	153
FIGURE 46 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN OLIGO ÉLÉMENTS CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1. ....	155

FIGURE 47 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN OLIGO ÉLÉMENTS CONTRE AC ET UR. ....	155
FIGURE 48 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN SELS MINÉRAUX CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1. ....	157
FIGURE 49 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ EN SELS MINÉRAUX CONTRE PG, ET UR. ....	157
FIGURE 50 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE MSS À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	161
FIGURE 51 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE MSS À DIFFÉRENTS PH CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	164
FIGURE 52 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE LA SOUCHE AH4 EN MILIEU DE CULTURE MSS À DIFFÉRENTES VITESSES D'AGITATION CONTRE AC, PG, UR, ET CAM1.....	167
FIGURE 53 : EFFET DU PH SUR L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DU FILTRAT DE CULTURE DE L'ISOLAT AH4.....	170
FIGURE 54 : EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DU FILTRAT DE CULTURE DE L'ISOLAT AH4. ....	171
FIGURE 55 : EFFET DE LA LUMIÈRE SUR LES ACTIVITÉS ANTIFONGIQUES DU FILTRAT DE CULTURE DE L'ISOLAT AH4. .....	171
FIGURE 56 : ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DES EXTRAITS ORGANIQUES DE LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. AH4 CULTIVÉE SUR LES MILIEUX BENNETT ET MSS ADDITIONNÉ DE FRUCTOSE ET DE TRYPTONE. ....	173
FIGURE 57 : SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE DE L'EXTRAIT BRUT À L'HEXANE DE LA SOUCHE AH4....	174
FIGURE 58 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC D'EXCLUSION DIFFUSION SUR GEL FILTRATION SHODEX DE LA PREMIÈRE INJECTION DE L'EXTRAIT BRUT À L'HEXANE SOLUBILISÉ DANS LE MÉTHANOL. ....	176
FIGURE 59 : ANTIFONGIGRAMME DES FRACTIONS COLLECTÉES PAR LA MÉTHODE DE DIFFUSION DES DISQUES DE PAPIER CONTRE <i>CANDIDA ALBICANS</i> M1, MONTRANT LA SEULE FRACTION F5 ACTIVE. ....	177
FIGURE 60 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC APRÈS INJECTION DE LA FRACTION ANTIBIOTIQUE ACTIVE F5 SEMI PURE SOLUBILISÉE DANS DU MÉTHANOL SUR COLONNE C18.....	178
FIGURE 61 : ANTIFONGIGRAMME DES FRACTIONS F5-1 ET F5-2 PAR LA MÉTHODE DE DIFFUSION DES DISQUES DE PAPIER CONTRE <i>CANDIDA ALBICANS</i> M1.....	178
FIGURE 62 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC SUR COLONNE C18 APRÈS RE-INJECTION DE LA FRACTION F5-1 SOLUBILISÉE DANS LE MÉTHANOL.....	179
FIGURE 63 : PROFIL D'ÉLUTION EN HPLC SUR COLONNE C18 APRÈS RE-INJECTION DE LA FRACTION F5-2 SOLUBILISÉE DANS LE MÉTHANOL.....	179
FIGURE 64 : LOCALISATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE L'EXTRAIT BRUT À L'HEXANE PAR BIOAUTOGRAPHIE. .....	181
FIGURE 65 : SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'UV-VISIBLE DE L'ANTIBIOTIQUE F5-1 DISSOUT DANS DU MÉTHANOL.	182
FIGURE 66 : SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'UV VISIBLE DE L'ANTIBIOTIQUE F5-2 SOLUBILISÉ DANS DU MÉTHANOL. .....	182
FIGURE 67 : SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'INFRAROUGE DE L'ANTIBIOTIQUE F5-1.....	183
FIGURE 68 : SPECTRE D'ABSORPTION DANS L'NFRAROUGE DE L'ANTIBIOTIQUE F5-2.....	183
FIGURE 69 : LA DÉTERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DE L'ANTIBIOTIQUE F5-2 VIS-À-VIS DE QUELQUES SOUCHES FONGIQUES .....	185

FIGURE 70 : EXEMPLE DE TROIS TÉTRAÈNES, LA NYSTATINE, L'UNAMYCINE ET L'ANTIFONGIQUE PA-166 (OROSHIK  
ET MEBANE, 1963). ..... 223

## RÉSUMÉ

---

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude de la production des protéases et des antibiotiques par une souche d'actinobactérie du genre *Streptomyces*, désignée AH4. La souche produit deux nouvelles enzymes extracellulaires de type protéases alcalines à sérine et deux antibiotiques à activité antifongique et antibactérienne.

Pour les deux types de produits ; enzymes et antibiotiques, une première étape du travail a été consacrée à la recherche d'un milieu de culture de production optimale. Des milieux de culture complexes et/ou synthétiques de base sont testés en suivant des cinétiques de production et de croissance. Après détermination des conditions de production optimale, des cultures sont réalisées afin de produire les deux métabolites en quantités suffisantes pour leur caractérisation. Au jour de production optimale, les extractions sont réalisées à partir du filtrat de culture, suivies de purifications et caractérisation.

La production de l'activité protéasique est suivie dans un milieu complexe initial et a été estimée à 23000 UI/mL. Cette production a augmenté à 24300 U/mL dans le même milieu à base de caséine et d'extrait de levure. Les procédés de purification de l'activité protéasique ont permis de mettre en évidence la présence de deux protéases, lesquelles ont été caractérisées et identifiées à des protéases alcalines à sérine, et ont été désignées SAPS-P1 et SAPS-P2. La détermination des séquences d'acides aminés N-terminales des deux protéases et leur comparaison avec les séquences de protéases disponibles dans la banque de données de Swiss-Prot/TrEMBL, indiquent que nos deux protéases sont nouvelles. La spectrométrie de masse a permis de déterminer leurs masses moléculaires qui sont de 36,4 et 21,1 KDa pour SAPS-P1 et SAPS-P2 respectivement. L'activité et la stabilité des protéases ont été étudiées à différents pH, température et en présence de certains ions métalliques. L'optimum d'activité pour SAPS-P1 est obtenu à pH 12 et à la température de 70 °C, tandis que celui de SAPS-P2 est enregistré à pH 10 et à 60 °C. Leurs thermoactivités et thermostabilités sont considérablement améliorées en présence du calcium à 10 mM. Les protéases SAPS -P1 et SAPS-P2, ont montré une bonne activité, stabilité et tolérance en présence des tensioactifs et certains détergents commerciaux liquides et solides. Ces propriétés permettent de considérer les deux nouvelles protéases pour des applications biotechnologiques notamment comme additifs biologiques dans les détergents liquides et solides.

La production de l'activité antibiotique a été étudiée selon des milieux de culture complexes et dans un milieu semi-synthétique où différentes sources de carbone d'azote et d'éléments minéraux sont testées. La production est optimale et presque similaire dans deux milieux, le milieu complexe Bennett et le milieu semi synthétique à base de fructose et de tryptone. L'optimum d'activité est obtenu avec des cultures à pH initial 7, à la température d'incubation de 30 °C et à la vitesse d'agitation de 250 tpm. Pour la purification des antibiotiques, les substances actives sont extraites à partir du filtrat de culture par l'hexane. Les résultats de purification par HPLC ont montré la présence de deux pics, F5-1 et F5-2, à activité à la fois antifongique et antibactérienne. Pour chacun des deux antibiotiques, l'activité antifongique est plus importante que l'antibactérienne, et celle de la molécule F5-2 est plus élevée que celle de F5-1. L'analyse par spectroscopie UV-visible a permis d'écarter la possibilité d'une structure polyénique. La caractérisation des deux antibiotiques par spectroscopie infrarouge et par révélations chimiques a permis de les rattacher au groupe des aromatiques polycycliques glycosylés, avec absence de fonctions amines. Les concentrations minimales inhibitrices des deux antibiotiques F5-1 et F5-2 ont été déterminées contre des champignons, moisissures et levures, et des bactéries, dont des pathogènes ou toxigènes.

**Mots clés :** *Streptomyces* sp. AH4, production, protéases, antibiotiques antifongiques, purification, caractérisation, nouvelles protéases à sérine, détergence, aromatiques polycycliques glycosylés.

## ABSTRACT

---

In this thesis, we were interested in the study of the production of proteolytic enzymes and antibiotics by an actinobacterium strain belonging to the genus *Streptomyces* and designated AH4. The strain produced two new extracellular serine alkaline proteases and two antibiotics with antifungal and antibacterial activities. For both types of products, enzymes and antibiotics, a first step of the work was devoted to the search of a culture medium for optimal production. Complex and/or synthetic culture media were initially tested by following kinetics of production and growth. After determination of the optimal production conditions, cultures were performed to produce the two metabolites in sufficient amounts for their characterization. After determination of conditions for optimal production, the extractions were carried out from the culture filtrate, followed by purification and characterization.

Production of the protease activity was followed in a basal complex medium and was estimated at 23000 U/mL. This production increased to 24300 U/mL in the same medium supplemented with casein and yeast extract. Purification methods of the protease activity showed the presence of two proteases which have been characterized and identified to serine alkaline proteases, and have been designated SAPS-P1 and SAPS-P2. Determination of the amino acid N-terminal sequences of both proteases and their comparison with the protease sequences available in the database Swiss-Prot / TrEMBL, indicated that the two proteases were novel. Mass spectrometry indicated molecular weights of 36.4 and 21.1 kDa for SAPS-P1 and SAPS-P2 respectively. The activity and the stability of the proteases were studied at different pH values and temperatures as well as in the presence of some metallic ions. SAPS-P1 was optimally active at pH 12.0 and 70 °C, while SAPS-P2 showed optimum activity at pH 10.0 and 60 °C. Their thermoactivities and thermostabilities were improved significantly in the presence of 10 mM calcium. Both enzymes displayed marked stability and compatibility with a wide range of commercial laundry detergents. These results indicated that the new SAPS-P1 and SAPS-P2 proteases can be considered as potential promising candidates for future application as bioadditives in liquid and solid detergent formulations.

The production of the antibiotic activity was studied in complex culture media and in a semi-synthetic medium where different carbon and nitrogen sources and minerals were tested. The production was optimal and similar in two media, the Bennett complex medium and the semi-synthetic medium containing fructose and tryptone. The optimum activity was obtained in cultures with pH 7, incubation at 30 °C, and agitation at 250 rpm. For the purification of the antibiotics, the active substances were extracted from the culture filtrate by hexane solvent. The results of purification by HPLC showed the presence of two peaks designated F5-1 and F5-2, each displaying both antifungal and antibacterial activities. For both antibiotics, antifungal activity was more important than the antibacterial and that of fraction F5-2 molecule was higher than that of the fraction F5-1. The UV-visible spectroscopy analysis indicated the absence of a polyenic structure. The characterization of the two antibiotics by infrared spectroscopy (IR) and chemical revelations led to the identification of glycosylated polycyclic aromatic structures, with no amine functions. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of both antibiotics F5-1 and F5-2 were determined against fungi; molds and yeasts, and bacteria, including pathogenic and toxigenic strains.

**Keywords:** *Streptomyces* AH4, Proteases, Antibiotics antifungal, Production, Purification, Characterization, Detergents, novel serine alkaline proteases, Glycosylated polycyclic aromatics.



يتضمن هذا البحث دراسة إنتاج أنزيمات تفكيك البروتينات و كذا إنتاج المضادات الحيوية من بكتيريا هيفية *Streptomyces AH4*. تُنتج هذه السلالة أنزيمين خارج خلويين جديدين من نوع مفككات البروتينات القاعدية ذات الحمض الأميني serine ومضادين حيويين بنشاط مضاد للفطريات والبكتيريا.

بالنسبة للإنزيمات والمضادات الحيوية، تضمنت المرحلة الأولى من الدراسة البحث عن وسط غذائي لإنتاج أمثل، فتم اختبار أوساط غذائية معقدة و وسط اصطناعي بمتابعة حركيات النمو والإنتاج. بعد تحديد شروط الحصول على إنتاج المركبات الأيضية بكميات كافية لاستخلاصها وتنقيتها وتحديد خصائصها.

تمت متابعة إنتاج النشاط الإنزيمي المفكك للبروتينات في وسط ابتدائي معقد، حيث بلغ معدل الإنتاج قيمة 23000 . وفي حالة تزويد نفس الوسط الزراعي ببروتينات الحليب ومستخلص الخميرة ارتفع الإنتاج إلى قيمة 24300 . سمحت طرق تنقية النشاط الإنزيمي بإظهار وجود إنزيمين اثنين تم تحديدهما إلى إنزيمات مفككة للبروتينات قاعدية ذات الحمض الأميني serine، وأعطيت لهما تسمية SAPS-P1 SAPS-P2. كما سمح تحديد سلسلتي الأحماض الأمينية ذات النهاية الأمينية للإنزيمين ومقارنتهما بسلاسل مفككات البروتينات المتوفرة في بنك المعلومات "Swiss-prot Tr EMBL" أن الإنزيمين جديدين. وتبين من تقنية طيف الكتلة أن للجزيئين الإنزيميين SAPS-P1 SAPS-P2 36,4 21,1 كيلو دالتون على التوالي. توصلت الدراسة باختبار نشاط الإنزيمين وثباتهما حيال معامل الحموضة، والحرارة وبعض الأيونات المعدنية، واتضح أن النشاط المثالي بالنسبة لـ SAPS-P1 12 70° مئوية. أما SAPS-P2 فقد سجل نشاطها المثالي على 60° مئوية بمعامل حموضة 10. كما تم تحسين نشاطهما الأنزيمي وثباته في وجود الكالسيوم بتركيز 10 ميليمول. يتمتع الأنزيمان SAPS-P1 SAPS-P2 بنشاط جيد و ثابت في وجود إضافات مواد الغسيل وبعض مواد الغسيل التجارية الصلبة والسائلة. وهذه الخصائص تؤهل هذين الإنزيمين الجديدين لاستعمالهما في التطبيقات الصناعية كإضافات بيولوجية في مواد الغسيل الصلبة والسائلة.

بالنسبة لإنتاج المضادات الحيوية، تمت متابعة الحركيات في أوساط غذائية معقدة وفي وسط نصف اصطناعي أين تم اختبار عددٍ من مصادر الكربون و الأزوت و عناصر معدنية. وتبين من النتائج الحصول على إنتاج أمثل ومنتشابه في وسطين زراعيين؛ الوسط المعقد Bennett

والتريبتون. حصلنا على النشاط المثالي في الأوساط ذات معامل الحموضة 7 ودرجة حرارة التحضين 30° مئوية و سرعة الرج 250 دقيقة. وفيما يخص تنقية المضادات الحيوية، تم استخلاص المواد النشطة من رشاحة الوسط الزراعي الأمثل بالمذيب العضوي Hexane. وبيئت نتائج التنقية بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية التجلية (HPLC) وجود مركبين F5-1 F5-2 مضاد للفطريات و البكتيريا. بالنسبة لكل مضاد حيوي، كان النشاط المضاد للفطريات أهم من النشاط المضاد للبكتيريا، ونشاط F5-2 أكبر بكثير من نشاط F5-1. أشار التحليل بطيف الأشعة فوق البنفسجية المرئية إلى أن المضادين الحيويين خاليان من المركبات متعددة الروابط الهيدروجينية، و أوضح تشخيص المضادين الحيويين بالأشعة تحت الحمراء والكواشف الكيميائية أنهما تابعان للمركبات العطرية متعددة الحلقات والسكرية وغير حاملة لمجاميع أمينية. أخيراً، تم تحديد التراكيز الأدنى المثبطة (CMI) ضد الفطريات والخمائر والبكتيريا،

**الكلمات المفتاحية:** *Streptomyces AH4* إنزيمات مفككة للبروتينات، مضادات حيوية، إنتاج، تنقية، تحديد الخصائص، بروتياز جديدة ذات السيرين، مواد الغسيل، مضادات حيوية مضادة للفطريات، عطرية متعددة الحلقات سكرية.