



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université les Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biochimie

Spécialité : Analyse protéomique et santé

Intitulé

**Purification partielle et caractérisation des protéases de fleurs
de *Galactites tomentosus* Moench**

Préparé et soutenu par : CHAOUI Radia & BOURSAS Insaf

Le : 06/07/2015

Jury d'évaluation :

Présidente : Melle BENHAMDI A. (Docteur- UFM Constantine).

Rapporteur : Mme MECHAKRA-MAZA A. (Professeur - UFM Constantine).

Examinatrice : Mme BENKAHOUL M. (M.A.A.- UFM Constantine).

Année universitaire : 2014 - 2015

Remerciements

Ce travail a été réalisé
au Laboratoire de Biologie et Environnement (biopôle de Chaab-Ersass)
et au Laboratoire pédagogique d'Enzymologie du département de la Biochimie et de Biologie
moléculaire et cellulaire

Sous la direction de **Mme MECHAKRA-MAZA A.,**
Professeur à Université les Frères Mentouri, Constantine.

Nous tenons ici à lui adresser notre profonde gratitude pour nous avoir acceptées dans son laboratoire, pour l'intérêt qu'elle a porté à notre travail et tout le temps qu'elle nous a consacré. Nous la remercions pour la confiance qu'elle nous a accordée, ses bons conseils et ses remarques avisées, et le plus important, pour la formation scientifique acquise.

* * *

Nos sincères remerciements vont aux membres de jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger ce travail

- **M^{lle} BENHAMDI A., Docteur à l'U.F.C,** d'avoir accepté de présider le jury de soutenance, et également pour son aide et sa gentillesse infinie. Pour nous, vous êtes un exemple à suivre.
- **M^{me} BENKAHOUL Maitre Assistante-A** à l'U.F.C, pour son aide, ses précieuses remarques et ses suggestions au cours du travail pratique

Ainsi que pour le temps qu'elle a consacré pour examiner ce mémoire.

* * *

Nous souhaitons également remercier **Mr Khelifi D., Professeur** à l'U.F.C, pour nous avoir acceptées dans son laboratoire (GBVV)
et **M^{lle} Bellil I., Maitre de conférences** à l'U.F.C pour son aide dans la réalisation de l'électrophorèse.

* * *

Nous adressons également nos remerciements à tous les membres du laboratoire de Biologie et Environnement pour leurs collaborations, en particulier à

M^{me} Amel Soltani Ingénieure du laboratoire,
M^{me} Kassa-Laouar Mounia, et tous les doctorants ; **Hicham, Wissem, Kenza et Imène** pour leur aide à chaque fois que nous avons des questions.

* * *

Nous remercions rigoureusement **M^{me} Leila Boukhelkhal** Ingénieure au laboratoire pédagogique d'enzymologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'U.F.C, de nous avoir accueillies si gentiment et de nous avoir fourni tout le matériel nécessaire pour accomplir notre travail.

* * *

Nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Radia CHAOUI et Insaf BOURSAS

Dédicace...

Ce travail Modest est dédié à :

*A la mémoire de mon père Mohamed lamine (Allah yrahimo)) Aucun mot ne pourra
exprimer ma grande tristesse en ton absence...*

Ton visage gai et souriant...

Ta tendresse infinie...

Et ton amour incomparable...

Resteront à jamais gravés dans mon cœur...

Je te remercie pour tous les beaux moments que nous avons partagés en famille...

Je te remercie pour m'avoir appris à prendre des décisions dans la vie...

Je te remercie pour ton grand amour...

Tu me manques beaucoup papa...

J'aurai aimé que tu sois à mes côtés se jour...

Je t'aime...

A ma chère mère

A mon frère et mes chères sœurs

A ma famille

A tous mes amies

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime

INSAF...

Dedication...

I dedicate this humble work to those whom I love the most...

To the man who gave his heart and soul so I can be the person that I 'am today, the one who taught me patience and wisdom, to my father, Kamel ...

To the woman who brought me to life, the one who gave me love and kindness who taught me strength, and sense of responsibility, to my mother, Wahiba ...

To the one who cared for me the most and had my back every time I was in need, the one who made sure that I stood up every time I fell down, to my sister, Amel...

To the kindest big brother Mounir, thanks' for your trust and your respect, I hope that I made you proud...

To my precious little sister ever and the biggest heart, Abir...

To the one who knows how to make me smile, my little brother Mohamed Amine...

To my dear brother in law, Djallel...

To the best friend I ever had and will ever have, Manel Saadali, neither place nor time can ever change that...

To the person who showed me a whole new perspective of life, H. S.

Radia...

Table des matières

Abréviations.....	I
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Introduction	1
Chapitre 1 : Etude bibliographique	
1. Les enzymes protéolytiques	3
1.1. Généralités sur les enzymes	3
1.2. Classification des enzymes	3
1.3. Les protéases	4
1.3.1. Définition	4
1.3.2. Nomenclature et classification	4
1.3.2.1. Selon le pH d'activité.	4
1.3.2.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.	4
1.3.2.3. Selon la nature des résidus impliqués dans le site actif	6
1.3.2.4. Selon la structure et l'homologie moléculaire	6
1.3.3. Différentes origines de protéases	7
1.3.3.1. Protéases d'origine animale.	7
1.3.3.2. Protéases d'origine microbienne.....	7
1.3.3.3. Protéases d'origine végétale.	8
2. Les protéases végétales	9
2.1. Généralités	9
2.2. Classification des protéases végétales	9
2.3. Différentes sources et rôle physiologique des protéases végétales	9
2.3.1. Aspartyl-protéases	9
2.3.2. Cystéyl-protéases.....	10
2.3.3. Séryl-protéases	11
2.3.4. Métallo-protéases	11
3. Application des protéases	13
3.1. Principales applications des protéases	13
3.2. Applications des protéases végétales	14
3.2.1. Détergents	14
3.2.2. Industrie laitière	14
3.2.3. Transformation des aliments	14
3.2.4. Industrie boulangère.....	15
3.2.5. Pharmacie et médecine	15
3.2.6. Chimie organique	16
3.2.7. Biologie moléculaire	16

4. Techniques de purification des protéines	17
4.1. Méthodes d'extraction et de purification	17
4.1.1. Extraction.....	17
4.1.2. Précipitation	17
4.1.3. Dialyse	17
4.1.4. Tamisage moléculaire	18
4.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	18
5. La plante <i>Galactites tomentosa</i>	19
5.1. Nomenclature et classification.....	19
5.2. Dénominations.....	19
5.3. Ecologie et habitats.....	19
5.4. Morphologie	20

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1. Matériel biologique	21
2. Préparation des extraits bruts	21
3. Purification partielle des protéases	21
3.1. Précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium.....	21
3.2. Dialyse	22
3.3. Exclusion moléculaire sur gel Sephadex G75	22
4. Méthodes de dosage	23
4.1. Dosage de l'activité protéolytique	23
4.2. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry (1951)	25
5. Paramètres de purification	27
6. Effet du pH sur l'activité de l'enzyme purifiée	27
7. Détermination des paramètres cinétiques	27
8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	28

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Détermination du profil des activités protéolytiques en fonction du pH	29
2. Purification de la protéase acide à partir des fleurs entières	30
2.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse	30
2.2. Chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G75	30
2.3. Tableau de purification.....	31
3. Purification de la protéase neutre à partir des pétales	32
3.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse	32
3.2. Chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G75	32
3.3. Tableau de purification.....	33
4. Comparaison des résultats de la purification entre les fleurs et les pétales.....	34
5. Etude de quelques propriétés de la protéase partiellement purifiée à partir pétales ..	35
5.1. Effet du pH sur l'activité protéolytique	35
5.2. Paramètres cinétiques	36
6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).....	37

Conclusion générale	39
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé en français, arabe et anglais	

Liste des abréviations

Abs	absorbance
APs	aspartyl-protéases
AS	activité spécifique
Asp	acide aspartique
B.S.A	<i>Bovin Serum Albumin</i> (Sérum Albumine Bovine).
CPs	cystéyl-protéases
Da	Dalton
DIFP	Diisopropyl-fluorophosphate.
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Commission des enzymes)
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
Hb	hémoglobine
Ig	immunoglobuline
LAPs	leucine-aminopeptidases
M	molaire
MM	masse moléculaire
MPs	métallo-protéases
N	normalité
NC-IUBMB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (Comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et Biologie Moléculaire).
p-CMB	p-chloromercuribenzoate
PMSF	Fluorure de Phényl-Méthyl-Sulfonyle

R	rendement
rpm	rotation par minute
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Sp.	<i>Species</i> (espèces)
SPs	séryl-protéases
T.C.A	<i>Tri Chloroacetic Acid</i> (Acide Trichloracétique)
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane-toxique
TP	taux de purification
w/v	ratio <i>weight/volume</i> (Poids/ volume)

Liste des figures

Figure n°1	Modes d'attaque de la chaîne polypeptidique.	P. 6
Figure n°2	Exemple d'application des protéases en protéomique. Etapes de l'analyse protéomique en utilisant la spectrométrie de masse après séparation et digestion dans le gel des protéines d'intérêt.	P. 13
Figure n°3	Structure des IgG (A) et les fragments libérés après digestion protéolytique par la papaine (B), ou ficine (C).	P. 16
Figure n°4	Photos de la plante <i>Galactites tomentosa</i>	P. 19
Figure n°5	Courbe d'étalonnage de la Tyrosine (100 µl/ml).	P. 25
Figure n°6	Courbe d'étalonnage de la BSA (0,1 mg/ml).	P.26
Figure n°7	Effet du pH sur l'activité protéolytique dans l'extrait brut des fleurs entières de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 29
Figure n°8	Profil d'élution sur gel Sephadex G75 par tampon citrate/ acétate pH 5,5 de la fraction précipité à 60% obtenue à partir des fleurs entières de <i>Galactite tomentosa</i> ,	P. 30
Figure n°9	Profil d'élution sur gel Sephadex G75 par tampon phosphate pH 7 de la fraction précipité à 60% obtenue à partir des fleurs entières de <i>Galactite tomentosa</i> ,	P. 32
Figure n°10	Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase neutre partiellement purifiée à partir des pétales de <i>Galactites tomentosa</i> .	P 36.
Figure n°11	Représentation graphique selon la méthode de Michaelis de l'effet de la concentration de la caséine sur l'activité protéolytique de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 36
Figure n°12	Représentation graphique selon la méthode de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration de la caséine sur l'activité protéolytique de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 37
Figure n°13	Profil électrophorétique de la protéase neutre de <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 38

Liste des tableaux

Tableau n°1	Les différentes classes d'enzymes et leurs réactions catalytiques.	P. 3
Tableau n°2	Quelques exemples des protéases acides, neutres et alcalines.	P. 4
Tableau n°3	Classification des protéases.	P. 5
Tableau n°4	Caractéristiques des 4 principaux types catalytiques de protéases.	P. 6
Tableau n°5	Quelques exemples de protéases végétales et leurs sources.	P. 12
Tableau n°6	Classification de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 19
Tableau n°7	Tableau de purification de la protéase acide extraite des fleurs entières de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 31
Tableau n°8	Tableau de purification de la protéase neutre extraite des pétales de la plante <i>Galactites tomentosa</i> .	P. 33
Tableau n°9	Comparaison entre les activités totales des fleurs entières et des pétales de <i>Galactites tomontosa</i>	P. 34
Tableau n°10	Comparaison entre les rendements et les taux de purification de la protéase des fleurs entières et des pétales de <i>.Galactites tomontosa</i>	P. 35



INTRODUCTION



Introduction

Le marché mondial des enzymes industrielles s'élevait à 3,3 milliards de dollars en 2010. En calculant un taux de croissance de 6,6 %, des revenus de 4,4 milliards de dollars sont prévus pour 2015. Ce marché est estimé à 7,1 milliards de dollars en 2018 (BCC Research, 2014) ; la plus grande part est liée aux protéases (Sarrouh et al., 2012).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans les molécules protéiques. La large diffusion de protéases chez les plantes, les animaux et les microorganismes montre qu'elles sont nécessaires pour tous les organismes où elles jouent des rôles physiologiques importants dans des processus biologiques diverses (Sandhya et al., 2004). Leur importance sur le marché mondial d'enzymes industrielles est lié au rôle important qu'elles jouent dans la biotechnologie, étant donné que la protéolyse modifie les propriétés immunologiques, chimiques, physiques et biologiques des protéines. L'hydrolyse de protéines alimentaires, par exemple, est mise en œuvre pour diverses raisons: l'amélioration des caractéristiques nutritionnelles, la modification des différentes propriétés fonctionnelles (la solubilité, le moussage, la coagulation), la prévention des interactions non souhaitées, le changement de saveurs et les odeurs, et la suppression des facteurs toxiques ou inhibiteurs (Pardo et al., 2000).

Au cours des dernières décennies, l'intérêt pour les produits végétaux naturels a augmenté rapidement. Les protéases d'origine végétales font l'objet d'une attention renouvelée, non seulement en raison de leur grande spécificité de substrat, mais aussi parce qu'elles sont actives sur une large gamme de températures et de pH et en présence de divers ions métalliques, des inhibiteurs et des solvants organiques. (Haddar et al., 2009). Elles peuvent être extraites efficacement en grande quantité et aux moindres coûts. Toutes ces qualités font des protéases végétales un excellent choix pour les industries alimentaires, médicaux, la biotechnologie et la pharmacologie (Rai et Mukherjee 2009).

Les protéases végétales ont été identifiées et étudiées à partir de plusieurs familles de plantes telles que : *Asteraceae*, *Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008). Les extraits de plantes à haute teneur en enzymes protéolytiques ont été utilisés dans la médecine traditionnelle pour une longue période. Ils ont été utilisés pour le traitement du cancer et comme antitumoraux, pour les troubles de la digestion, le gonflement et les problèmes immunitaires, etc (Mello et al, 2008 ;

Otsuki et al, 2010). Un bon exemple est la bromélaïne, extraite de l'ananas, qui est capable d'empêcher les œdèmes, l'agrégation plaquettaire et les métastases en raison de sa capacité à modifier les structures de surface cellulaire par clivage du peptide (Salas et al., 2008).

Plusieurs plantes endémiques riches en protéases sont traditionnellement utilisées pour la préparation de fromage par des méthodes artisanales tant en Algérie que dans de nombreux autres pays. Ainsi, plusieurs extraits de plantes sont utilisés, tels que les extraits de fleurs de *Cynara cardunculus*, les extraits de deux espèces *Cynara humilis* et/ou *Cynara scolymus*, *Silybum marianum*, *Centaurea calciprata*, *Onopordum turcicum* et *Onopordum acanthium*.

Parmi les plantes endémiques locales, nous nous sommes intéressées à l'espèce *Galactites Tomentosa* (ou *G. Tomentosus*) où nous avons axé notre travail sur la localisation et l'étude du profil des activités protéolytiques. Puis nous avons réalisé l'extraction, la purification partielle et l'étude de quelques caractéristiques de la protéase neutre.



SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE



1. Les enzymes protéolytiques

1.1. Généralités sur les enzymes

Les enzymes sont les catalyseurs du monde biologique ; ce sont des macromolécules de haute masse moléculaire (10 à 100 kDa) présentes dans les cellules de tous les organismes vivants où elles jouent un rôle essentiel en contrôlant les procédés métaboliques permettant aux nutriments d'être transformés en énergie et en matériaux cellulaires (Bergmeyer et *al.*, 1979; Pelmont, 1995; Drouin, 2005). En 2005, plus de 3000 activités enzymatiques différentes ont été isolées et identifiées (Patel et *al.*, 2005) ; la structure d'environ 1300 d'entre elles a été déterminée (Leisola et *al.*, 2001).

1.2. Classification des enzymes

Les enzymes se répartissent en six classes : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérasés et ligases (voir tableau n°1).

Tableau n°1 : Les différentes classes d'enzymes et leurs réactions catalytiques (Pelmont, 1995).

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases (EC 1.-.-.)	Réactions de transfert d'électrons (ou d'atome d'hydrogène)
Transférases (EC 2.-.-.)	Transfert de radicaux (Groupements phosphates, amines, méthyle, etc.)
Hydrolases (EC 3.-.-.)	Réactions d'hydrolyse (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases (EC 4.-.-.)	Addition de doubles liaisons à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolyse
Isomérasés (EC 5.-.-.)	Réactions d'isomérisation (réaction où un composé est transformé en un de ses isomères)
Ligases (EC 6.-.-.)	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP)

Tableau n°2 : Quelques exemples de protéases acides, neutres et alcalines.

	Enzyme	Source	Références
Protéases Acides	rennin-like enzymes	<i>Mucor miehei</i> <i>M. pusillus</i> <i>Endothia parasitica.</i> <i>M. hiemalis,</i> <i>M. racemosus,</i> and <i>M. bacilliformis</i>	Escobar J. et al., 1993 ; Fernandez-Lahore et al., 1999
	proteases acid Pepsin-like	<i>Aspergillus</i> spp. and <i>Rhizopus</i> spp.	Tremacoldi et al., 2004 ; Kumar et al., 2005
	Calf rennet (88–94 % chymosin and 6–12 % pepsin)	Estomac de veau	Burgess et al., 1983
	protéase acide	<i>Penicillium</i> sp	Hashimoto et al., 1973
Protéases Neutres	Papaine bromelaine ficine	<i>Carica papaya</i> <i>Ananas comorus</i> <i>Ficus</i> sp.	Schechter et al., 1968
	clostripaine streptopaine	<i>Clostridium histolyticum</i> <i>Streptococcus</i> spp.	Sumantha et al., 2006
	protéase neutre I (NpI) protéase neutre II (NPII)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Nakadai et al., 1973
Protéases alcalines	Subtilisine Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	Anupama et al., 2012
	Protéase alcaline	<i>Aspergillus niger</i>	Kalpana Devi et al., 2008

1.3. Les protéases

1.3.1. Définition

Les protéases sont des molécules globulaires qui catalysent la réaction d'hydrolyse des protéines en peptides et acides aminés par rupture d'une ou plusieurs liaisons peptidiques. Elles jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques; par exemple, elles sont impliquées dans la régulation du métabolisme et l'expression du gène, la pathogénicité et l'hydrolyse de grandes protéines en molécules plus petites pour le transport et le métabolisme (Rao et *al.*, 1998).

1.3.2. Nomenclature et classification

Les enzymes protéolytiques ou protéases, appartiennent à la classe 3 (hydrolases), et la sous classe 4 (hydrolysent les liaisons peptidiques) (IUBMB, 1954). Elles peuvent être classées selon plusieurs critères ; le pH d'activité optimal, le mode d'attaque de la chaîne, la nature des résidu impliqué dans le site actif et la structure et l'homologie moléculaire et (Rao et *al.*, 1998).

1.3.2.1. Selon le pH d'activité









Les enzymes protéolytiques sont classées en trois groupes selon leur pH optimal: acides, neutres et alcalines (Hartley, 1960) (tableau n°2).

1.3.2.2. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisées en deux classes ; les endopeptidases et les exopeptidases (Rao et *al.*, 1998), elles-mêmes divisées en plusieurs classes et sous classes (voir tableau n°3).

- **Les endopeptidases** (EC 3.4.21-25) : agissent au cœur de la chaîne protéique en coupant la protéine en fragments plus petits. La liaison entre deux acides aminés adjacents dans la séquence primaire est rompue donnant ainsi naissance à deux peptides.
- **Les exopeptidases** (EC 3.4.11-19) : hydrolysent les liaisons peptidiques par les extrémités NH₂ ou COOH libres de la chaîne protéique. En effet, elles ont besoin d'un groupe aminé ou carboxyle terminal libre dans le substrat pour libérer des acides aminés ou des petits peptides (2-3 acides aminés), elles sont alors nommées respectivement aminopeptidases ou carboxypeptidases.

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

	Protéases	EC N°	Mode d'action
Exopeptidases	Amino-peptidases		
	Peptidyl peptidase	3.4.11	
	Dipeptidyl peptidase	3.4.14	
	Tripeptidyl peptidase	3.4.14	
	Carboxy-peptidases	(3.4.16-3.4.18)	
	Séryl-carboxy-peptidases	3.4.16	
	Métallo-carboxy-peptidases	3.4.17	
Cystéyl-carboxy-peptidases	3.4.18		
Peptidyl dipeptidase	3.4.15		
Dipeptidase	3.4.13		
Omega peptidases	3.4.19		
Endopeptidases	Séryl-protéases	3.4.21	
	Cystéyl-protéases	3.4.22	
	Aspartyl-protéases	3.4.23	
	Métallo-protéases	3.4.24	
	Endopeptidases (mécanisme catalytique est inconnu)	3.4.99	/

✂ Site d'action de l'enzyme ; * Terminus bloqué ; ● Acides aminés dans la chaîne polypeptidique ; ● Acides aminés terminaux

Les aminopeptidases commencent leur action par l'extrémité NH₂ libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ion métallique ; les carboxypeptidases commencent leur attaque par l'extrémité COOH libre du polypeptide (Scriban, 1999 ; Trap et Boireau, 2000) (voir figure n°1).

Tableau n° 4 : Caractéristiques des 4 principaux types catalytiques de protéases
(Sumantha et al., 2006)

Type	Séryl-protéases	Cystéyl-protéases	Aspartyl-protéases	Métallo-protéases
N° EC	3.4.21	3.4.22	3.4.23	3.4.24
MM (KDa)	18-35	34-35	30-45	19-37
Température Optimale	50-70	40-55	40-45	65-85
pH optimal	6-11	2-3	3-5	5-7
Acides aminés du site actif	Ser, His et Asp	Asp ou cys	Asp ou cys	Phe ou leu
Inhibiteur(s) majeur(s)	PMSF, DIFP, EDTA, tampons phosphate, indole, phenol, Acide triaminoacétique.	Indoacetamide, p-CMB	Pepstatine	Chelateurs : EDTA, EGTA
Sources majeures	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , Tissu animal (intestin), <i>Tritirachium album</i> (thermostable)	<i>Aspergillus</i> , <i>Ananas comorus</i> <i>Ficus sp.</i> <i>Carica papaya</i> <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , tissu animal (estomac)	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>
Références	Coral et al, 2003 Tremacoldi et al, 2007 Vishwanatha et al,2009 Sumantha et al, 2009	Kocabiyik et Ozel,2007 Aftab et al., 2007 Vishwanatha et al., 2009 Sumantha et al.,2006	Rao et al., 1998 Aftab et al., 2007 Vishwanatha et al., 2009 Sumantha et al., 2006	Hosskisson et al., 2005 Wang et al., 2008 Sumantha et al., 2006 Belitz et al., 2009

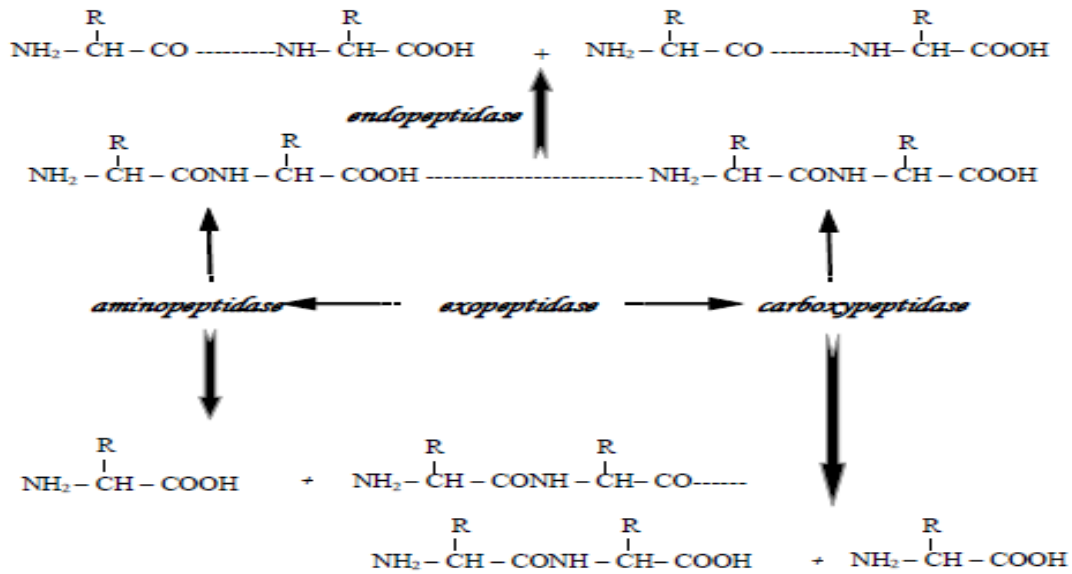


Figure n°1 : Modes d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

1.3.2.3. Selon la nature des résidus impliqués dans le site actif

Selon le résidu participant à la catalyse au niveau du site actif, les protéases peuvent être regroupées en : aspartyl, cystéyl, séryl, thréonyl, glutamyl et métallo-protéases, en plus des protéases mixtes ou de type catalytique inconnue (Rawlings et *al.*, 2012). Les caractéristiques des 4 principaux types catalytique sont résumées dans le tableau n°4 (Sumantha et *al.*, 2006).

1.3.2.4. Selon la structure et l'homologie moléculaire

Selon la classification de référence, disponible dans la base de données électronique MEROPS qui est constamment révisée (<http://merops.sanger.ac.uk>), les protéases sont réparties en 6 groupes selon la structure de leur site actif et le mécanisme catalytique qui en découle. C'est ainsi qu'on reconnaît les aspartyl, les séryl, les cystéyl, les thréonyl, les glutamyl et les métallo-protéases en plus de celles dont le mécanisme catalytique est inconnu. Elles sont ensuite groupées en familles, qui rassemblent des protéases homologues entre elles. En fonction de leurs relations phylogénétiques, les familles peuvent être divisées en sous-familles, ou encore groupées en clans. Les groupes catalytiques et les clans sont chacun désignés par une lettre majuscule, les familles par un chiffre, les sous-familles par une autre lettre majuscule.

1.3.3. Différentes origines des protéases

Les enzymes se retrouvent chez tous les êtres vivants, que ce soit chez les animaux, les végétaux ou les microorganismes, les enzymes y sont présentes sous plusieurs formes et types ; les protéases, les amylases, les lipases, les phytases, les cellulases, les hémicellulases, les mannases, les laccases, les lactases et bien d'autres (Olé et *al.*, 2002). Parmi les enzymes les protéases sont de loin les plus produites et les plus utilisées dans l'industrie de nos jours.

1.3.3.1. Protéases d'origine animale

Les protéases d'origine animale (porcine et bovine) sont principalement la trypsine, la chymotrypsine, issues du pancréas et la pepsine, issue de la muqueuse gastrique. Ces trois enzymes sont des endoprotéases présentant des spécificités différentes. La trypsine a une affinité pour la lysine et l'arginine, la chymotrypsine pour les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) et la pepsine principalement pour les acides aminés hydrophobes (Aldernissen, 1982), elle est l'enzyme d'origine animale la plus largement utilisée (Dufossé et *al.*, 1997).

Des études récentes ont permis aussi l'identification des protéases chez les helminthes *Schistosoma* sp ; *Fasciola* sp ; *Taenia* sp et *Haemonchus* sp, où elles apparaissent comme cibles potentielles majeures en thérapie et vaccination antiparasitaire (Trap et Boireau, 2000).

1.3.3.2. Protéases d'origine microbienne

Les protéases d'origine microbienne présentent plusieurs avantages par rapport aux enzymes d'origine animale ou végétale ; leurs types d'activité catalytique sont plus variés, leur stabilité face aux variations de température et de pH est meilleure. De ce fait, elles représentent aujourd'hui environ 90 % des enzymes produites pour les procédés industriels. (Denes, 2006). Elles peuvent être produites par les moisissures, les levures et les bactéries.

- **Protéases des moisissures**

Les protéases constituent le groupe d'enzymes les plus importantes ; elles peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc (Frazier, 1967). Ce groupe d'enzymes dispose de possibilités d'applications biotechnologiques très étendues (Ul-haq et *al.*, 2003).

- **Protéases des levures**

Certaines levures produisent des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement des genres *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*. *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, produit trois types de protéases ; une aspartyl-protéase, une sérine protéase et une métallo-protéase. L'activité protéolytique de ces genres est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (Boiron, 1996).

- **Protéases des bactéries**

Il s'agit essentiellement de la subtilisine ou subtilase, une protéase produite par *Bacillus subtilis* et quelques genres apparentés. Celle-ci est très stable et résiste bien à l'action des détergents (Calk et al., 2000). Les bactéries psychrotrophes du lait et en particulier, *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* produisent des métallo-protéases thermorésistantes utilisées pour la coagulation du lait (Cousin et al., 1982). Les protéases extracellulaires de *Streptococcus lactis* jouent un rôle très important dans l'affinage des fromages (Alais, 1975).

1.3.3.3. Protéases d'origine végétale

Les végétaux ont été l'objet de nombreuses recherches en vue d'isoler des enzymes protéolytiques, c'est le cas de la bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus*), la ficine issue du figuier (*Ficus glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001), la papaïne ; extraite du latex de la plante équatoriale (*Carica papaya*), qui, à elle seule, peut rompre des liaisons peptidiques que la trypsine et la pepsine rompent séparément. La kératinase, une autre protéase produite par quelques groupes de plantes (Rao et al., 1998). Il en est de même pour les préparations enzymatiques provenant de chardons, d'artichauts, de gaillets et de courges, etc (Alais, 1975).

2. Les protéases végétales

2.1. Généralités

La large diffusion des protéases chez les plantes, les animaux et les microorganismes montre qu'elles sont nécessaires pour les organismes vivants où elles jouent un rôle physiologique important dans divers processus biologiques (Rao et *al.*, 1998). Chez les plantes elles sont impliquées presque dans tous les aspects de croissance et du développement, la germination, les rythmes circadiens, la sénescence et la mort cellulaire programmée (Domsalla et Matthias, 2008).

2.2. Classification des protéases végétales

Les protéases végétales peuvent être classées en 4 groupes selon le type catalytique: les aspartyl-protéases, les séryl-protéases, les cystéyl-protéases et les métallo-protéases. Les protéases à serine et à cystéine sont du point de vue catalytique très différentes des protéases aspartiques et des métallo-protéases en ce que le nucléophile du site catalytique fait partie d'un acide aminé, alors qu'il y a une molécule d'eau activée dans les deux autres groupes (Bruno et *al.*, 2006). Quelques exemples de protéases végétales des différents types catalytiques sont présentés dans le tableau n° 5.

2.3. Différentes sources et rôles physiologiques des protéases végétales

Les enzymes protéolytiques jouent un rôle clé dans la physiologie des plantes. Non seulement elles maintiennent le pool de protéine de la cellule, mais aussi elles sont impliquées dans divers processus intra- et extracellulaires tels que la sénescence des feuilles, la dégradation des protéines de stockage de graines en germination, le développement et la maturation des fruits, les mécanismes de régulation et autres (Pande et *al.*, 2006). Les caractéristiques et le rôle physiologique des quatre groupes catalytiques de protéases sont présentés ci-dessous.

2.3.1. Aspartyl- protéases

Les aspartyl-protéases (APs) sont les plus actives à pH acide et sont spécifiquement inhibées par la pepstatine. Elles ont deux résidus aspartyl responsables de l'activité catalytique et montrent une spécificité préférentielle pour le clivage au niveau des liaisons peptidiques entre les résidus d'acides aminés hydrophobes (Domingos et *al.*, 2000).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Les (APs) végétales ont été caractérisées et purifiées à partir d'une grande variété d'espèces de plantes telles que les graines d'*Arabidopsis thaliana* (Mutlu et al., 1999), de chanvre (St. Angelo et al., 1970), de concombre et de courge (Polanowski et al., 1985), le riz (Doi et al., 1980) et l'orge (Sarkinen et al., 1992). Elles sont également présentes au niveau des fleurs de chardon (Verissimo et al., 1996), des feuilles de tomate (Rodrigo et al., 1989), des feuilles et des tubercules de pomme de terre (Guevara et al., 2004).

La présence de l'activité coagulante du lait a été rapportée chez diverses espèces de plantes appartenant à la famille des Asteraceae comme l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) (Llorente et al., 1997), le chardon-Marie (*Silybum marianum* L. Gaertn.) dont les fleurs et les feuilles étaient utilisées pour la production de fromages (Vairo-Cavalli et al., 2005), *Turcicum onopordum* (Tamer, 1993); (*Centaurea calcitrapa*), où la protéase, la cenproisine a été exprimée dans des quantités assez élevées dans les graines et les feuilles (Domingos et al., 2000).

Les (APs) peuvent être impliquées dans la digestion des insectes par les plantes carnivores (Garcia Martinez et Moreno, 1986), dans la dégradation des protéines végétales en réponse à des pathogènes, au cours des processus de développement (Asakura et al., 1997), dans les mécanismes de gestion des protéines de stockage (Doi et al., 1980), les réponses au stress (de Carvalho et al., 2001) et la sénescence (Bhalerao et al., 2003).

2.3.2. Cystéyl-protéases

Également appelées protéases à thiol, la majorité des cystéyl-protéases (CPs) végétales présentent un pH optimal entre 5,0 et 8,0 et des MM dans la gamme de 25-30 kDa (Dubey et al., 2007).

Plusieurs (CPs) ont été isolées de nombreuses plantes, comme la papaine, l'actinidine, la protéinase Ω , la chymopapaine et la bromélaïne. La plupart d'entre elles appartiennent à la famille de la papaine (Grudkowska et Zagdanska, 2004).

Les (CPs) sont impliquées dans la protéolyse pendant la sénescence (Noh et Amasino, 1999), dans la sécheresse (Jones et Mullet, 1995) et au cours de la mort cellulaire programmée (de Jong et al., 2000). Elles jouent également un rôle dans l'accumulation des protéines de réserve dans les graines et dans la mobilisation de protéine de stockage (Okamoto et Minamikawa, 1995). Ainsi, Elles participent à la fois aux processus anaboliques et cataboliques, et sont impliqués dans les voies de signalisation ainsi que la maturation des

protéines, la dégradation et la reconstruction des protéines en réponse à différentes stimulations externes et jouent aussi une fonction de ménage pour éliminer les protéines anormales ou mal repliées (Grudkowska et Zagdanska, 2004).

2.3.3. Séryl-protéases

Les séryl-protéases (SPs) représentent l'un des plus grands groupes d'enzymes protéolytiques ; elles sont répandues parmi tous les groupes taxonomiques ; les arbres ; les légumes et les herbes. Elles sont présentes dans presque toutes les parties des plantes, mais elles sont plus abondantes dans les fruits. (Rawlings et Barrett, 2004).

La plupart des (SPs) végétales caractérisées sont des protéases ATP-dépendantes chloroplastiques (Crafts- Brandner et al, 1996) et subtilisine-like (Beers et *al.*, 2000).

Les (SPs) agissent principalement comme des enzymes de dégradation. les subtilases végétales (subtilisine SP), cependant sont impliquées dans divers processus physiologiques, y compris la symbiose (Takeda et *al.*, 2007), l'infection des cellules végétales (Laplaze et *al.*, 2000) , la pathogénèse dans des plantes infectées par les virus (Tornerio et *al.*, 1997), la germination (Sutoh et *al.*, 1999), la signalisation (Dery et *al.*, 1998), la sénescence (Distefano et *al.*, 1999), la mort cellulaire programmée (Beers et *al.*, 2000) et la dégradation et traitement des protéines (Antao et Malcata, 2005).

2.3.4. Métallo-protéases

Les métallo-protéases (MPs) dépendent d'un cation divalent pour l'activité, le plus souvent le zinc, mais également du cobalt ou du manganèse (Robert et Vian, 2004). Elles sont les plus diversifiées en termes de structure et de fonction. Plus de 50 familles ont été identifiées dans 24 clans.

Les MPs végétales comprennent des exo et endoprotéases dans de nombreux compartiments cellulaires, avec une fonction de dégradation très spécifique. Seulement très peu de ces enzymes ont été caractérisés à ce jour (Schaller, 2004). Les leucine-aminopeptidases (LAPs) sont des (MPs) ubiquitaires, impliquées dans la régulation de la demi-vie des protéines dans les plantes (Varshavsky, 1996). Deux métallo-protéases chloroplastiques ont été très bien caractérisées, l'homologue chloroplaste de la métallo-protéase bactérienne ATP-dépendant (FtsH) (Ostersetzer et Adam, 1997) et la chloroplast-processing enzyme (Richter et Lamppa, 1998).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Les MPs ont également été localisées dans les feuilles de soja (Graham et *al.*, 1991). Elles sont impliquées dans la régulation de la demi-vie de la protéine dans les plantes, (Varshavsky, 1996) et sont exprimées dans les organes reproducteurs dans les conditions de stress ; le stress osmotique, les blessures et les infections pathogènes (Chao et *al.*, 1999; Gu et *al.*, 1999; Hildmann et *al.*, 1992; Pautot et *al.*, 1993, 2001; Schaller et *al.*, 1995).

Tableau n°5 : Quelques exemples de protéases végétales et leurs sources.

	Enzyme	N° EC	Source	Référence
Cystéyl-protéases	Papaine	EC 3.4.22.2	<i>Carica papaya</i>	(Kamphuis et <i>al.</i> , 1984)
	Chymopapaine	EC 3.4.22.6		(Jansen and Balls, 1941).
	Caricaine	EC 3.4.22.30		(Buttle et <i>al.</i> , 1989).
	glycyl endopeptidase	EC 3.4.22.25		(Pickersgill et <i>al.</i> , 1991)
	Bromelain (fruits)	EC 3.4.22.33	<i>Ananas comosus</i>	(Rowan et <i>al.</i> , 1988, 1990)
	Bromelain (tige)	EC 3.4.22.32		(Napper et <i>al.</i> , 1994)
	Ananaïne	EC 3.4.22.31		
	Ficine	EC 3.4.22.3	<i>Ficus glabrata</i>	(Sgarbieri et <i>al.</i> , 1964)
Aspartyl-protéases	Cardosines (A,B)	/	<i>C. cardunculus</i>	(Faro et <i>al.</i> , 1995 ;Veríssimo et <i>al.</i> , 1996)
	Cardosines (E,F,G,H)	/		(Sarmiento et al. 2009)
	Cyprosines		<i>C. cardunculus</i>	(Heimgartner et <i>al.</i> , 1990)
	Protéases aspartiques	/	<i>C. cardunculus</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. scolymus</i>	(Roseiro et <i>al.</i> , 2003)
Séryl-protéases	Cucumisine	EC 3.4.21.25	<i>C. melo</i>	(Yamagata et <i>al.</i> , 1994)
	Macluralisine	/	<i>Maclura pomifera</i>	(Rudenskaya et <i>al.</i> , 1995)
	Taraxilisine	/	<i>Taraxacum officinale</i>	(Rudenskaya et <i>al.</i> , 1998)
Métallo-protéases	Leucine aminopeptidases	/	Ubiquitaire	(Varshavsky, 1996).
	Homologue chloroplastique de la métalloprotéase bactérienne ATP - dépendant FtsH			(Ostersetzer et Adam, 1997)
	Chloroplast-processing enzyme			(Richter et Lamppa, 1998)

3. Application des protéases

3.1. Principales applications des protéases

Les protéases occupent la position la plus pertinente parmi les enzymes industrielles en raison de leurs applications répandues dans les détergents, les industries alimentaires et agricoles (fromagerie, boulangerie, brasserie, attendrissement de la viande, ...), la tannerie, les produits pharmaceutiques et le diagnostic médical, la photographie, etc. (Gupta et *al.*, 2002).

Les protéases sont également largement appliquées dans plusieurs secteurs de l'industrie et de la biotechnologie, ainsi que dans de nombreuses applications de recherche : production de fragments de Klenow, synthèse des peptides, digestion des protéines non désirées lors de la purification des acides nucléiques, utilisation dans les expériences de culture cellulaire et la dissociation des tissus, préparation de fragments d'anticorps recombinants pour la recherche, le diagnostic et la thérapie, exploration des relations structure-fonction par des études structurales, retrait des étiquettes d'affinité de protéines de fusion dans les techniques de protéines recombinantes, séquençage des peptides et digestion protéolytique des protéines en protéomique (János et *al.*, 2013) (voir figure n° 2).

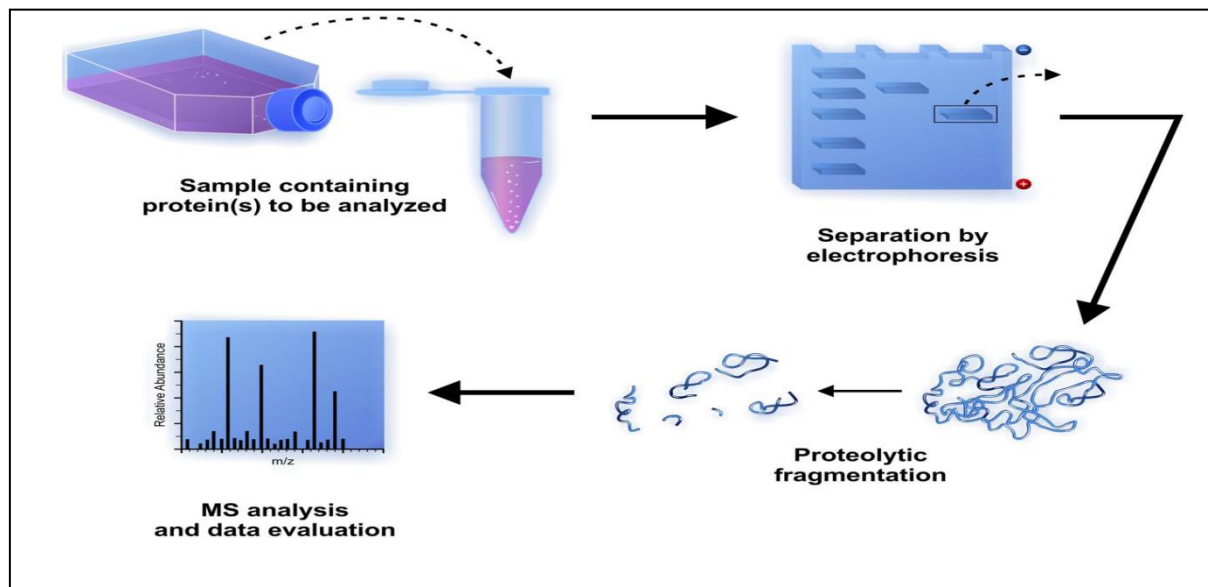


Figure n°2: Exemple d'application des protéases dans la protéomique. Etapes de l'analyse protéomique en utilisant la spectrométrie de masse après séparation et digestion dans le gel des protéines d'intérêts. (János et *al.*, 2013).

3.2. Application des protéases végétales

Les protéases végétales sont utilisées dans de nombreux secteurs, principalement dans les détergents, l'industrie alimentaire, la pharmacie et la médecine, la chimie organique et la biologie moléculaire.

3.2.1. Détergents

Les protéases utilisées dans l'industrie de détergents représentent 35% du marché mondial des enzymes industrielles (Cherry et Fidantsef, 2003). La papaïne est très utilisée dans l'industrie des détergents car elle est active dans une large plage de températures et en partie stable à pH alcalin (Beckhoven Van et *al.*, 1995).

3.2.2. Industrie laitière

Plusieurs extraits de plantes ont été utilisés depuis des siècles pour la coagulation du lait: *Galium verum*, *Withania coagulans*, *F. carica*, *C. cardunculus*, *C. scolymus*, *Carduus nutans*, *Cnicus benedictus*, *Drosera peltata*, *Datura stramonium*, *Pisum sativum*, *Lupinus hirsutus*, *Ricinus hirsutus*, *Crotalaria burhia*, *Rhazya stricta*, et *Streblus Asper* (Wallace, 1922). Toutefois, la grande majorité de ces extraits ne sont pas appropriés pour l'industrie du fromage en raison de leur haute activité protéolytique.

Les fromages fabriqués avec des coagulants végétaux peuvent être trouvés aussi bien dans le bassin méditerranéen, qu'en Afrique de l'Est et les pays d'Europe du Sud. L'Espagne et le Portugal possèdent la plus grande variété de fromages produits avec *Cynara* sp. comme coagulant ; ils sont généralement produits à une échelle artisanale.

Les différentes espèces de plantes permettant de produire des produits satisfaisants sont *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, et *Cynara scolymus* (Roseiro et *al.*, 2003). La cucumisine présente la même activité de coagulation du lait que les cystéyl-protéases telles que la papaïne (Uchikoba et Kaneda 1996). La lactucine de *Lactuca sativa*, présente des propriétés très compatibles avec le processus de coagulation du lait (Lo Piero et *al.*, 2002)

3.2.3. Transformation des aliments

La douceur et la tendresse de la viande sont les facteurs les plus importants qui affectent la satisfaction des consommateurs et de la perception du goût (Miller et *al.*, 2001). Seules cinq enzymes ont obtenu un statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*) par les agences fédérales américaines (CFR 1999, 2009), à savoir la papaïne, la ficine, la broméline, la protéase d'*Aspergillus oryzae* et la protéase de *Bacillus subtilis*. Deux autres protéases

végétales, l'actinidine (EC 3.4.22.14) et la zingibaine (EC 3.4.22.67), sont de bons candidats pour l'attendrissement de la viande (Naveena et *al.*, 2004; Sullivan et Calkins 2010).

3.2.4. Industrie boulangère

Les protéases sont utilisées dans les industries boulangères pour hydrolyser le gluten, afin de faciliter la préparation des pâtes. La bromélaïne a été utilisée pour obtenir de la farine de blé hypoallergénique en raison de sa capacité à briser le l'épitope IgE du gluténines du blé Gln-Gln-Gln-Pro-Pro (Tanabe et *al.*, 1996).

3.2.5. Pharmacie et médecine

Les protéases ont une application importante dans l'industrie pharmaceutique et en médecine. Les extraits de plantes à haute teneur en enzymes protéolytiques ont été utilisés dans la médecine traditionnelle pour le traitement du cancer (Targoni. et *al.*, 1999), pour les troubles de la digestion (Mello et *al.*, 2008), le gonflement et les problèmes d'immuno-modulation (Leipner et *al.*, 2001). Un bon exemple est la bromélaïne qui est capable d'empêcher les œdèmes, l'agrégation plaquettaire et la métastase en raison de sa capacité à modifier les structures de surface cellulaire par clivage du peptide. Plusieurs protéases végétales ont été testées dans différentes utilisations médicales :

- les extraits de *Carica papaya*, *Ficus sp*, et *Ananas comosus* pour le traitement de nématodes gastro-intestinales (Mueller et Mechler., 2005).
- La chymopapaïne pour traiter les hernies discales par chimionucléolyse, (Sagher et *al.*, 1995).
- La papaïne, la bromélaïne, et la ficine comme médicaments anti-inflammatoires pour remplacer les glucocorticoïdes et les anti-rhumatismales (Lotz-winter 1990),
- le mélange de protéases dérivées de tige d'ananas pour le traitement de l'arthrite (Brien et *al.*, 2004).
- Des mélanges d'enzymes protéolytiques contenant la trypsine, la chymotrypsine et la papaïne et la bromélaïne dans le traitement des cancers du sein, colorectal et le cancer du plasmacytome (Beuth 2008; Salas et *al.*, 2008).
- La papaïne et la bromélaïne ont également été utilisés pour le débridement de brûlure; (Rosenberg et *al.*, 2004).
- La bromélaïne dans l'identification d'anticorps (Rookard et *al.*, 2009).

- La papaïne et la ficine pour la préparation des fragments Fab à partir des immunoglobulines G (IgG) pour être employées dans des systèmes de dosage où la présence de la région Fc peut poser des problèmes (Mariani et *al.*, 1991; Boguslawski et *al.*, 1989.), (voir figure n°3).

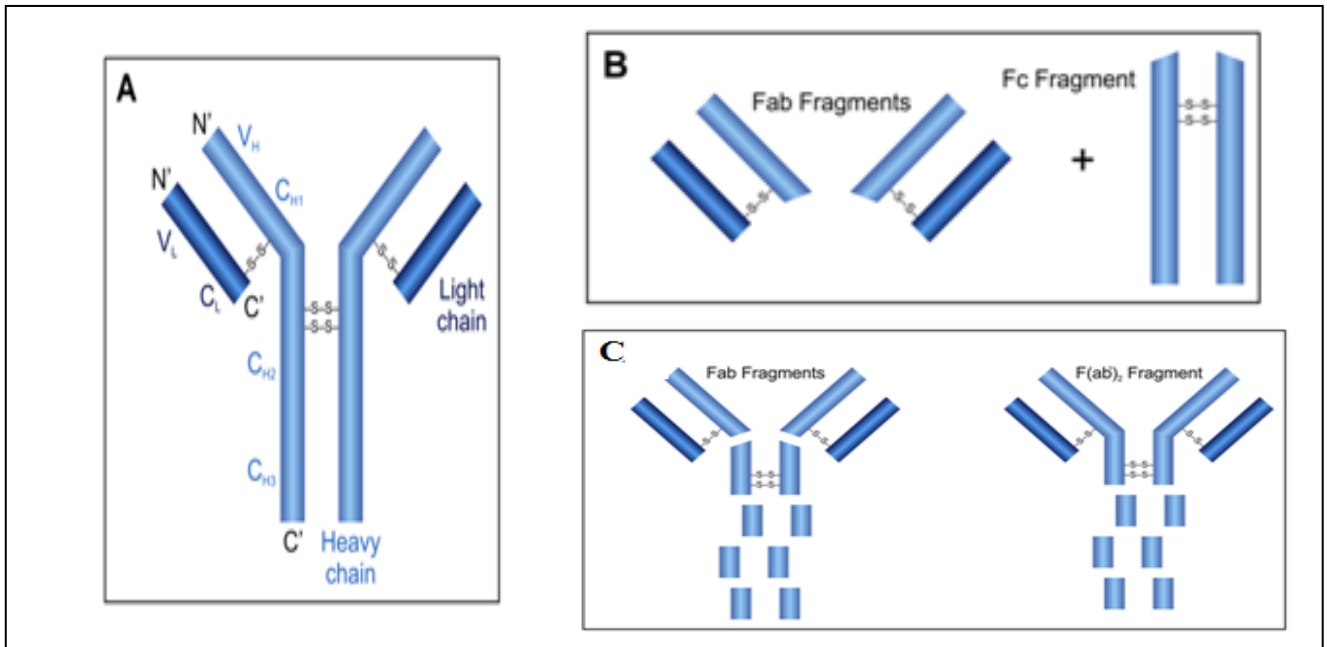


Figure n°3 : Structure des IgG (A) et les fragments libérés après digestion protéolytique par la papaïne (B), la pepsine (C) ou ficine (D). (János et *al.*, 2013)

3.2.6. Chimie organique

La ficine (Tai et *al.*, 1995; Sekizaki et *al.*, 2008), la papaïne et, dans une moindre mesure, la bromélaïne sont largement utilisées dans la synthèse des acides aminés et des peptides (Narai-Kanayama et *al.*, 2008; Lang et *al.*, 2009). En outre, la papaïne, la bromélaïne et autres protéases végétales ont donné de bons résultats pour la synthèse d'agents tensioactifs à base d'arginine (Morcelle et *al.*, 2009).

3.2.7. Biologie Moléculaire

Récemment, la protéase de *Cucumis melo* a été utilisée pour l'extraction d'ADN à partir de rognures d'ongles d'une manière efficace. L'utilisation de rognures d'ongles lorsque les circonstances ne permettent pas d'obtenir des échantillons de sang peut être une autre source d'ADN génomique qui peut être facilement stocké (Yoshida-Yamamoto et *al.* 2010).

4. Techniques de purification des protéines

La purification d'une enzyme est un processus qui passe par plusieurs étapes, habituellement les premières étapes sont des techniques peu spécifiques mais bien adaptées à la manipulation de gros volumes. Ensuite, au fur et à mesure des étapes, on utilise des techniques de plus en plus spécifiques qui sont souvent applicables à des préparations de volume réduit. En général, on commence par le broyage du matériel d'où on veut extraire la protéine (tissu animal, partie de plantes, bactéries, etc.), puis on effectue une précipitation différentielle au sulfate d'ammonium, enfin, on utilise le tamisage moléculaire qui permet de raffiner la pureté (Kamoun, 1975).

4.1. Méthodes d'extraction et de purification

4.1.1. Extraction

L'extraction peut se faire par plusieurs méthodes, le choc osmotique, la sonication, les enzymes lytiques ou par de nombreux types d'homogénéisateurs (type Dounce, type Potter-Elvehjem, presse Aminco- French). Le broyage sous azote liquide permet de libérer la plupart des protéases intra ou extracellulaire sans les dénaturer. C'est le cas de l'extraction des protéases végétales à partir de *Sylibum marianum* (Vairo Cavalli et al., 2005) et *Onopordum acanthium* (Brutti et al., 2012).

4.1.2. Précipitation

Une des étapes initiales des procédures de purification est souvent la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Très avide d'eau, il va priver les protéines de leurs possibilités d'établir des liaisons hydrogènes avec l'eau du solvant. Pour la plupart des protéines on peut trouver une concentration précipitante de ce sel neutre, généralement situés entre 0,5 et 3 M. Il faut toutefois faire suivre cette étape d'une dialyse ou d'une ultrafiltration pour éliminer le sulfate d'ammonium résiduel, la ou les protéines précipitées se redissolvent et retrouvent leurs fonctions (Hainque et al, 2008). Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéases de *Synergistes sp* (Kumar et al., 2008), *Mucor pusillus* (Nouani et al., 2009), *Aspergillus niger* (Kalpana et al., 2008).

4.1.3. Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Elle

concerne autant les macromolécules (protéines et ADN, polymères synthétiques, anticorps...) que des molécules biologiques plus petites comme les oligonucléotides et les peptides. Les membranes de dialyse (ou boudin) sont placées dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse (Hainque et *al.*, 2008).

4.1.4. Tamisage moléculaire

Le tamisage moléculaire ou exclusion moléculaire est une méthode chromatographique qui permet de séparer des molécules en fonction de leur taille et leur forme selon les principes de l'exclusion-diffusion. Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à purifier à travers des billes poreuses qui constituent le gel. Les molécules suffisamment petites pour passer par les pores des billes seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses pour entrer dans les billes progresseront plus rapidement en passant entre les billes (Hainque et *al.*, 2008).

4.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, ou SDS-PAGE, est une technique largement utilisée pour une séparation en milieu basique (pH 8,8) des mélanges de protéines basée sur leur taille (Laemmli, 1970). Elle est utilisée pour identifier la structure monomérique ou oligomérique, les isoenzymes et la MM et également pour vérifier la pureté des protéines au cours de la purification, en particulier des enzymes comme c'est le cas par exemple des cynarases A, B et C (Sidrach et *al.*, 2005).

Figure n°4 : Photos de la plante *Galactites tomentosa* ^(2,4).



5. La plante *Galactites tomentosa*

5.1. Nomenclature et classification

Galactites est un genre de plantes à fleurs de la famille des *Asteraceae*, appelées *galactites* ou galactitès. Son nom est dérivé du grec γάλακτος (lait). L'espèce la plus connue est *Galactites tomentosa* Moench. Ce genre a été décrit pour la première fois en 1794 par le botaniste allemand Conrad Moench (1744-1805).^(1,2)

Tableau n°6 : Classification de la plante *Galactites tomentosa*.

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Galactites</i>
Espèce	<i>Tomentosus</i>

5.2. Dénominations

- Nom scientifique valide : *Galactites tomentosa* Moench, 1794.⁽³⁾
- Synonymes scientifiques courants : *Galactites elegans* (All.) Nyman ex Soldano, 1991, *Centaurea galactites* All., etc.
- Autres synonymes: *Calcitrapa galactites*, *Carduus galactites*, *Carduus orgyalis*, *Carduus orientalis*, *Carduus pungens*, *Carduus strictus*, *Centaurea elegans*, *Cirsium galactites*, *Cirsium microcephalum*.
- Noms vulgaires Chardon laiteux, Galactite cotonneux ou Galactitès, Galactite tomenteuse et au masculin, Galactite tomenteux ou encore Chardon élégant.

5.3. Écologie et habitat

Plante annuelle surtout présente dans l'ouest du bassin méditerranéen mais aussi, moins fréquente, le long des côtes atlantiques. Elle apprécie les terrains sablonneux et secs, avec une légère préférence pour les sols acides. C'est un adventice des plantations d'oliviers ou des vignes⁽³⁾.

- Floraison : d'avril à août.
- Pollinisation : entomogame.
- Dissémination : anémochore.

5.4. Morphologie

À l'exception de la partie supérieure de la tige, toute la plante est très épineuse. Sa hauteur, très variable, va de 20 à 80 cm avec une tige très ramifiée en haut, tomenteuse. Les feuilles sont longues et étroites, lancéolées, à segments lancéolés terminés par des épines. Nervures et taches blanchâtres. Les capitules sont assez grands (3 cm de diamètre environ), avec un involucre formé de nombreuses bractées érigées, terminées par de longues épines, souvent entourées d'un voile arachnéen. Toutes les fleurs sont tubulées. Les parties extérieures sont grandes et rayonnantes, de couleur pourprée ou violacée (il existe aussi des spécimens à fleurs presque blanches), stériles, profondément découpées en cinq lanières rigides. Les parties intérieures, plus petites, sont hermaphrodites. Les fruits sont des akènes bruns et glabres, à peu près cylindriques, portant des aigrettes à soies plumeuses.⁽³⁾



MATERIELS
&
METHODES



1. Matériel biologique

La plante *Galactites tomoentosa* (ou chardon élégant) a été récoltée à Chaab Erssas (Constantine), dans l'enceinte de l'université, au mois d'Avril 2015.

2. Préparation de l'extrait brut

La localisation de la meilleure activité enzymatique dans la plante a été réalisées par deux extractions, l'une à partir des fleurs entières et l'autre, à partir des pétales uniquement.

2.1. Extrait brut des fleurs entières

Les fleurs de la plante sont découpées puis broyées sous azote liquide à l'aide d'un mortier. La poudre obtenue est solubilisée au 1:20 (w/v) dans du tampon phosphate 0,02M, pH 6,5. La solution est homogénéisée à l'aide d'un ultra-turax à froid pendant 4 min à une vitesse moyenne.

2.2. Extrait brut des pétales

Les pétales sont découpées et solubilisées au 1:20 (w/v) dans du tampon phosphate 0,02M pH 6,5 dans les mêmes conditions que les fleurs entières.

Dans les deux cas, le triton X-100 est ajouté à 1% à l'homogénat. Ce dernier est incubé pendant 24 h à 4 °C pour faciliter la libération des protéines endocellulaires, filtré sur de la gaze puis centrifugé (centrifugeuse Sigma 2-16KL) à une vitesse de 10000 rpm pendant 20 min. Les surnageant récupérés constituent l'extrait brut.

3. Purification partielle des protéases

La purification partielle de l'enzyme passe par plusieurs étapes; une précipitation fractionnée des protéines avec du sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), une dialyse et une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephadex G75.

3.1. Précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium

L'extrait brut est soumis à une précipitation fractionnée par (NH₄)₂SO₄ à des saturations de 30 et 60 % selon le mode opératoire suivant.

L'ammonium sulfate est ajouté à l'échantillon à une quantité calculée selon le tableau de saturation (voir annexe n°1) de manière à obtenir une concentration de 30%. Le mélange est agité modérément dans un bain de glace pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm

(centrifugeuse Sigma 2-16KL) pendant 30 min. Le surnageant est repris pour la phase de précipitation suivante, soit à 60%, selon la même méthode qu'avec la première concentration. Le culot est remis en solution dans un petit volume (5ml) de tampon phosphate (0,02M pH 6,5) pour être ensuite dialysé afin d'éliminer le sulfate d'ammonium résiduel.

3.2. Dialyse

➤ Préparation des membranes de dialyse

La membrane de cellophane est placée successivement dans un mélange d'éthanol-eau (v/v), une solution de bicarbonate de sodium (10 mM) et une solution diluée d'EDTA ; pendant 1 heure dans chacune de ces solutions, et enfin pendant 2 heures dans de l'eau distillée. Juste avant utilisation, la membrane est rincée avec le tampon contre lequel s'effectuera la dialyse.

La membrane ainsi préparée peut être conservée à 4°C pendant 2 à 3 jours dans de l'eau. Si le délai de conservation est plus long, il faut ajouter un antimicrobien tel que l'azide de sodium.

➤ Mode opératoire

Les fractions obtenues après chaque précipitation sont dialysées dans les membranes de dialyse préalablement préparées, contre un grand volume de tampon du tampon phosphate (0,02M, pH 6,5) sous agitation et à froid (4° C) pendant 24 h.

Après chaque dialyse, l'activité enzymatique et la concentration en protéines totales sont déterminées.

3.3. Exclusion moléculaire sur gel Sephadex G75

➤ Préparation de la colonne

La chromatographie est réalisée dans une colonne en verre (Pharmacia Fine Chemicals) de dimension (60 cm x 1,5 cm) en utilisant le gel Sephadex G-75 (SIGMA) dont le domaine de fractionnement est de 300 à 80000 Da. Ce dernier est préalablement gonflé dans du tampon (citrate acétate 0,05 M, pH 5,5 pour l'échantillon des fleurs entières et tampon phosphate 0,02M pH 7 pour l'échantillon des pétales), pendant 24h à température ambiante puis dégazé à l'aide d'une trompe à vide. Le volume mort est déterminé par utilisation de Bleu Dextran.

➔ **Mode opératoire**

Un volume de 2,5 ml d'extrait enzymatique est déposé délicatement à la surface du gel. L'élution est réalisée par les mêmes tampons utilisés dans la préparation du gel, à un débit d'environ 1ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique (GILSON). Les éluats sont recueillis dans un collecteur de fraction (GILSON) à raison de 2,5 ml/tube. La concentration des protéines est mesurée à 280 nm. L'activité enzymatique et les protéines totales de chaque fraction sont mesurées selon les méthodes décrites plus bas.

4. Méthodes de dosage

Les différentes étapes de purification doivent être suivies de près. Pour cela, la concentration en protéines totales et l'activité enzymatique sont dosées après chaque étape.

4.1. Dosage de l'activité protéolytique

➔ **Principe**

Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé selon la méthode d'Anson (1938) ; il est basé sur l'estimation de la quantité des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une ou d'un mélange de protéases. La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du T.C.A, qui entraîne une précipitation des protéines non hydrolysées ; ces dernières sont éliminées par centrifugation et/ou filtration.

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma) en utilisant la caséine comme substrat dans les conditions adaptées par Mechakra et *al.* (1999).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard. Une unité de protéase (U) correspond à l'équivalent de 1 µg de tyrosine libéré en 1 h de digestion par 1 ml d'extrait enzymatique avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine.

➔ **Solutions utilisées**

- Caséine 2,5 % dissoute dans citrate de sodium 0,02 M.
- Solutions tampon phosphate 0,02M, pH 6,5.
- Solution mère de la tyrosine à 100 µl/ml.
- Solution de l'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.
- Solution de Na₂CO₃ à 2% dans du NaOH 0,1 N.
- Réactif de folin-Ciocalteu dilué au ½ dans de l'eau distillé.

➔ **Mode opératoire**

Le dosage de l'activité enzymatique est réalisé en deux étapes ; la réaction enzymatique puis le dosage colorimétrique.

1^{ère} étape : Réaction enzymatique. Le mélange réactionnel est constitué de

- ⇒ 1 ml de l'extrait brut.
- ⇒ 1,5ml du tampon phosphate 0,02M, pH 6,5.
- ⇒ 2,5ml de caséine à 2,5% dissoute dans du citrate de sodium 0,02M.

Le mélange est agité puis incubé pendant 1 heure au bain Marie à 40°C. La réaction est arrêtée par ajout de 5 ml de T.C.A à 4% et laissé à température ambiante pendant 10 min puis filtré. Le filtrat constitue la solution contenant le produit de la réaction (la tyrosine).

2^{ème} étape : Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique

Le dosage colorimétrique est réalisé par mélange de 0,5 ml de Filtrat avec 2,5 ml Na₂CO₃. Le mélange est agité et laissé stabiliser à température ambiante pendant 10 min. les composés azotés non protéiques sont dosés par ajout de 0,25 ml du folin à 50%. Après incubation à température ambiante pendant 30 min la lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm au spectrophotomètre.

➔ **Gamme d'étalonnage de la Tyrosine**

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de tyrosine avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml selon le tableau suivant :

Dilution	0	1/5	2/5	3/5	4/5	1
Concentration en tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (µl)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µl)	500	400	300	200	100	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Le mélange est agité et laissé stabiliser pendant 10 min						
Folin dilué à 1/2 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
La solution est mélangée énergiquement et laissée à l'ombre pendant 30 min.						
La lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm						

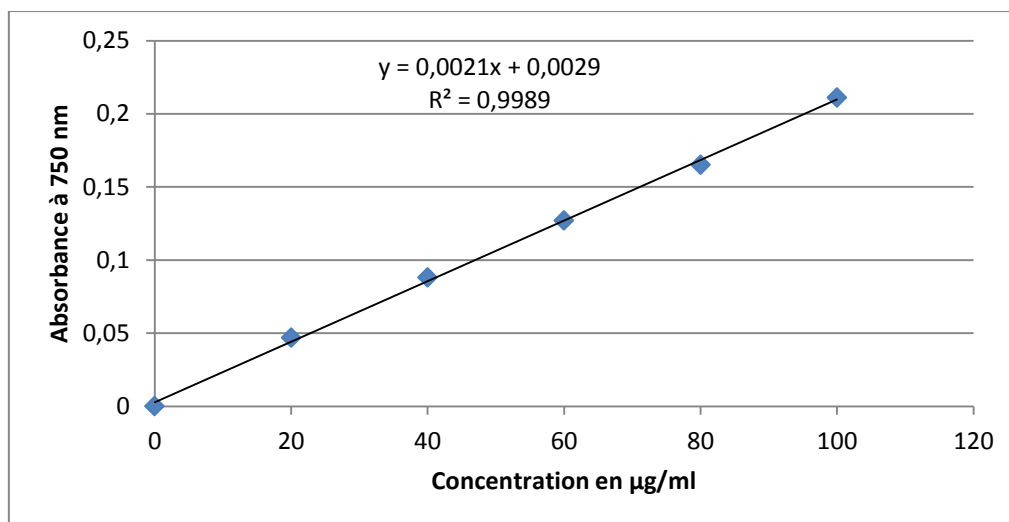


Figure n°5 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine (100 µl/ml).

4.2. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry (1951) « Adaptée »

➔ Principe

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions ; La première est la réaction de Biuret, où la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique dans la protéine ; La deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu qui réagit sur la tyrosine et la tryptophane présentes dans les protéines et se réduit en un complexe bleu. Cela engendre une réduction par perte d'un à trois atomes d'oxygène et c'est la fixation de cuivre par chélation qui faciliterait le transfert d'électrons vers ce réactif.

➔ Solutions utilisées

- Solution A : Na_2CO_3 à 2% dans du NaOH (0,1N).
- Solution B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 1% dans l'eau distillée.
- Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans de l'eau distillée.
- Solution M : 100 ml de solution A + 1 ml solution B + 1 ml solution C.
- Réactif de folin-ciocalteu dilué au $\frac{1}{2}$ dans de l'eau distillée.
- Solution mère de B.S.A (Sérum Albumine Bovine) 0,1 mg/ml.

➔ Mode opératoire

La réaction enzymatique est préparée par le mélange de 1ml d'extrait enzymatique et de 5 ml de la solution M.

Après agitation et incubation à température ambiante pendant 10 min, 0,5ml de Folin-Ciocalteu dilué à $\frac{1}{2}$ est ajouté. La solution est agitée de nouveau puis incubée pendant 30 min

à l'ombre à température ambiante. La lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm au spectrophotomètre.

➔ **Gamme d'étalonnage de la BSA**

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de B.S.A (Sigma Aldrich) avec des concentrations comprises entre 0 et 0,1 mg/ml selon le tableau suivant :

Dilution	0	1/10	2/10	3/10	4/10	1/2
Concentration en BSA (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de BSA (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0
Solution M (ml)	5	5	5	5	5	5
Le mélange est agité et laissé stabiliser pendant 10 min						
Folin dilué à 1/2 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
La solution est mélangée énergiquement et laissée à l'ombre pendant 30 min.						
La lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm						

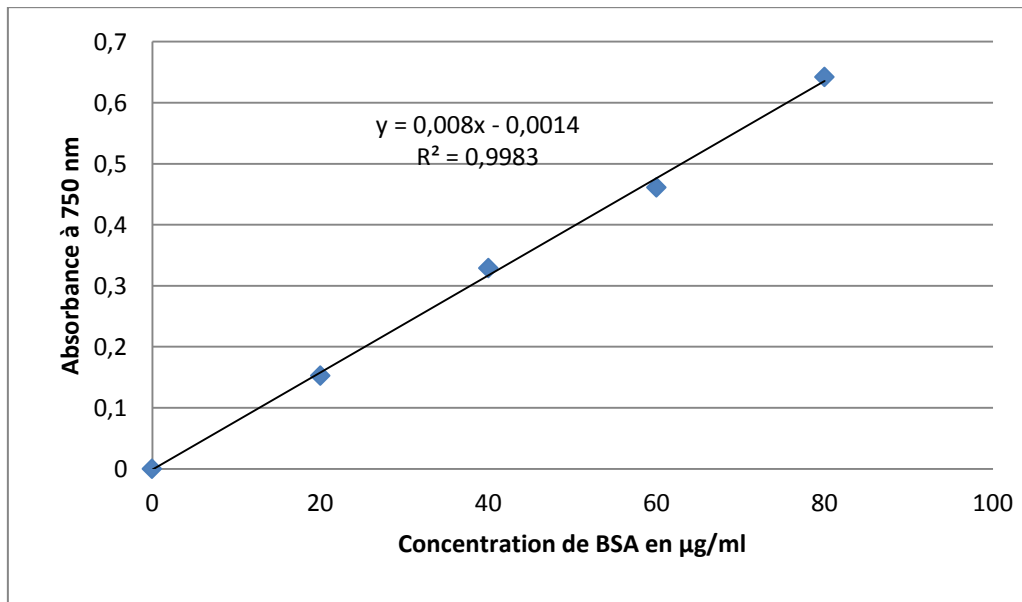


Figure n°6 : Courbe d'étalonnage de la BSA (0,1 mg/ml).

5. paramètres de purification

Trois facteurs de purification sont déterminés afin d'évaluer les différentes étapes de la purification : l'activité spécifique, le rendement et le taux de purification.

- **L'activité spécifique (AS)**

AS (U/mg) = Activité totale (U) / Protéines totales (mg).

- **Le rendement en activité (R)**

R(%) = (Activité totale de l'étape de purification/Activité totale de l'étape initiale) x 100.

- **Le taux de purification (TP)**

TP = Activité spécifique de l'étape de purification/Activité spécifique de l'étape initiale.

6. Effet du pH sur l'activité de la protéase purifiée

L'effet du pH sur l'activité protéolytique est étudié en mesurant l'activité en fonction de pH dans l'intervalle de 3 et 9 (avec un incrément de 0,5) en présence de deux substrats différents ; la caséine (MERCK) dans l'intervalle de pH (3 à 6,5) et l'hémoglobine (ACROS Organics) dénaturée dans l'intervalle de pH (4,5 à 9).

L'hémoglobine dénaturée est préparée selon la méthode d'Anson (Anson, 1938) modifiée par Vairo Cavalli et *al.* (2005). Une solution d'hémoglobine à 2,5% est préparée en solubilisant 2,5 g d'hémoglobine dans 100 ml d'eau distillé avec agitation. Un volume 20 ml de la solution est mélangé avec 2,5ml d'HCl 0,6, agité pendant 30 min puis filtré. Le pH est ajusté à 4 par NaOH 0,5. (Brutti et *al.*, 2012).

7. Détermination des paramètres cinétiques

L'activité de l'enzyme est mesurée à pH optimal (6,8) en fonction de la concentration du substrat, dans ce cas la caséine soluble, de 0 à 2,5 % avec un intervalle de variation de 0,5%. Deux courbes sont tracées, la première, la courbe de Michaelis. Elle permet de déterminer le type de la cinétique (michaelienne ou allostérique) et la deuxième, de Lineweaver-Burk, de calculer les paramètres cinétiques K_M et V_m .

8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Une électrophorèse est réalisée afin de vérifier la pureté de l'enzyme. Les fractions issues de la purification de l'extrait brut des fleurs entières ainsi que celles de l'extrait brut des pétales sont séparées sur le gel de polyacrylamide constitué d'un gel de séparation à 15% et d'un gel de concentration à 5%, dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli (1970).

Après migration à 88 mV et à une intensité constante de 40 mA, le gel est démoulé et les protéines sont révélées par une solution de bleu de Coomassie (BBC R-250) suivie par la décoloration complète du gel pendant une nuit par une solution de méthanol, acide acétique et d'eau, les bandes colorées en bleu correspondent aux protéines.



RESULTATS

&

DISSCUSSION



Dans ce chapitre, sont présentés les résultats de l'étude des activités protéolytiques de la plante *Galactites tomentosa* à partir de deux types d'échantillons : les fleurs entières et les pétales. La purification est réalisée en trois étapes : précipitation par le sulfate d'ammonium, dialyse et chromatographie sur gel Sephadex G-75.

1. Détermination du profil des activités protéolytiques en fonction du pH

Avant de procéder aux étapes de purification, les différentes formes de protéases contenues dans les fleurs entières de plante *Galactites tomentosa* sont caractérisées par la mesure de l'activité enzymatique de l'extrait brut à des pH entre 3 à 8 avec un écart de 0,5. Les résultats sont présentés dans la figure n°7.

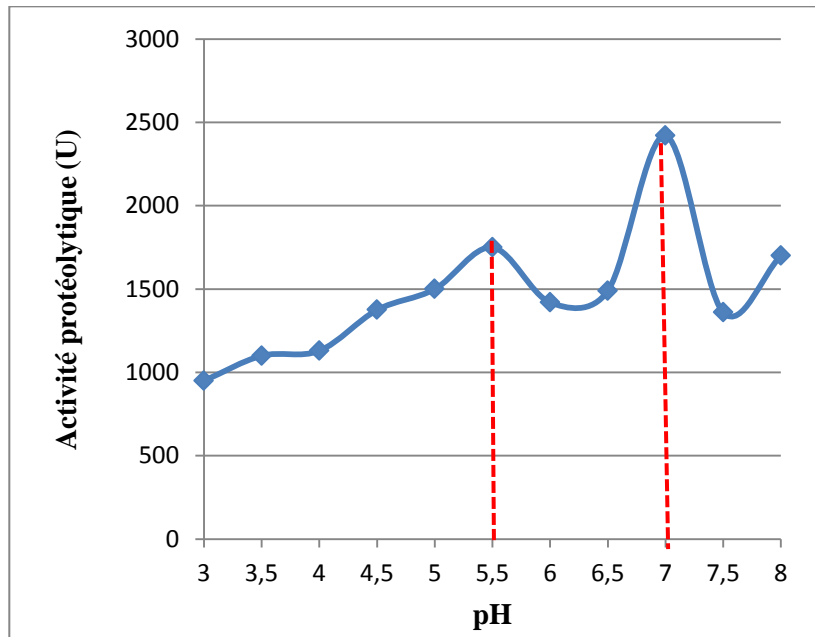


Figure n°7: Effet du pH sur l'activité protéolytique dans l'extrait brut des fleurs entières de la plante *Galactites tomentosa*.

La courbe montre deux pics d'activité, le premier à pH 5,5 et le second à pH 7. Ce dernier représente l'activité majeure. Cette plante produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 5,5 et l'autre à un pH optimum de 7. Le pH 5,5 se rapproche de celui rapporté par Benchiheub et al (2014) qui a mentionné un pH de 5,0 pour la protéase extraite des fleurs de *Scolymus maculatus*. Le pH 7 est similaire à celui rapporté par Chazarra et al.(2007) pour la protéase de *Cynara scolymus*, et par El-Sayed et al (2013) pour la protéase extraite à partir de *Brassica napus*.

2. Purification de la protéase acide à partir des fleurs entières

2.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse

La précipitation au sulfate d'ammonium élimine une grande partie des molécules non protéiques présentes dans l'extrait des fleurs entières de *Galactites tomentosa*, en particulier les pigments. La précipitation fractionnée du broyat permet de récupérer 6109 U à 30% et 15 387 U à 60% de saturation, soit 21,92 et 55,23% simultanément de l'activité totale (Tableau n°7). D'après les résultats les meilleures activités protéolytiques ont été obtenues dans la fraction 60%. Le même résultat a été obtenu par Gayatri et al (2014) pour la protéase extraite à partir de *Cucumis melo var agrestis*. L'extrait à 60% est donc retenu pour la suite du travail.

2.2. Chromatographie d'exclusion sur gel Sephadex G75

Le profil d'élution de l'extrait de fleur entière récupéré après précipitation à 60% et dialyse sur gel Sephadex G75 est présenté en figure n°8.

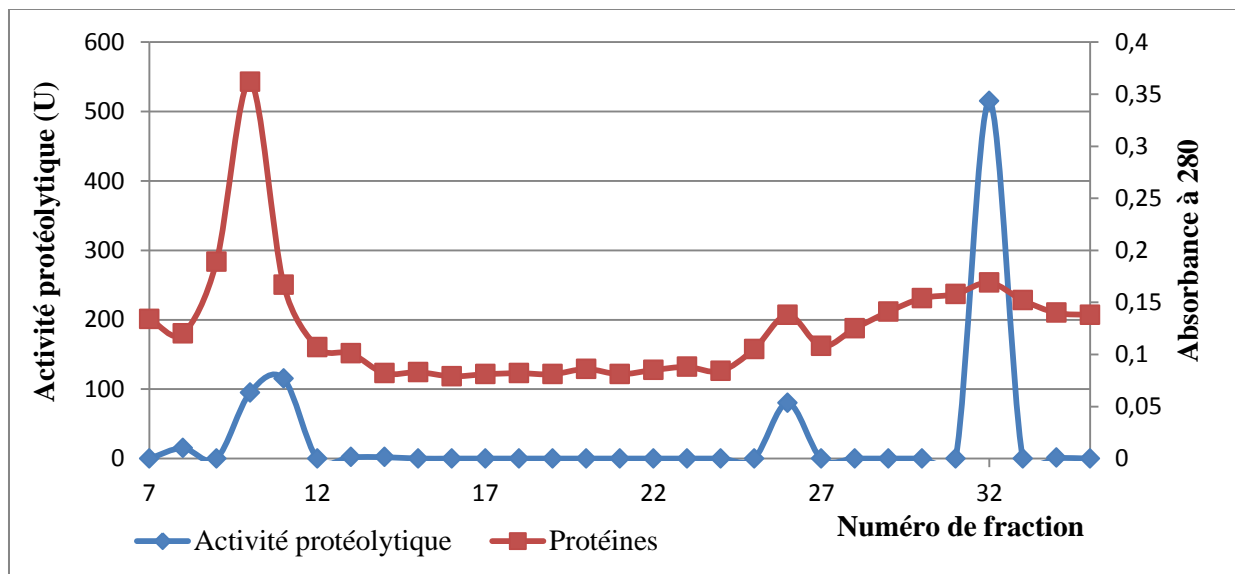


Figure n°8 : Profil d'élution sur gel Sephadex G75 par le tampon citrate pH 5,5 de la fraction précipitée à 60% obtenue à partir des fleurs entières *Galactites tomentosa*.

Ce profil fait apparaître deux pics indiquant l'existence de deux fractions, l'une mineure de MM élevée avec une activité de 1380 U (fraction n° 26) et l'autre majeure, de MM plus faible avec une activité de 6180 U (fraction n°32).

Cette dernière est séparée avec un rendement de 22,18% et un taux de purification de 20,18. L'activité de la fraction de faible MM représente environ 4,5 fois celle de MM plus

élevée. Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Benchiheb (2015) pour la protéase de *Scolymus hispanicus* purifiée avec un rendement de 23,65% et un taux de purification de 25,14 et par Kumar et al (2005) pour la protéase de *Rhizopus oryzae*.

2.3. Tableau de purification

Les résultats de la purification sont résumés dans le tableau n°7. La précipitation par le sulfate d'ammonium a permis d'obtenir une activité spécifique de 2,5 à 30% et de 9 à 60% avec des rendements d'activité de 21,92% pour la fraction 30% et de 55,23% pour la fraction 60%. Après la filtration sur gel, les rendements sont de 4,95% pour le premier pic et de 22,18% pour le deuxième pic.

Le tableau n°7 fait apparaître une augmentation du facteur de purification au fur et à mesure des étapes, ce qui reflète l'approche vers l'obtention d'une enzyme pure et ce, malgré une diminution du rendement liée à une perte de matériel biologique à chaque étape de purification. Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par Gayatri et al (2014) qui a purifié la protéase à partir des graines de *Cucumis melo var agrestis*.

Tableau 7: Tableau de purification de la protéase acide extraite des fleurs entières de la plante *Galactites tomentosa*

Etape	Volume totale (ml)	Activité protéolytique totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification
Extrait enzymatique brut	25	27860	110,25	252,7	100%	1
Précipité à 30%	6	6109	9,30	656,88	21,92%	2,59
Précipité à 60%	6,2	15387,2	6,16	2497,9	55,23%	4,9
Gel filtration pic 1	2,5	1380	1	1380	4,95%	5,46
Gel filtration pic 2	2,5	6180	1,2	5150	22,18%	20,18

3. Purification de la protéase neutre extraite des pétales

3.1. Précipitation par sulfate d'ammonium et dialyse

La précipitation du broyat des pétales de *Galactites tomentosa* par le sulfate d'ammonium permet de récupérer 9102,8 U à 30% et 56982 U à 60%, soit 11,40% et 71,40% de l'activité totale, simultanément. Le précipité à 60 % dialysé est donc retenu pour l'étape suivante de la purification (tableau n°8).

3.2. Chromatographie d'exclusion sur gel Séphadex G75

Le profil d'élution sur gel Sephadex G75 de l'extrait des pétales récupéré après précipitation à 60% et dialyse, est présenté dans la figure n°9.

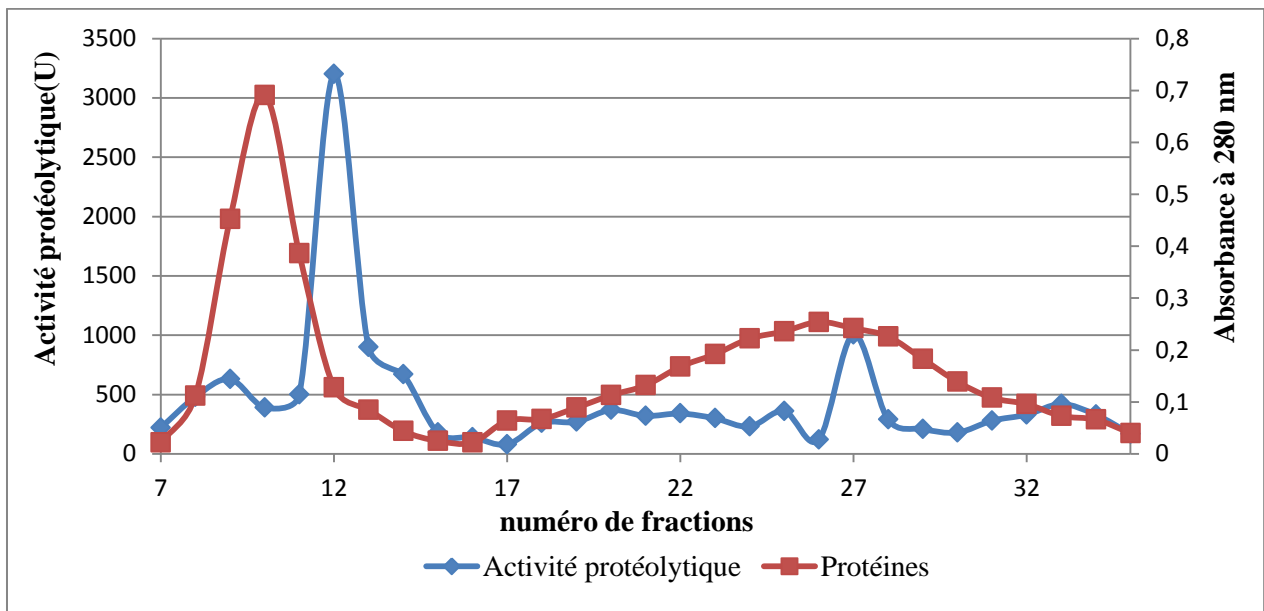


Figure n°9: Profil d'élution sur gel Sephadex G75 par tampon phosphate pH 7 de la fraction précipité à 60% obtenue à partir des fleurs entières de *Galactite tomentosa*.

Le profil d'élution fait apparaître deux pics indiquant l'existence de deux fractions de protéase, une majeure de MM élevée avec une activité de 27136 U correspondant à la fraction n° 11 et l'autre mineure, de MM plus faible avec une activité de 6400 U correspondant à la fraction n°27. L'activité de la fraction de MM élevée représente environ 4,24 fois celle de la seconde.

Le rendement de l'activité majeure est de 34%, proche de celui obtenu par Hashim et al.(2011) pour la protéase extraite de gingembre avec un rendement de 34.9%.

3.3. Tableau de purification

Les résultats de la purification de l'enzyme des pétales sont résumés dans le tableau n°8. La précipitation par le sulfate d'ammonium à 60% a permis d'obtenir une activité spécifique de 956,17 U (2,7 fois celle de l'extrait brut) et de 10267,02 U à 30% (29,5 fois plus que dans l'extrait brut) à 60%.

Les rendements de l'activité de la protéase après précipitation sont de 11,40% pour la fraction 30% et de 71,40% pour la fraction 60%. Après gel filtration, le rendement est de 34% pour le premier pic et de 8% pour le deuxième pic.

Tableau n°8 : Tableau de purification de la protéase neutre extraite des pétales de la plante *Galactites tomentosa*.

Etape	Volume totale	Activité protéolytique totale (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de Purification
Extrait enzymatique brut	30	79800	229,87	347,14	100%	1
Précipité à 30%	6,4	9102,8	9,52	956,17	11,40%	2,75
Précipité à 60%	5,9	56 982	5,55	10267,02	71,40%	29,5
Gel filtration pic 1	2,5	27 136	2,64	10278,7	34%	30
Gel filtration pic 2	2,5	6400	4,48	1428,57	8,02%	4,11

4. Comparaison des résultats de la purification entre les fleurs entières et les pétales

La comparaison entre les extractions des fleurs entières et des pétales montre que l'activité protéolytique de *Galactites tomentosa* est localisée essentiellement au niveau des pétales. En effet, les activités protéolytiques de l'extrait brut sont de 42,39% pour les fleurs entières et de **57,60 %** pour les pétales (tableau n°9). Donc l'activité est concentré dans les pétales.

Tableau n°9 : Comparaison entre les activités totales des fleurs entières et des pétales de *Galactites tomentosa*.

Etape	Activités de la protéase de fleurs entières		Activité de la protéase des pétales	
	AT (U./g)	%	AT (U./g)	%
Extrait brut	896,68	42,39	1218,32	57,60
Précipité à 30%	196,62	-	138,97	-
Précipité à 60%	495,24	-	869,95	-
Chromatographie pic 1	44,41	-	414,2	-
Chromatographie pic 2	198,90	-	97,70	-

Les résultats des rendements et Taux de purification des fleurs entières et les pétales sont présentés dans tableau n°10. Ainsi, les pétales contiennent deux-tiers de l'activité protéolytique, ces résultats sont similaires à celles obtenues pour d'autres plantes de la même famille que *Galactites tomentosa* (Asteraceae). En effet, les activités protéolytiques sont concentrées au niveau des pétales chez *Silybum marianum* (Kassa-Laouar, 2006 et Vairo et al, 2008), *Cynara cardunculus* (Verissimo et al., 1996) et *Cynara scolymus* (Sidarch et al ; 2005).

Tableau n°10 : Comparaison entre les rendements et les taux de purification de la protéase des fleurs entières et des pétales de *Galactites tomentosa*.

Etape	Rendements des activités des fleurs entières /g	Rendements des activités des pétales/g
Extrait brut	100	100
Précipité à 30%	0,70	0,17
Précipité à 60%	1,77	1,90
Chromatographie pic 1	0,16	0,45
Chromatographie pic 2	0,71	0,12
	Taux de purification des extraits de fleurs entières /g	Taux de purification des extraits de pétales/g
Extrait brut	1	1
Précipité à30%	0,07	0,04
Précipité à60%	0,31	0,45
Chromatographie pic 1	0,17	0,46
Chromatographie pic 2	0,65	0,06

5. Etude de quelques propriétés de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales

5.1. Effet du pH sur l'activité protéolytique

Les résultats de l'étude de l'effet du pH sur l'activité de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante *Galactites tomentosa* sont présentés dans la figure n°10. La protéase présente un pH optimum de 6,8 proches de celui rapporté par Subathra et al (2012) pour la protéase extraite à partir de la plante *Azadirachta indica* qui a donné un pH d'activité optimal de 6,5.

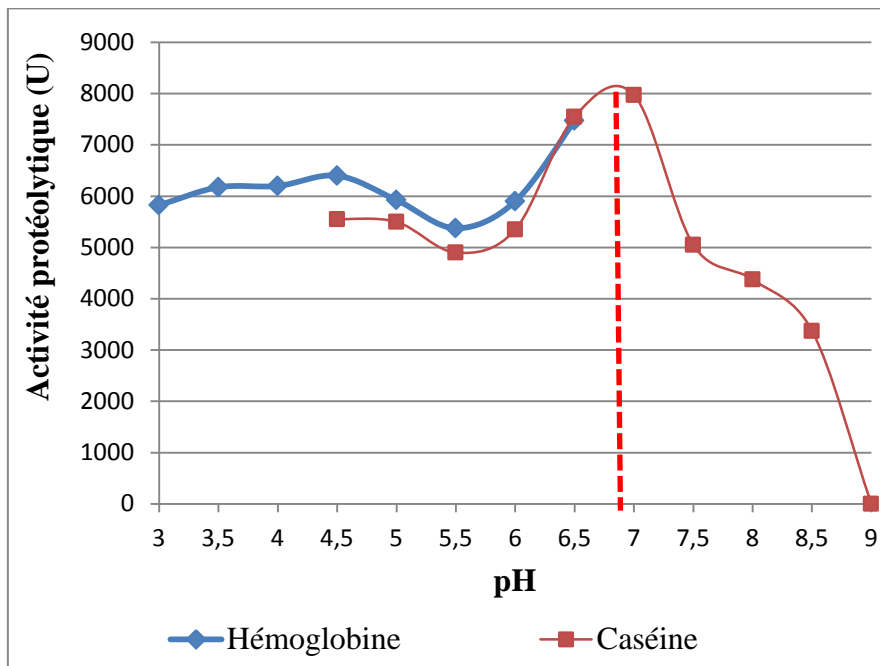


Figure n°10 : Etude de l'effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante *Galactites tomentosa* (substrat hémoglobine ; substrat caséine)

5.2. Paramètres cinétiques

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique est présenté dans la figure n°11. Celle-ci montre une courbe de forme hyperbolique, donc la protéase produite présente une cinétique Michelienne. Ceci indique que la protéase neutre de *Galactites tomentosa* possède une structure monomérique.

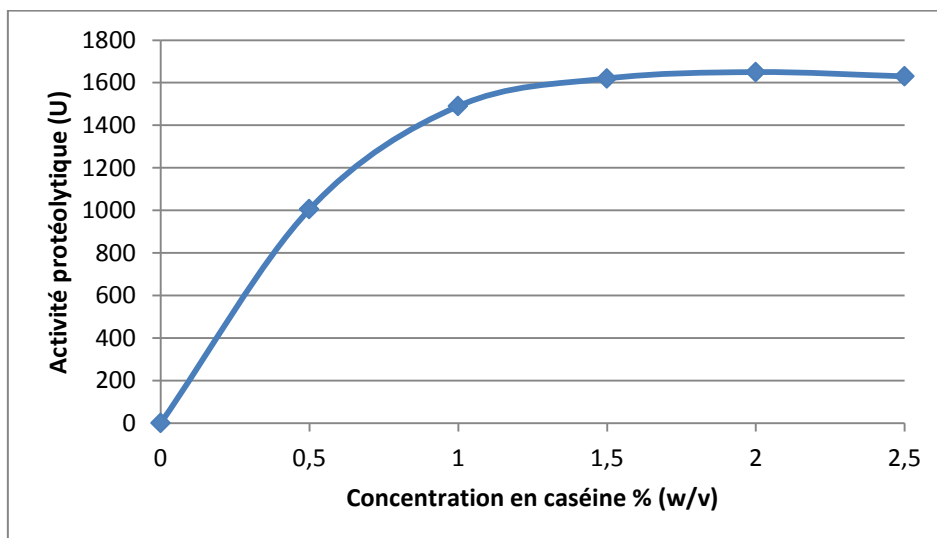


Figure n°11 : Représentation graphique selon la méthode de Michaelis de l'effet de la concentration de la caséine sur l'activité protéolytique de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante *Galactites tomentosa*.

La linéarisation par la représentation de Lineweaver-Burk a permis de calculer les paramètres cinétiques de l'enzyme ; un V_m de 1667 U et une constante de Michaelis K_M de 0,55 g/ml (figure n°12).

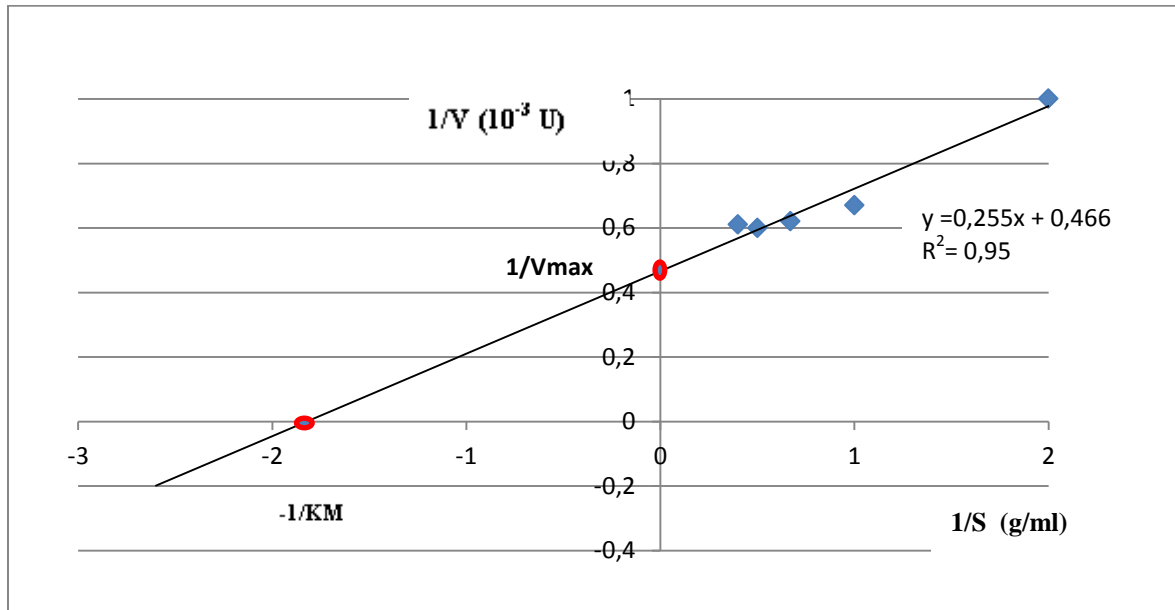


Figure n°12 : Représentation graphique selon la méthode de Lineweaver-Burk de l'effet de la concentration de la caséine sur l'activité protéolytique de la protéase partiellement purifiée à partir des pétales de la plante *Galactites tomentosa*.

La forme de la cinétique de la protéase neutre de *Galactites tomentosa* est similaire à celle rapportée pour la protéase de *Cynara cardunculus* (Verissimo et al., 1996 ; Silva et al., 2003) qui a présenté également une cinétique Michelienne, au contraire de la protéase de *Silybum marianum* qui a montré une cinétique allostérique (Kassa-Laouar, 2006).

6. Etude électrophorétique sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE)

Les résultats de l'étude par SDS-PAGE des protéines des extraits des fleurs entières et des pétales, après précipitation et après gel filtration sont présentés dans la figure n°13.

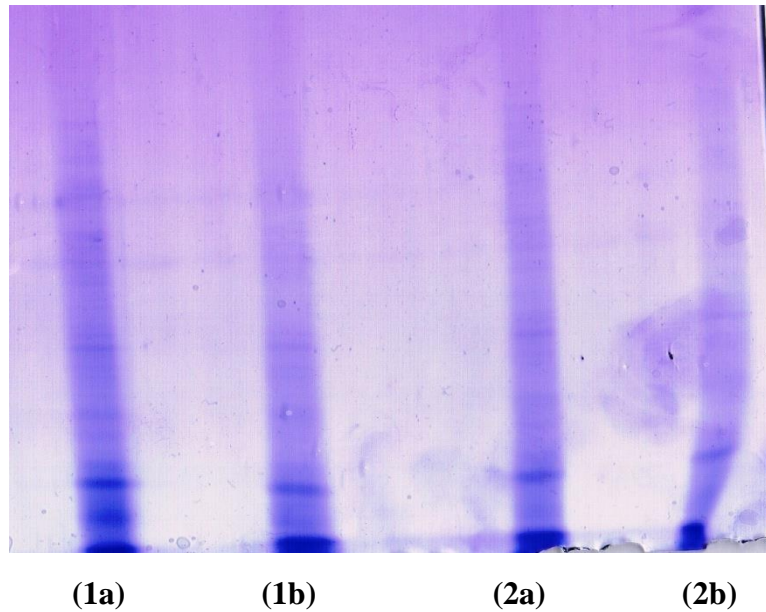


Figure 13 : Profil électrophorétique de la protéase neutre de *Galactites tomentosa*.
(1a) du précipité 60% (fleurs entières) ;(1b) de la fraction du pic 2 tube 32 (fleurs entières) ; (2a) de la fraction 60 % d'extraction (pétales) ;(2b) de la fraction de chromatographie pic 1 tube 11 (pétales)

Les électrophorégrammes obtenus par SDS-PAGE confirment le bon déroulement des étapes de la purification. En effet, on observe une diminution des bandes après chromatographie sur gel-filtration par rapport à la précipitation. Ceci s'observe par un éclaircissement des électrophorégrammes, ce qui indique une élimination de plusieurs protéines par la chromatographie sur Sephadex G75. Cela confirme l'efficacité du protocole de purification choisi, et particulièrement l'utilisation du gel Sephadex G75. Ces résultats sont similaires à ceux de la protéase acide de *Scolymus maculatus* purifiée sur gel Sephadex G100 (Benchiheb, 2015).



CONCLUSION



Conclusion générale

Les protéases occupent la position la plus pertinente parmi les enzymes industrielles en raison de leurs nombreuses applications. Leur part sur le marché mondial des enzymes industrielles est estimé en 2018 à 7,1 milliards de dollars.

L'objectif de ce travail est la caractérisation et l'identification de protéases d'origine végétale ayant un intérêt technologique et pharmaceutique. Pour cela, les activités protéolytiques ont été extraites de deux types d'échantillons, les fleurs entières et les pétales, d'un chardon méditerranéen de la famille des *Asteraceae*, *Galactites tomentosa* (*Cardos prateados*).

Le profil des activités protéolytiques déterminé en fonction du pH a permis de caractériser deux formes différentes de protéases dans les fleurs de *Galactites tomentosa* ; cette plante produit donc au moins deux protéases, l'une acide à pH 5,5 et l'autre neutre à pH 7.

La précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium à 30% puis 60% suivie de dialyse a permis de récupérer les meilleurs rendement à 60% de saturation ; plus de 55% de l'activité dans la fleur entière et plus de 71 % dans les pétales pour des taux de purification de 4,9 et 29,5. Ces résultats indiquent une localisation des activités protéolytiques essentiellement au niveau des pétales. Le tamisage moléculaire sur Sephadex G75 a entraîné l'obtention de deux pics d'activité, indiquant l'existence de deux formes moléculaires des protéases de la plante, l'une de MM élevée et l'autre de MM plus faible ; cette dernière est la forme majeure.

L'étude de l'effet du pH sur l'activité de la protéase purifiée a donné un pH optimum de 6,8. L'étude cinétique en utilisant la caséine comme substrat a pour sa part permis de calculer les paramètres cinétiques, un V_m de 1667 U et un K_M de 0,55g/ml.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) des fractions récupérées après précipitation à 60% et gel filtration indique une élimination de plusieurs protéines par la chromatographie sur Sephadex G75.

Ce travail a montré la richesse de la plante *Galactites tomentosa* en protéase. Il nécessite une poursuite afin de mieux purifier et caractériser l'enzyme, et ainsi déterminer ses propriétés industrielles, biotechnologiques, pharmaceutiques ou autres.



ANNEXES



Annexe (1)

Précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium : Quantités de sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ en grammes requises pour atteindre le niveau de saturation à 0°C et à ajouter à une solution qui en contient déjà.

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

les.

Annexe (2)

Composition des solutions utilisées dans l'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (Lammeli, 1970).

1) Solution d'acrylamide 30 %

Acrylamide 30g.
 Bis-acrylamide 0,8g.
 Compléter à 100ml avec l'eau distillée.

2) Tampon de séparation (pH 8,8)

Tris-HCl 0,15M.
 SDS 0,4g.
 Compléter à 100ml avec l'eau distillée.

3) Tampon de concentration (pH 6,8)

Tris-HCl 0,05M.
 SDS 0,4g.
 Compléter à 100ml avec l'eau distillée.

4) Persulfate d'Ammonium (APS à 10%)

Persulfate d'Ammonium 1g.
 Eau distillée 10ml.

5) Préparation des gels

5.1. Gel de séparation (Running gel) à 10%

Acrylamide 30% 3,50 ml.
 Tampon de séparation (pH 8,8) 2,50 ml.
 Eau distillée 4,00 ml.
 Persulfate d'Ammonium (APS) 10 % 50µl.
 TEMED 5µl.

5.2. Gel de concentration (Stacking gel) à 5%

Acrylamide 30% 0,65 ml.
 Tampon de concentration (pH 6,8)..... 1,25 ml.
 Eau distillée 3,10 ml.
 Persulfate d'Ammonium (APS) 10 % 30µl.
 TEMED 3µl.

6) Tampon d'échantillon (2X)

Tris-HCl pH 6,8	0,5 M.
SDS	4%
Glycérol	20%.
Bleu de bromophénol	0,004%
β- mercaptoéthanol	10%.

7) Tampon de migration (10X)


Tris (base)	30g.
Glycine	144g.
SDS	10g.

8) La solution de coloration


Méthanol	40ml.
Acide acétique 10%	10ml.
BBC R-250	0,15g.
Eau distillée	50ml.

9) La solution de décoloration

Méthanol	400 ml.
Acide acétique 10%	100 ml.
Eau distillée	500 ml.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES



Références bibliographiques

- ALDER-NISSEN J. (1982).** Limited enzymic degradation of proteins : a new approach in the industrial application of hydrolases. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*, **32**: 138-156.
- ALAIS C. (1975).** Sciences du lait. Principes et techniques laitières. *Masson. Paris.* 108-645.
- ANSON M. L. (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, **19**: 446-459.
- ANTAO C. M., MALCATA F. X. (2005).** Plant serine proteases: Biochemical Physiological and molecular features. *Plant Physiology Biochemistry*, **43**:637-650.
- ASAKURA T., WATANABE H., ABE K., & ARAI S. (1997).** Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**:1070-1075.
- BEERS E. P., WOFFENDEN B. J. & ZHAO C. (2000).** Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, **44**:399-415.
- BENCHIHEUB M. (2015).** Etude des protéases de quelque plantes endémiques : Purification, propriétés, mécanisme d'action et application technologique. Thèse de doctorat 3^{ème} cycle, Université Constantine 1.
- BENCHIHEUB M., BENKAHOUL M., BELLIL I. & MECHAKRA MAZA AICHA. (2014).** Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. *Journal Advanced Research*, **2**: 357-365.
- BERGMEYER H.U., GAWEKN K., et al. (1979).** Principes de l'analyse enzymatique. Technique et Documentation, p.17.
- BEUTH J. (2008).** Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: factor fiction Integrative. *Cancer Therapies*, **7**: 311-316.
- BHALERAO R, KESKITALO J, STERKY F, ERLANDSSON R, BJORKBACKA H, BIRVE SJ, et al. (2003).** Gene expression in autumn leaves. *Plant Physiology*, **131**:430-42.
- BOGUSLAWSKI S. J., LEDDEN D. J. & FREDRICKSON R. A. (1989).** Improved procedure for preparation of F(ab')₂ fragments of mouse IgGs by papain digestion. *Journal of Immunological Methods*, **120**: 51-56
- BOIRON P. (1996).** Organisation et biologie des champignons . *Nathan. Paris*, 19-79.

Références bibliographiques

- BRIEN S., LEWITH G., WALKER A., HICKS S. M., & MIDDLETON D. (2004).** Bromelain as a treatment for osteoarthritis: a review of clinical studies. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*, **1**: 251–257.
- BRUNO M. A., TREJO S. A., AVILES X. F., CAFFINI N. O. & LOPEZ L. M. I. (2006).** Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Protein Journal*, **25**:224–31.
- BRUTTI C. B., MARCELO F. P., NESTOR O. C. & CLAUDIA L. N. (2012).** *Onopordum acanthium* (Asteracea) flowers coagulating agent for cheesemaking. *Food Science and Technology*, **45**: 172-179. 174
- BUTTLE D. J., KEMBHAVI A. A., SHARP S. L., SHUTE R. E., RICH D. H. & BARRETT A. J. (1989).** Affinity purification of the novel cysteine proteinase papaya proteinase IV, and papain from papaya latex. *The Biochemical Journal*, **261**: 469–476.
- CALK P., TAKAÇ S., CALK G. & OZDAMAR T. H. (2000).** Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microbiology Technology*. **26**: 45-60.
- CFR(Code of Federal Regulations). (2009).** Use of food ingredients and sources of radiation (No.21, Section 21). Washington,DC: CFR.
- CFR(Code of Federal Regulations).(1999).** Bacterially-derived protease enzyme preparation (No.21, Section 1150). Washington,DC: CFR.
- CHAO W. S., GU Y-Q., PAUTOT V., BRAY E. & WALLING L. L. (1999).** Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology*, **120**:979–92.
- CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D. & RODRIGUEZ-LOPEZ J. (2007).** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynarascolymus*L.) flowers. *International Dairy Journal*, **17**: 1393–1400.
- CHERRY J. R., FIDANTSEF A. L. (2003).** Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(4): 438-443
- COUSIN D., MATAGNE A., LAEMMLI U. K., STEWART D. J. (1982).** The purification of neutral bacterial proteases *Pseudomonas fluorescens*. *Biochemistry Molecular Biology International*, **34**: 1157-1166.
- CRAFTS-BRANDNER S. J., KLEIN R. R., KLEIN P., HOLZE R., FELLER U. (1996).** Coordination of protein and mRNA abundances of stromal enzymes and mRNA abundances of the ClpP protease subunit during senescence of *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves. *Planta*, **200**: 312–8.

Références bibliographiques

- DE CARVALHO M. H. C., DARCY-LAMETA A., ROY-MACAULEY H., GAREIL M., EL MAAROUF H., PHAM-THI A. T. & ZUILY-FODIL Y. (2001).** Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) and cowpea (*Vigna unguiculata L. Walp*): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Letterer*, **492**: 242–6.
- DE JONG A. J., HOEBERICHTS F. A., YAKIMOVA E. T., MAXIMOVA E. & WOLTERING E. J. (2000).** Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta*, **211**:656–62.
- DENES A. (2006).** Etude Comparée De L'effet De Deux Protéases Sur La Production D'hydrolysats Dotés D'activités Antioxydante Et Antiradicalaire. Sciences de la Vie et de la Terre. École Pratique Des Hautes Etudes. 9 :18
- DERY O, CORVERA C. U, STEINHOFFM, BUNNETT N. W. (1998).** Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases. *American Journal Physiology Cell Physiology*, **274**:1429–52.
- DISTEFANO S., PALMA J. M. , MCCARTHY I., DEL RIO L. A. (1999).** Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta*, **209**:308–13.
- DOI E., SHIBATA D., MATOBA T., YONEZAWA D. (1980).** Characterization of pepstatin-sensitive acid protease in resting rice seeds. *Agricultural Biology and Chemistry*, **44**:741–7.
- DOMINGOS A., CARDOSO P. C., XUE Z., CLEMENTE A., BRODELIUS P. E. & PAIS, M. S. (2000).** Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, **267**: 6824–6831.
- DOMSALLA A., MELZIG M.F. (2008).** Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Medica*, **74**:699–711.
- DROUIN M. (2005).** Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de *Maître ès sciences* (M.Sc.). Canada.
- DUBEY V. K., PANDE M., SINGH B. K. & JAGANNADHAM M. V. (2007).** Papain-like proteases: applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, **6**: 1077–1086.
- DUFOSSE L., DE LA BROISE D. & GUERARD F. (1997).** Fish protein hydrolysates as nitrogen sources for microbial growth and metabolite production. *Recent Research Developments in Microbiology*, **1**: 365-381.
- EL-SAYED S. T., EL-MAZAR M. M. & AL-AZZOUNY R. A. (2013).** Purification and Characterization of a Novel Milk-Clotting Enzyme from *Brassica napus* Seeds. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **7**: 482-493.

Références bibliographiques

- FARO C., VERISSIMO P., LIN Y., TANG J. & PIRES E. (1995).** Cardosin A and B, aspartic proteases from the flowers of cardoon. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **362**: 373–377
- FRAZIER W. C. (1967)** . Food microbiology. *Academic presse, London*. 3-429.
- GARCIA MARTINEZ J. L. & MORENO J. (1986).** Proteolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase in citrus leaf extracts. *Physiology Plant*, **66**: 377–83.
- GRAHAM J. S., XIONG J. & GILLIKIN J. W. (1991).** Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the leaves of *Glycine max*. *Plant Physiology*, **97**:786–92.
- GRUDKOWSKA M. & ZAGDAŃSKA B. (2004).** Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, **51**: 609–624.
- GUEVARA M. G., VERISSIMO P., PIRES E., FARO C. & DALEO G. R. (2004).** Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *Journal of Plant Pathology*, **86**: 233–8.
- GUPTA R., BEG Q. K. & LORENZ P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Application Microbiologie Biotechnologie*, **59** :15-32.
- HADDAR A., AGREBI R., BOUGATEF A., HMIDET, N., SELLAMI-KAMOUN A. & NASRI M. (2009).** Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource. Technoogy*.**100**: 3366-3373.
- HAINQUE B., BAUDIN B. et LEFEBVRE P. (2008).** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. 34-46.
- HARTLEY B. S. (1960).** Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, **29**: 45–72.
- HASHIM M., MING SHENG D., IQBAL M. & XIAO HONG C. (2011).** Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Photochemistry*, **72**: 458-464.
- HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERTSEN R., BRODELIUS P., FIGUEIREDO A.C. & PAIS M. S. S. (1990).** Purification and partial characterization of milk-clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **29**: 1405–10.
- HILDMANN T., EBNETH M., PEÑA-CORTES H., SANCHEZ-SERANO J. J., WILLMITZER L. & PRAT S. (1992).** General roles for abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. *Plant Cell*, **4**: 1157–70.
- JÁNOS A. M., FERENC T. & JÓZSEF T. (2013).** Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, **3**: 923-942.

Références bibliographiques

- JANSEN E. F., BALLS A. K. (1941).** Chymopapain: new crystal- line proteins from papaya latex. *Journal of Biological Chemistry*, **137**: 459–460.
- JONES J.T. & MULLET J.E. (1995).** Developmental expression of a turgor-responsive gene that encodes an intrinsic membrane protein. *Plants Molecular Biology*, **28**: 1055–65.
- KALPANA DEVI M., RASHEEDHABANU A., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V. & PALANISWAMY M. (2008).** Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Sciences and Technology*, **7**: 1-7.
- KAMOUN P. (1975).** Appareils et méthodes en biochimie. Paris: Flammarion Medicine-sciences.
- KAMPHUIS I. G., KALK K. H., SWARTE M. B. & DRENTH J. (1984).** Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **179**: 233–256.
- KASSA LAOUAR M. (2006).** La protéase de *Slybum marianum* purification, étude des propriétés et effet sur la coagulation du lait. Thèse de Magister, Université Mentouri Constantine.
- KUMAR G. A., NAGESH N., PRABHAKAR T. G. & SEKARAN G. (2008).** Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, **99**: 2364-2372.
- KUMAR S., SHARMA N. S., SAHARAN M. & SINGH R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*. purification and characterization. *Process Biochemistry*, **40**:1701-5.
- LAEMMLI U. K. (1970).** Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LANG A., HATSCHER C., WIEGERT C., & KUHL, P. (2009).** Protease catalysed coupling of N-protected amino acids and peptides with 4-aminoantipyrine. *Amino Acids*, **36**: 333–340.
- LAPLAZE L., RIBEIRO A., FRANCHE C., DUHOUX E., AUGUY F., BOGUSZ D. et al. (2000).** Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, **13**:113–7.
- LEIPNER J., ILEN F. & SALLER R. (2001).** Therapy with proteolytic enzymes in rheumatic disorders. *BioDrugs*, **15**:779–89.
- LEISOLA M., JOKELA J., PASTINEN O., TURUNEN O. (2001).** Industrial use of enzymes. *Laboratory Bioproc. Eng.*, Helsinki University of Technology, Finland, nd Hans Schoemker, DMS Reserch, MD Geleen, The Netherlnds.

Références bibliographiques

- LLORENTE B. E., BRUTTI C. B., NATALUCCI C. L. & CAFFINI N. O. (1997).** Partial characterization of a milk clotting proteinase isolated from artichoke (*Cynara scolymus L., Asteraceae*). *Acta Farm Bonaerense.*, **16**:37–42.
- LOTZ-WINTER H. (1990).** On the pharmacology of bromelain: an update with special regard to animal studies on dose-dependent effects. *Planta Medica*, **56**: 249–253.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., et al. (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- MARIANI M., CAMAGNA M., TARDITI L. & SECCAMANI E. (1991).** A new enzymatic method to obtain high yield F(ab') mouse IgG1. *Molecular Immunology*, **28**(1–2): 69–77.
- MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F. et LENOIR J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Science of Aliments*, **19**: 663–675.
- MELLO V. J., GOMES M. T. R., LEMOS F. O., DELFINO J. L., ANDRADE S. P., LOPES M. T. P., et al. (2008).** The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, **15**: 237–44.
- MOODIE P. (2001).** Traditional baking enzymes- proteases. *Enzyme Development Corporation*, **212**: 736-1580.
- MORCELLE S. R., LIGGIERI C. S., BRUNO M. A., PRIOLO N., & CLAPÉS P. (2009).** Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *Journal of Molecular Catalysis By Enzymatic*, **57**: 177–182.
- MUELLER M. S. & MECHLER E. (2005).** Medicinal plants in tropical countries. Traditional use—Experience-facts. Stuttgart: Thieme.
- MUTLU A., CHEN X., REDDY S. M. & GAL S. (1999).** The aspartic proteinase is expressed in *Arabidopsis thaliana* seeds and localized in the protein bodies. *Seed Science Research*, **9**:75–84.
- NAPPER A. D., BENNETT S. P., BOROWSKI M., HOLDRIDGE M. B., LEONARD M. J., ROGERS E. E., et al. (1994).** Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *The Biochemical Journal*, **301**: 727–735.
- NARAI-KANAYAMA A., KOSHINO H. & ASO K. (2008).** Mass spectrometric and kinetic studies on slow progression of papain-catalyzed polymerization of l-glutamic acid diethyl ester. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1780**: 881–891.
- Naveena B. M., Mendiratta S. K. & Anjaneyulu A. S. R. (2004).** Tenderization of Buffalo Meat Using Plant Proteases from *Cucumis Trigonus Roxb* (Kachri) and *Zingiber Officinale Roscoe* (Ginger Rhizome). *Meat Science*, **68**: 363-369.

Références bibliographiques

- NOH Y. S. & AMASINO R. M. (1999).** Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, **41**: 181–94.
- NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE T. S., et al. (2009).** Characterization of the purified extracts from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheese in Algeria. *Journal of Food technology*, **7**(1): 20-29.
- OKAMOTO T., MINAMIKAWA T. (1995).** Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SHEP). *European Journal of Biochemistry*, **231**: 300–5.
- OSTERSETZER O. & ADAM Z. (1997).** Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: the possible role of the FtsH protease. *Plant Cell*, **9**: 957–65.
- PANDE M., DUBEY V. K., YADAV S. C. & JAGANNADHAM M. V. (2006).** A novel serine protease Cryptolepain from *Cryptolepis buchanani*: purification and biochemical characterization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **54**: 10141–50.
- PARDO M. F., LOPEZ M. I., CANALS F., ZVILES F. X., NATALUCCI C. L. & CAFFINI N. O. (2000).** Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of agriculture and Food Chemistry*, **48**:3795–800.
- PATEL R., DODIA M. & SINGH S. P. (2005).** Extracellular alkaline protease from newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. Production and optimization. *Process Biochemistry*, **40**: 3569-3575.
- PAUTOT V., HOLZER F. M., CHAUFAX J. & WALLING L. L. (2001).** The induction of tomato aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* infection is primarily around response triggered by coronatine. *Molecular Plant Microbe Interact*, **14**: 214–24.
- PELMONT, J. (1995).** Enzymes: catalyseurs du monde vivant. Grenoble, Isère: Presses universitaires de Grenoble, p 1039.
- PICKERSGILL R. W., RIZKALLAH P., HARRIS G.W. & GOODENOUGH P. W. (1991).** Determination of the structure of papaya protease omega, *Acta Crystallographica*, **47**:766-771.
- POLANOWSKI A., WILUSZ T., KOLACZKOWSKA M. K., WIECZOREK M. & WILIMOWSKA-PELE A. (1985).** Purification and characterisation of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Curcubita maxima* seeds. In: Kosta V, editor. Aspartic proteinases and their inhibitors. Berlin, Germany: *Walter de Gruyter*, 49–52.
- 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**:597–635.

Références bibliographiques

- RAWLINGS N. D. & BARRETT A. J. (2004).** Families of serine peptidases. *Methods Enzymol*, **244**: 19–61.
- RAWLINGS N. D., BARRETT A. J. & BATEMAN A. (2012).** MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research*, **40**:343–350.
- RICHTER S. & LAMPPA G. K. A. (1998).** chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**:7463–8.
- ROBERT D., VIAN B. (2004).** Eléments de biologie cellulaire. Doin Ed3. p 33-69.
- RODRIGO I., VERA P., & CONEJERO V. (1989).** Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. *European Journal of Biochemistry*, **184**: 663– 669.
- ROOKARD L. E., EDMONDSON O. & GREENWELL P. (2009).** ABO reverse grouping: effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. *British Journal of Biomedical Science*, **66**: 93–97.
- ROSEIRO L., BARBOSA M., AMES J. & WILBEY R. (2003).** Cheesmaking with vegetable coagulants- the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheese. *International Journal of DairyTechnology*, **56**: 76–85.
- ROSENBERG L., LAPID O., BOGDANOV-BEREZOVSKY A., GLESINGER R., KRIEGER Y., SILBERSTEIN E. et al. (2004).** Safety and efficacy of a proteolytic enzyme for enzymatic burn débridement: a preliminary report. *Burns*, **30**: 843–850.
- ROWAN A. D., BUTTLE D. J. & BARRETT A. J. (1988).** Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **267**: 262–270.
- ROWAN A. D., BUTTLE D. J. & BARRETT A. J. (1990).** The cysteine proteinases of the pineapple plant. *The Biochemical Journal*, **266** :869–875.
- RUDENSKAYA G. N., BOGACHEVA A. M., PREUSSER A., KUZNETSOVA A. V., DUNAEVSKY Y. E., GOLOVKIN B. N. et al. (1998).** Taraxalisin – a serine protease from dandelion *Taraxacum officinale* Webb. S. I. FEBS Letters, **437**:237–40.
- RUDENSKAYA G. N., BOGDANOVA E. A., REVINA L. P., GOLOVKIN B. N. & STEPANOV V. M. (1995).** Macluralisin—A serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* . *Schneid. Planta*, **196**:174–179.
- SAGHER O., SZABO T. A. CHENELLE A. G. & JANE J. A. (1995).** Intraoperative chemonucleolysis as an adjunct to lumbar discectomy. *Spine*, **20**:1923–1927.
- SALAS C. E., GOMES M. T. R. HERNANDEZ M. & LOPES M. T. P. (2008).** Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, **69**: 2263–2269.

Références bibliographiques

- SANDHYA C., SUMANTHA A. & PANDEY A. (2004).** Proteases. In: Enzyme Technology, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), Asiatech Publishers Inc., New Delhi, India. p 312–325.
- SARKINNEN P., KALKKINEN N., TILGMAN C., SIURO J., KERVINEN J. & MIKOLA L. (1992).** Aspartic proteinases from barley grains is related to mammalian lysosomal cathepsin D. *Planta*, **186**: 317–23.
- SARMENTO A. C., LOPES H., OLIVEIRA C. S., VITORINO R., SAMYN B., SERGEANT K. et al. (2009).** Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, **230**(2): 429–439.
- SARROUH B., SANTOS T. M., MIYOSHI A., DIAS R. & AZEVEDO V. (2012).** Up-to-date insight on industrial enzymes applications and global market. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, S4:002
- SCHALLER A. (2004).** A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, **220**: 183–197.
- SCHALLER A., BERGEY D. R. & RYAN C.A. (1995).** Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *Plant Cell*, **7**:1893–8.
- SCRIBAN R. (1993).** Biotechnologie. 4eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. p.30-695.
- SCRIBAN R. (1999).** Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. p.149-159.
- SEKIZAKI H., TOYOTA E., FUCHISE T., ZHOU S., NOGUCHI Y., & HORITA K. (2008).** Application of several types of substrates to ficin-catalyzed peptide synthesis. *Amino Acids*. **34**: 149–153.
- SGARBIERI V. C., GUPTA S. M., KRAMER D. E., & WHITAKER J. R. (1964).** Ficus enzymes I. Separation of the proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata* lattices. *The Journal of Biological Chemistry*, **239**: 2170–2177.
- SIDRACH L., GARCIA-CANOVAS F., TUDELA J. & RODRIGUEZ-LOPEZ J. N. (2005).** Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, **66**: 41-49.
- SILVA S. V., ALLMERE T., MALCATA F. X. & ANDRÉN A. (2003).** Comparative studies on the gelling properties of cardosins from *Cynaracardunculus* and chymosin on cow's skim milk. *International Dairy*, **13**:559–564.
- ST. ANGELO A. J., ORY R.L. & HANSEN H.J. (1970).** Properties of a purified proteinase from hempseed. *Phytochemistry*, **9**: 1933–8.
- SUBATHRA K., JEEVITHA G. & DEEPA R. (2012).** Aqueous two phase extraction of protease from neem leaves [*Azadirachta indica*]

Références bibliographiques

- SULLIVAN G.A. & CALKINS C.R. (2010).** Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat science*, Mar 27.
- SUMANTHA A., LARROCHE C. & PANDEY A. (2006).** Microbiology and industrial, biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, **44** : 211-220.
- SUTOH K., KATO H., & MINAMIKAWA T. (1999).** Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry*, **126**: 700–707.
- TAI D. F., HUANG H. Y. & HUANG C. C. (1995).** Immobilized ficin catalyzed synthesis of peptides in organic solvent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **5**:1475–1478.
- TAKEDA N., KISTNER C., KOSUTA S., WINZER T., PITZSCHKE A., GROTH M. et al. (2007).** Proteases in plant root symbiosis. *Phytochemistry*, **68**: 111–21.
- TAMER M. I. (1993).** Identification and partial purification of a novel milk-clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, **13**:427–32.
- TANABE S., ARAI S. & WATANABE M. (1996).** Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **60**:1269–1272.
- TARGONI O., TARY L. & LEHMANN P. (1999).** Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment, *Journal of Autoimmunity*, **12**: 191–8.
- TORNERO P., CONEJERO V. & VERA P. (1996).** Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**: 6332–6337.
- TRAP C., BOIREAU P. (2000).** Les protéases chez les helminthes. *Veterinary Research*. **31**: 461-471.
- UCHIKOBA T., KANEDA M. (1996).** Milk-clotting activity of cucumisin, a plant serine protease from Melon fruit. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **56**:325–330.
- VAIRO-CAVALLI S. E., CLAVER S., PRIOLO N. & NATALUCCI C. (2005).** Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research* **72**:271–5.
- VARSHAVSKY A. (1996).** The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**:12142–9.
- VERÍSSIMO P., FARO C., MOIR A. J. G., LIN Y., TANG J. & PIRES E. (1996).** Purification, characterization and partial amino acid sequence of two novel aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, **235**: 762–768.
- WALLACE R. H. (1922).** Vegetable Rennet. *Nature*, **110**: 543.

Références bibliographiques

YAMAGATA H., MASUZAWA T., NAGAOKA Y., OHNISHI T. & IWASAKI T. (1994). Cucumisin, a serine protease from melon fruit, shares structural homology with subtilisin and is generated from a large precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**: 32725– 32731.

YOSHIDA-YAMAMOTO S., NISHIMURA S., OKUNO T., RAKUMAN M. & TAKII Y. (2010). Efficient DNA Extraction from Nail Clippings Using the Protease Solution from Cucumis melo. *Molecular biotechnology*, **20**: 1073–6085.

Webographie

1. [NCBI](#) : *Galactites tomentosa* (en) (consulté le 15-05-2015).
2. [The Plant List](#) : *Galactites tomentosa* Moench ,(Source: [The Global Compositae Checklist](#)) (consulté le 15-05-2015).
3. Base de données "eFlore" :
http://www.telabotanica.org/eflore/BDNFF/derniere_version/nn/28687(consulté le 15-05-2015).
4. Dessins-gravures anciens en couleur de fleurs et plantes de la région méditerranéenne
education.environnement.ecoles.over-blog.com (consulté le 15-05-2015).



RESUMÉS



Résumé

Les protéases occupent une place très importante parmi les enzymes industrielles en raison de leurs larges applications. Notre étude porte sur les protéases végétales endémiques en raison des nombreux avantages qu'elles possèdent par rapport aux sources microbiennes et animales (spécificité de substrat, activité sur une large gamme de températures et de pH, etc) en plus d'une extraction efficace, en grande quantité et à moindre coût.

Dans cet objectif, notre étude a porté sur deux types d'échantillons (les fleurs entières et les pétales) de l'espèce *Galactites tomentosa*. Pour cela, les protéases sont extraites en trois étapes ; broyage et centrifugation, précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et exclusion moléculaire sur gel Sephadex G75. Quelques propriétés de l'enzyme partiellement purifiée ont été étudiées : le pH optimal et les paramètres cinétiques.

Les résultats indiquent la présence de deux types d'activités dans la plante *Galactites tomentosa*, l'une à pH 5,5 et l'autre à pH 7 ; cette dernière représente l'activité majeure. La protéase neutre a été purifiée 5 fois avec un rendement d'environ 55,23% pour les fleurs entières (protéase acide) et 29 fois avec un rendement 71,40% pour les pétales (protéase neutre). Les pétales contiennent deux-tiers de l'activité de la fleur. L'étude des propriétés cinétiques indique un $V_m=1667$ U et un $K_M=0,55$ g/ml. La purification de la protéase a été évaluée par l'électrophorèse SDS-PAGE.

Mots clés : Protéase, *Galactites tomentosa*, purification, paramètres cinétiques.

Abstract

Proteases occupy a very important place among the industrial enzymes because of their wide applications. Our study focuses on endemic plant proteases due to the various advantages they possess compared to those extracted from microbial and animal sources (substrate specificity, activity on a wide range of temperature and pH, etc.) and a better and efficient extraction, in large quantities and at low cost.

For that reason, our study focused on two samples (whole flowers and petals) of the species *Galactites tomentosa*. For this, the proteases are purified in three steps; grinding and centrifugation, fractional ammonium sulfate precipitation and molecular exclusion with Sephadex G75 gel. Some properties of the partially purified enzyme were studied: the optimum pH and kinetic parameters.

The results indicate the presence of two types of activity in the plant *Galactites tomentosa*, one at pH 5.5 and the other at pH 7; the last one represents the major activity. The neutral protease was purified 5-fold with a yield of about 55.23% in whole flowers and 29 times with a yield 71.40% in the petals. The petals contain two-thirds of the enzymatic activity in the flowers. The study of the kinetics gave a $V_m = 1667$ U and $K_M = 0.55$ g / ml. The purification of the protease was evaluated by SDS-PAGE.

Keywords: Protease, *Galactites tomentosa*, purification, kinetic parameters.

ملخص

ان انزيمات البروتياز تحتل مكانه جد هامة بين الإنزيمات الصناعية و ذلك عائد إلى استعمالها المتعددة, هذه الدراسة تدور حول إنزيمات البروتياز النباتية المستوطنة بشكل خاص و يرجع ذلك لامتلاكها عدة امتيازات مقارنة مع تلك المستخرجة من الميكروبات أو الحيوانات (نشاط نوعي و مستقر في مجالي درجة حرارة و حموضة واسعين). بالإضافة لـإمكانية استخراج أكثر فعالية بكميات كبيرة وبتكلفة منخفضة.

لهذا الغرض ، ركزت دراستنا على نوعين من العينات (الزهور والبتلات) من *Galactites tomentosa* ، تتم عملية استخراج البروتياز في ثلاث خطوات: الطحن الطرد المركزي، ترسيب البروتينات بواسطة كبريتات الأمونيوم و عملية تنقية الجزيئية عبر هلام Sephadex G75. كما تمت دراسة بعض خصائص الإنزيم المنقى جزئياً: درجة الحموضة المثلى والخصائص الحركية.

وتشير النتائج إلى وجود نوعين من النشاط في النبتة *Galactites tomentos*، الأول في درجة الحموضة 5,5 pH، أما الثاني ففي درجة حموضة 7 pH؛ يمثل هذا الأخير النشاط الرئيسي. تم تنقيته البروتياز معتدل الحموضة 5 أضعاف بعائد يقدر بحوالي 55.23% في الزهور كاملة و 29 ضعف بعائد قدر ب 71.40% في البتلات. و عليه فإن البتلات تحتوي على ثلثي النشاط الإنزيمي في الزهرة. دراسة الخصائص الحركية أعطت النتائج التالية: VM = 1667 U و KM = 0.55 جم / مل. تم تقييم درجة نقاوة البروتياز بواسطة SDS-PAGE.

كلمات البحث: البروتياز، *Galactites tomentosa*، تنقية، المعلمات الحركية.

BOURSAS Insaf et CHAOUI Radia

**Date de soutenance :
le 06/07/2015**

Thème : Purification partielle et caractérisation de la protéase neutre des fleurs de *Galactites tomentosus* Moench

Résumé

Les protéases occupent une place très importante parmi les enzymes industrielles en raison de leurs larges applications. Notre étude porte sur les protéases végétales endémiques en raison des nombreux avantages qu'elles possèdent par rapport aux sources microbiennes et animales (spécificité de substrat, activité sur une large gamme de températures et de pH, etc) en plus d'une extraction efficace, en grande quantité et à moindre coût.

Dans cet objectif, notre étude a porté sur deux types d'échantillons (les fleurs entières et les pétales) de l'espèce *Galactites tomentosa*. Pour cela, les protéases sont extraites en trois étapes; broyage suivie de centrifugation, précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et exclusion moléculaire sur gel Sephadex G75. Quelques propriétés de l'enzyme partiellement purifiée ont été étudiées : le pH optimal et les paramètres cinétiques.

Les résultats indiquent la présence de deux types d'activités au niveau des fleurs de la plante *Galactites tomentosa*, l'une à pH 5,5 et l'autre à pH 7 ; cette dernière représente l'activité majeure. La protéase a été purifiée 5 fois avec un rendement d'environ 55,23% pour les fleurs entières (protéase acide) et 29 fois avec un rendement 71,40% pour les pétales (protéase neutre). Les pétales contiennent deux-tiers de l'activité de la fleur. L'étude des propriétés cinétiques indique une V_m de 1667 U et un K_M de 0,55 g/ml. L'évaluation de la purification de la protéase par électrophorèse SDS-PAGE montre l'efficacité des méthodes utilisées, particulièrement le gel Sephadex G75 pour la filtration moléculaire.

Mots clés : Protéase, *Galactites tomentosa*, purification, paramètres cinétiques.

Laboratoire de Biologie et Environnement – Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université les Frères Mentouri, Constantine.

Encadreur : Professeur MECHAKRA-MAZA A.

Présidente : Melle BENHAMDI A. (Docteur- UFM Constantine).

Examinatrice : Mme BENKAHOUL M. (M.A.A.- UFM Constantine).