



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة 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 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé

Extraction de la ficine de l'espèce *Ficus carica* et étude de ses caractéristiques biochimiques et de son effet antimicrobien sur quelques espèces bactériennes pathogènes

Présenté et soutenu par :

- BOULKARA Med El Amine
- BRAHIMI Abdelkader

Le : 04/07/2018

Jury d'évaluation :

Présidente : M^{me} BENSMIRA S. (Maître Assistante A à l'UFM Constantine).

Rapporteur : M^{me} DAFFRI A. (Maître de Conférences B à UFM Constantine).

Examineurs : M^{me} KASSA- LAOUAR M. (Maître Assistante A à UFM Constantine).

Année universitaire
2017 - 2018

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir accordé au bon chemin, et m'avoir donné le souffle, l'énergie et la volonté pour accomplir ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé

au Laboratoire de Biochimie -Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université les Frères Mentouri, Constantine.

*Sous la direction de **Mme DAFFRI A,***

Maître de Conférences B à Université les Frères Mentouri, Constantine.

** * **

Ce travail n'aurait pas été aussi efficace sans la contribution de nombreuses personnes dont le savoir et le savoir-faire méritent d'être souligné. Merci à :

*- **Mme DAFFRI A Maître de Conférences B** à UFM Constantine, 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.

*- **Mme BENSMIRA S. Maître Assistante A** à l'UFM Constantine d'avoir accepté de présider le jury de soutenance, Pour nous, vous êtes un exemple à suivre.*

*- **Mme KASSA- LAOUAR M. Maître Assistante A** à UFM Constantine pour sa gentillesse et ses remarques objectives on la*

Remercie infiniment.

** * **

Nous adressons également nos remerciements à tous les membres du laboratoire de Biochimie -Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- UFM Constantine.

Pour leurs collaborations, en particulier à

***Mr BOUMELA HOCINE** Ingénieure du laboratoire, de nous avoir accueillies si gentiment et de nous avoir fourni tout le matériel nécessaire pour accomplir notre travail.*

*Et **Mr BOUDARSA NABIL** pour*

Leur aide à chaque fois que nous avons des questions.

** * **

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

Dédicace

Je dédie ce travail

*A la mémoire de ma grand-mère maternelle Que Dieu, le miséricordieux,
l'accueille dans son éternel paradis.*

A ma chère mère SORAYA et mon cher père HOCINE,

Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma

Profonde gratitude pour leurs amours,

Leurs encouragements et leurs soutiens tout au long

De mes études, que DIEU les bénisse

A mes chers frères SAMY et WALID

A toute ma famille :

Veillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour

Tous vos efforts.

A tous mes amis :

*Vous êtes les meilleurs amis qui puissent existait, vous étiez la toujours à mes
cotés.*

Mohamed El Amine ...

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

Mes parents, ma mère Saliha pour son amour et Leurs gentillesse.

Mon père Ali pour son support.

Mes frères:

Issam et Atmen qui m'ont aidé dans mon travail.

Abdelrouf, Abdelyakin et Sohajib pour leur soutien moral.

Yazen firas et Siradj el Din les petits beaux derniers de la famille.

Mes aimables enseignants :

Djghader F, Boukrana A , Bensouiki A ,Bendjabalah M , bensegueni A

L'équipe de toujours : Abdeslam, Borhane et Mohamed lamine

Abdelkader Brahim

Sommaire

Liste des figures	I
Liste des tableaux	II
Introduction.....	III

Chapitre 1 Synthèse Bibliographique

I Figuier	2
1 Origine et répartition.....	2
2 Evolution.....	2
3 Morphologie	3
4 Caractéristiques du figuier.....	3
4.1 Bourgeon terminal	3
4.2 Rameaux fructifères.....	4
4.3 Feuilles.....	4
5 Classification botanique.....	7
6 Différents types de figuiers	7
6.1 Formes horticoles.....	8
6.2 Caprifiguiers ou figuier sauvage.....	8
7 Les variétés de figuiers	8
7.1 Figuier dauphine.....	9
7.2 Figuier Marseillaise	9
8 Composition chimique.....	10
II Système enzymatique du figuier	11
1 Enzymes protéolytiques.....	11
2 Protéases d'origine végétale.....	11
III. La ficine	11
1 Définition.....	12
2 Caractéristique de la ficine.....	12
3 Mécanisme et spécificité d'action de la ficine	13
4 Influence du pH, de la température et de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine.....	13

4.1 Effet du pH.....	13
4.2 Effet de la température.....	14
4.4 Effet de la concentration du substrat.....	14
5 Effet antimicrobien de la ficine.....	15
6 Effet de la ficine sur l'agglutination des globules rouges humains.....	16
1 Extraction de la ficine.....	17
2 Caractérisation physico-chimique de la ficine extraite.....	17
2.1 Mesure de la teneur en matière sèche.....	17
2.2 Mesure du pH.....	17
2.3 Dosage des protéines dans l'extrait enzymatique.....	18
3 Mesure de l'activité enzymatique des extraits de la ficine.....	18
3.1 Evaluation de l'activité coagulante.....	18
3.2 Détermination de l'activité protéolytique.....	19
4 Effet de la température, du pH et de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine.....	20
4.1 Effet de la température.....	20
4.2 Effet du pH.....	21
4.3 Effet de la concentration du substrat (caséine) sur l'activité enzymatique de la ficine.....	21
5. Etudes de l'effet anti microbien de la ficine.....	22

Chapitre 3 Résultats et Discussions

1 Caractérisations physicochimiques de la ficine extraite.....	23
1.1 Mesure de la teneur en matière sèche.....	23
1.2 Caractéristiques de l'extrait brut de la ficine.....	23
1.3 Dosage des protéines de l'extrait enzymatique.....	24
2 Mesure des activités enzymatiques des extraits de la ficine.....	25
2.1 Activité coagulante.....	25
2.2 Force coagulante.....	25
2.3 Détermination de l'activité protéolytique.....	26
3 Effet de la température, pH et la concentration du substrat (la caséine) sur l'activité enzymatique.....	27
3.1 Effet de la température.....	28
3.2 Effet du pH.....	29
4 Activité protéolytique de la ficine dans les conditions optimales de pH, température et concentration du substrat (la caséine).....	32
5. Etudes de l'effet antibactérien de la ficine.....	33

conclusion

Références bibliographiques.....

Résumé.....

Liste des tableaux

Tableau n°1 Composition chimique de la figue fraîche, sèche et ses feuilles.....	9
Tableau n°2 Caractéristiques physico-chimiques des deux variétés du figuier.....	23
Tableau n°3 Caractéristiques de l'extrait brute des deux variétés du figuier.....	24
Tableau n°4 Préparation de la courbe d'étalonnage de l'albumine.....	24
Tableau n°5 Les valeurs des activités coagulantes et les forces coagulantes des deux variétés Marseillaise et Dauphine.....	26
Tableau n°6 Préparation de la courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	26
Tableau n°7 Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différentes températures pour les deux variétés Marseillaise et Dauphine.....	28
Tableau n°8 Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différents pH pour les deux variétés Marseillaise et Dauphine.....	29
Tableau n°9 Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différentes concentrations de la du lait, pour les deux variétés Marseillaise et Dauphin.....	31

LISTE DES FIGURES

Figure n°1 : Photo d'un bourgeon terminal du figuier.....	3
Figure n°2 : Image du rameaux fructifère de figuier.....	4
Figure n°3 : Photo d'une feuille de l'espèce <i>Ficus carica</i>	4
Figure n°4 : Image de la fleur à l'intérieur du fruit.....	5
Figure n°5 : Photo du fruit du figuier.....	5
Figure n°6 : Image représentative du liquide blanc du figuier (latex).....	6
Figure n°7 : Photo de l'arbre de figuier <i>Ficus carica</i>	6
Figure n°8 : Photo de la variété dauphine de figuier <i>Ficus carica</i>	8
Figure n°9 : Photo de la variété marseillaise de figuier <i>Ficus carica</i>	9
Figure n°10 : Illustration représente la méthode des disques de l'antibiogramme.....	21
Figure n°11 : Courbe d'étalonnage de la Bovine Sérum Albumine.....	24
Figure n°12 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine (100 µl/ml).....	27
Figure n°13 : Représentation graphique de l'effet de la variation de la température sur l'activité enzymatique de la ficine des deux variétés de figuiers.....	29
Figure n°14 : Représentation graphiques de l'effet de la variation du pH sur l'activité enzymatique de la ficine des deux variétés Marseillaise et Dauphine.....	30
Figure n°15 : Représentation graphique de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine des deux variétés Marseillaise et Dauphine.....	32
Figure n°16 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce <i>Escherichia coli</i>	34
Figure n°17 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce <i>Proteus</i>	34
Figure n°18 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Figure n°19 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce <i>Bacillus subtil</i>	35
Figure n°20 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce <i>Staphylococcus</i>	36

INTRODUCTION

Introduction

Le figuier *Ficus carica* est un arbre originaire du bassin méditerranéen et du moyen orient, plus exactement d'Afghanistan. Son aire de répartition s'étend depuis les îles de Canaries jusqu'en Inde et au Pakistan, sur les côtes de l'Océan Atlantique comme sur toutes celles de la Méditerranée et dans le Moyen Orient (Vidaud, 1997). Le figuier appartient à la famille des *Moraceae*. Les diverses parties de cet arbre comme l'écorce, les feuilles, les pousses d'offre, les fruits, les graines et le latex sont riches en enzymes protéolytiques (Jander et Machado, 2008).

Le figuier *Ficus carica* est une source importante de protéase. Il est largement utilisé pour l'extraction des enzymes protéolytiques dont principalement la ficine. (Sandhya et al., 2004).

L'usage de la ficine est très diversifié. En effet, la ficine brute est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour l'attendrissement des viandes et la coagulation du lait. De plus de l'industrie textile, de l'industrie pharmacologique et de la cosmétologie, la ficine est utilisée en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps psi réguliers (Bruneton, 2009). Traditionnellement, la ficine est utilisée dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (Oliveira et al., 2010).

Cette étude a pour objectif d'étudier l'extraction du système enzymatique des feuilles de l'arbre de figuier de l'espèce *Ficus carica*, de ses deux variétés : Marseillaise et Dauphine.

L'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques et la mesure de l'activité enzymatique protéolytiques de la ficine, extraite des deux variétés du figuier, sont également effectuées. Afin de déterminer les conditions optimales dans lesquelles l'enzyme fonctionne mieux, avec une comparaison entre les deux variétés.

Enfin, pour révéler l'effet antibactérien de la ficine extraite des deux variétés de figuier, un test d'antibiogramme sur quelques espèces bactériennes pathogènes est appliqué.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. Figuier

1. Origine et répartition

La figue est un fruit très anciennement connu dans le monde. Il est originaire du Moyen Orient et naturalisé dans plusieurs régions du bassin méditerranéen dont il fournit l'essentiel de la production mondiale (Michel Aubineau, 2002).

L'arbre du figuier est nommé *Ficus carica*, c'est une des espèces qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait pour soigner la verrue) et *carica* qui fait allusion à une région en Turquie. Cette espèce a été cultivée par les Phéniciens, les Syriens, les Egyptiens et les Grecs dans tout le bassin méditerranéen. C'est une plante indigène à ces milieux. Elle appartient au genre *Ficus* qui comprend 700 espèces, reconnaissables toutes par présence d'une figue. La seule espèce cultivée pour ses fruits comestibles est *Ficus carica* (Michel Aubineau, 2002).

L'intérêt que l'homme porte au figuier entraîne sa dispersion dans plusieurs régions du monde. Ainsi que sa grande faculté d'adaptation et ses affinités avec les climats chauds. Cette espèce possède une étonnante capacité de régénération végétative et de production de fruit sans production des fleurs visibles. Sa production est de deux types: figues de la première récolte ou figues fleurs (El bakkor) et figues de la deuxième récolte ou figues d'automne (karmouce). Les figues fleurs sont formées sur les rameaux défeuillés de l'année précédente (Rameau et *al.*, 2008).

2. Evolution

Les figues passent l'hiver au stade « grains de poivre » pour reprendre leur développement au printemps. L'évolution des figues fleurs ne nécessite pas de pollinisation et se fait d'une manière parthénocarpique. Les figues d'automne (figues non retardées) sont formées à l'aisselle des feuilles et des rameaux en croissance. Il existe chez le figuier domestique des variétés qui ne produisent que les figues d'automne et qui sont appelées unifères. D'autres donnent, en plus, une production de figues fleurs, ils sont de type bifères. Un décalage de quelques semaines est toujours observé entre les époques de maturité de ces deux types de production. Les fruits de ces dernières exercent, l'un sur l'autre, une compétition chez les variétés bifères. Ainsi, une forte production en figues d'automne mène à un avortement plus élevé de la récolte de figues fleurs de l'année suivante (Vidaud, 1997).

3. Morphologie

Le figuier constitue l'un des plus grands genres de plantes médicinales avec environ 700 espèces de plantes ligneuses, des arbres et des arbustes. Elles sont surtout présentes dans les régions subtropicales et tropicales à travers le monde (Raj et Baby, 2011).

La variabilité morphologique des figues est impressionnante. Toutes ces espèces produisent des figues. Ces plantes produisent toutes du latex, et certaines sont utilisées pour la production de caoutchouc (Jander et Machado, 2008).

Le figuier est un arbre généralement buissonnant (3-5m). Il peut atteindre, dans certains régions qui lui conviennent particulièrement, jusqu'à 10 et 12 m de hauteur. Il peut avoir un tronc allant jusqu'à 1m de circonférence et une frondaison couvrant 100 m². Dans les régions méridionales, cet arbre pouvant atteindre de 12 à 15 m d'hauteur, ou constituant tout au moins une forte cépée. En remontant vers des régions plus septentrionales, son port se réduit progressivement (Bretaudeau et Faure, 1990).

L'écorce du figuier est lisse et peu fissurée, de couleur gris pâle. Ses rameaux contiennent du latex. Son feuillage caduque comprend de grandes feuilles, larges de 25 cm, épaisses, coriaces, à 3 à 5 lobes profonds, à bord lisse, veloutées en dessous et rugueuses sur le dessus. Il s'agit d'une espèce monoïque, avec des fleurs nombreuses insérées dans un réceptacle charnu. Ses fruits, de couleur vert jaunâtre (figes blanches) ou mauve foncé (figes violettes), poussent en juin-septembre en bout de rameaux (Michel, 2003).

4. Caractéristiques du figuier

4.1 Bourgeon terminal

Le figuier est constitué d'un bourgeon terminal. Ce dernier est constitué de deux stipules correspondant à la dernière feuille mise en place. Dans ce bourgeon se trouve de 9 à 11 ébauches de feuilles avec leurs stipules (Vidaud, 1997) (Figure 1).

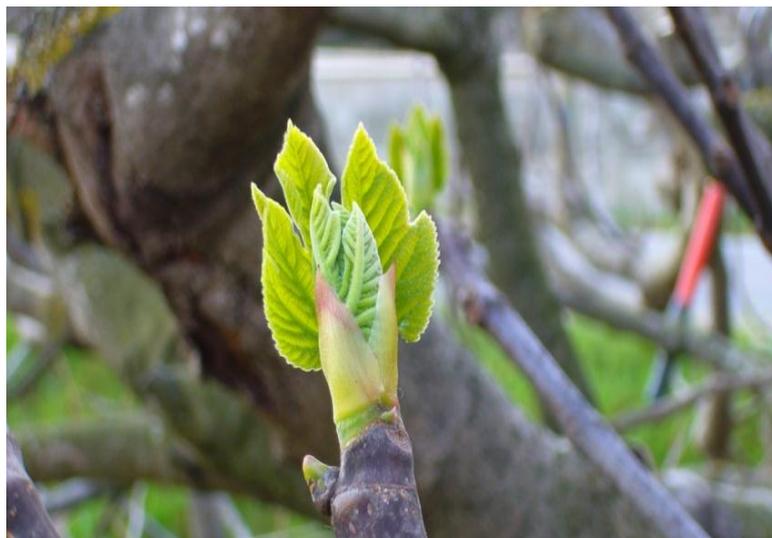


Figure 1:Photo d'un bourgeon terminal du figuier.

4.2 Rameaux fructifères

Le rameau est constitué d'un ensemble d'entre nœuds. Chaque nœud constitue le point d'insertion d'une feuille et des bourgeons axillaires. Leur disposition alternée, rarement opposée sur le rameau, est une spécificité de la famille des Moracées (Vidaud, 1997) (Figure 2).



Figure 2: Image du rameaux fructifère de figuier.

4.3 Feuilles

Les feuilles du figuier sont très polymorphes, caduques, grandes et à nervation palmée. Elles sont larges (25 cm) et épaisse et fortement lobées (3 à 5 ou 7 lobes profonds selon les variétés). La face supérieure est rugueuse et de couleur vert foncé. Quant à la face inférieure, elle présente des nervures très saillantes de couleur vert clair (Vidaud, 1997) (Figure 3).



Figure 3: Photo d'une feuille de l'espèce *Ficus carica*.

✓ L'inflorescence et la fleur

L'inflorescence du figuier est très particulière. Les fleurs de la figue sont hors de vue et groupés à l'intérieur des fruits verts (Vidaud, 1997).



Figure 4: Image de la fleur à l'intérieur du fruit.

4.4 Fruit

La figue est un faux fruit, ce que l'on considère comme un fruit est en réalité un réceptacle de forme concave où sont fixées un grand nombre de fleurs unisexuées. La figue est une sorte de petit sac charnu contenant un orifice, l'ostiole hermétiquement clos par des bractées imbriquées. Les véritables fruits sont les innombrables petites graines qui parsèment la chair de la figue, ce que l'on appelle « akènes » (Haesslein et Oreiller, 2008) (Figure 5).



Figure 5: Photo du fruit du figuier.

4.5 Latex

C'est un liquide visqueux de couleur blanche. il est largement distribué dans la plante (Kim et *al.*, 2003). Par incision du tronc, le latex est recueilli. Il coagule rapidement, filtré puis desséché, il constitue la ficine brute (Bruneton, 2009). Ainsi, le latex est constitué de caoutchouc, de résine, d'albumine, de sucre, d'acide malique, d'enzymes protéolytiques (diastase, estérase, lipase), la catalase et la peroxydase (Baby et Raj, 2011). Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (Oliveir et *al.*, 2010).



Figure 6: Image représentative du liquide blanc du figuier (latex).

La figue contient un nombre considérable de composé bénéfique, à savoir les polyphénols et les flavonoïdes, qui agissent en tant qu'antioxydant (El Shobaki et *al.*, 2010)

5. Classification botanique

La classification botanique est la suivante :

Embranchement : *Phanérogames*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous classe : *Hamamélidées*

Série : *Apétales unisexuées*

Ordre : *Urticales*

Famille : *Moraceae*

Genre : *Ficus*

Espèce : *Ficus carica L.* (Joseph et Raj, 2011)



Figure 7 : Photo de l'arbre de figuier *Ficus carica*.

6. Différents types de figuiers

Il existe deux catégories de figuier:

6.1 Formes horticoles

6.1.1 Figuiers bifères

Les variétés bifères donnent deux récoltes par an. Une première récolte de figue - fleurs au Juin-Juillet qui représente environ un quart de la production méditerranéenne et une deuxième récolte de figes d'automne (sur les bois de l'année en cours) à partir du mois d'Août, avec des figes plus petites mais plus sucrées et plus savoureuses (Mauri, 1952).

6.1.2 Figuiers unifères

Ils ne fructifient qu'une seule fois à la fin du mois d'Août-début septembre. Les figes se forment à partir de bourgeons de forme conique visibles sur les rameaux en hiver. Cependant, elles ne murissent que si elles sont visitées par le blastophage (insecte pollinisateur) (Mauri, 1952).

6.2 Caprifiguiers ou figuier sauvage

Les caprifiguiers ou les fruits du caprifiguiers sont généralement non comestibles en raison de leur goût et de leur consistance pailleuse. Trois séries de fruits sont produites dans l'année qui sont: les mammes, le profichis et les mammonis (Rebour, 1968).

7. Les variétés de figuiers

La reconnaissance des variétés est particulièrement délicate chez le figuier. Cette situation résulte de la conjugaison des facteurs suivants :

- Le matériel sauvage est très proche du matériel cultivé.
- Il existe au sein d'une même variété une forte variabilité phénotypique en fonction du lieu de culture.
- Il n'existe que peu de collections de référence.
- Il n'existe pas de description suffisamment précise des variétés pour permettre à elle seule une reconnaissance non ambiguë.
- Les appellations locales divergent pour une même variété selon les régions de culture et à l'inverse certaines appellations courantes ne désignent pas toujours la même variété (Joannet, 2002).

Il existe 755 variétés qui ont été recensées dans le monde. Un gros travail de recensement et d'unification est en cours à propos de différents variétés de figuiers. (Delrieu, 1997).

En Algérie, des études très intéressantes sont réalisées sur les figuiers cultivés en Kabylie. En effet, en vue de déterminer la nomenclature des principaux types de figuiers cultivés en kabyle, une description de l'arbre, des feuilles et des fruits ainsi qu'une étude pomologique et chimique est menée sur les fruits secs de 26 variétés locales et de deux variétés introduites. La présence d'une douzaine de synonymies certaines ou probables des variétés rencontrées en Kabylie est alors démontrée (Mauri, 1944). Parmi les variétés du figuier :

7.1 Figuier dauphine

Appelé aussi Rouge d'Argenteuil, Grosse violette, Boule d'Or, Grosse de Juillet, Adam, Grise de Beaucaire. Cette variété est cultivée pour sa forte production de figues fleurs en région tempérée, Avec un fruit de très gros calibre (Nyazi et Karabiyik, 1971).



Figure 8 : Photo de la variété dauphine de figuier *Ficus carica*.

7.2 Figuier Marseillaise

Appelé aussi la petite blanche, Blanquette. C'est une petite figue unifère à la peau jaune-verte, ayant une chair rose, très sucrée de bonne qualité gustative. Elle est souvent utilisée comme figue séchée. C'est un arbre de faible développement ,rustique (Nyazi et Karabiyik, 1971).



Figure 9 : Photo de la variété marseillaise de figuier *Ficus carica*.

8. Composition chimique

L'espèce *Ficus carica* contient des glucides, notamment des oses (50 % de glucose) et des osides (mucilages) et des protides aussi. Cette espèce contient particulièrement des enzymes telle que : les lipases, les protéases (enzyme protéolytique) et la ficine. Ainsi que des acides organiques tels que : l'acide ascorbique (la vitamine C), l'acide citrique et l'acide malique. Elle contient aussi des composés phénoliques du type flavonoïdes dont principalement des anthocyanidines. Ainsi que plusieurs vitamines : la vitamine A (rétinol) et la vitamine B1 (thiamine). Cependant, la composition biochimique de la figue et les feuilles de l'espèce *Ficus carica* est mentionnée, en pourcentage, dans le tableau1 (NehaSoni, 2014).

Tableau 01: Composition chimique de la figue fraîche, sèche et ses feuilles.

Composition	Figue fraîche (%)	Figue sèche (%)	Feuilles (%)
Humidité	82,20	16.63	65,90
Cendre	0,65	4.65	5,30

Protéine	1,00	4.67	5,90
Lipide	1,70	0.56	0,81
Fibre	1,55	3.68	4,50
Hydrates de Carbone	12,90	73.5	17,59

II. Système enzymatique du figuier

1. Enzymes protéolytiques

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases. Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Barrett, 1994). Ces enzymes sont produites par les animaux, les végétaux et les microorganismes. Leur synthèse s'effectue en extra cellulaire comme en intra cellulaire (Palma, 2002).

Les protéases sont classées dans le sous-groupe 4 du groupe 3 (hydrolases) (E.C.3.4.X.X) (Iubmb, 1998). Cependant, elles ne se soumettent pas facilement dans ce système de classification à cause de la complexité de leur structure et de leur mécanisme d'action. Leur classification se base sur plusieurs critères : le mode d'attaque de la chaîne peptidique, le pH d'activité enzymatique et la nature de résidu impliqué dans le site actif (Rao, 1998).

2. Protéases d'origine végétale

Les protéases ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, particulièrement chez les *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008). Plusieurs plantes sont utilisées pour isoler des enzymes protéolytiques. Celles-ci deviennent de plus en plus intéressantes. L'utilisation des protéases extraites des plantes pour générer des peptides bioactifs peuvent répondre à des besoins spécifiques en raison du régime alimentaire (Hogan, Zhang, Li, Wang, et Zhou, 2009).

Les protéases d'origine végétale les plus connues sont la papaïne, la bromélaïne, la cardosine, la zingibain et la ficine. Ces protéases permettent d'obtenir des hydrolysats de bonne qualité mais leur production dépend de nombreux facteurs externes tels que : les conditions de culture, le cycle de croissance, les recommandations climatiques, ce qui peut susciter des problèmes de coût et d'approvisionnement. Ces enzymes ne sont pas spécifiques (Durand, 1982).

L'utilisation des enzymes extraites de végétaux pour obtenir des peptides actifs par hydrolyse des caséines bovines sont intensifiées considérablement ces dernières années. Des nouveaux peptides antimicrobiens sont obtenus à partir de l'hydrolyse de la caséine bovine par une nouvelle protéase extraite du latex. Les peptides sont séquencés et évalués pour leur potentiel antimicrobien, contre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiellapneumoniae* et *Staphylococcus aureus* (Aarruda, 2012). Cependant, huit séquences peptidiques ayant des propriétés anti oxydantes sont identifiées. Ces peptides sont issus de l'hydrolyse de la caséine β bovine par l'extrait brut du latex de l'espèce *Ficus carica* (Di pierro, 2014).

Les études menées sur la plupart de ces extraits ont permis de classer les protéases selon leur mécanisme d'action. Cependant, plusieurs mécanismes d'action sont décrits pour les protéases végétales. Ce qui permet de les regrouper en fonction de la nature ou des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse. Six classes de protéases sont distinguées :

- Protéases à serine (EC 3.4.21)
- Protéases à thiol ou à cystéine (EC 3.4.22)
- Protéases à acide aspartique (EC 3.4.23)
- Métalloprotéases (EC 3.4.24)
- Protéases à thréonine (EC 3.4.25)
- Protéases à acide glutamique.

La plupart des protéases végétales sont classées comme des protéases à serine ou des protéases à acide aspartique (Beka, 2011).

III.Ficine

1. Définition

La ficine ou ficain est une cystéyl-protéase isolée à partir du latex (Robbins, B. H, 1930). Elle est présente dans plusieurs espèces de *Ficus*, comme *Ficus carica*. Une figue verte pesant 10-15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Uhlig, 1998). Le pH optimal de la ficine est de 5,0 à 8,0 et la température optimale est de 45 à 55 ° C (Polaina et Mac Cabe, 2007).

Actuellement, seulement trois fragments de ficine ont été étudiés : un fragment autour du site catalytique Cys, un fragment catalytique autour de His et le fragment N-terminal. La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près à la séquence correspondante dans la papaine (Devara, 2008). Cette dernière est utilisée dans l'industrie alimentaire pour améliorer la tendresse dans la viande (Sullivan et Calkins, 2010).

2. Caractéristique de la ficine

Ficus carica, le figuier commun, est une source de protéases qui sont utilisés pour coaguler le lait (Azarkan, 2011), et en immuno-hématologie pour la recherche d'anti corps irrégulier (Bruneton, 2009) , Son latex contient un agent protéolytique connu comme la ficine. Plusieurs études sont menées sur la purification et la caractérisation biochimique de la ficine, isolée à partir du latex de *Ficus carica* (Di pierro, 2014). Cependant, très peu de références sont disponibles sur les aspects structurels de la ficine jusqu'à ce jour par rapport à la papaïne, ainsi que d'autres protéases à cystéine connexes.

La ficine de *Ficus carica* est une chaîne polypeptidique unique ayant une masse moléculaire de 23,1 kDa. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (Devaraj, 2011). Elle est composée de 210 résidus d'acides aminés. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (Feijoo-Siota, 2011). L'enzyme est active à pH neutre et son inactivation complète se produit en dessous de pH 3,0 (Devaraj, 2011). Ainsi, la dénaturation induite par le pH de la ficine, conduit à un état partiellement plié à un pH acide. La structure dépliée partielle de la ficine à faible pH a montré les caractéristiques de globule fondu comme état intermédiaire comme étudié par différentes techniques biophysiques (Devaraj, 2009 ; Devaraj, 2011).

La ficine nécessite une cystéine ou d'autres agents réducteurs pour l'activation. La ficine comme la papaïne est inhibée par la cystéine de poulet. La ficine a également la température la plus basse de l'inactivation des trois protéases végétales primaires environ 70 °C) (Grzonka, 2007).

3. Mécanisme et spécificité d'action de la ficine

Les protéases à cystéine ont un mécanisme catalytique qui implique un groupe de cystéine dans le site actif (Gonzalez-Rabade, 2011).

Les protéases de *Ficus carica* ont montré une large spécificité vers les acides aminés basique et neutres :Gln, Val, Leu, Ala,Arg, His, Ser et Asn (Di pierro, 2014). La ficine intervient sur les protéines au niveau de résidus des acides aminés :Tyr, Phe et Val (Payne, 2009).). Par conséquent, le temps de coagulation diminue mais elle mène à la formation des peptides amers, à l'affaiblissement de concentration du lait caillé et à la dissociation du caillot. Ce qui affaibli le rendement du lait caillé (Akar et Fadyloglu, 1999 ; Payne, 2009).

4. Influence du pH, de la température et de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine

4.1 Effet du pH

Le pH influence le fonctionnement des enzymes. De ce fait, il existe un pH optimal : c'est-à-dire un pH autour duquel l'enzyme fonctionnera le mieux et sera plus efficace. Ce pH optimal, propre à chaque enzyme, se situe généralement pour la plupart des enzymes aux alentours de 7 (pH neutre). Cependant les enzymes agissant à tous les niveaux de l'organisme peuvent vivre à des pH très différents. Par exemple, le suc gastrique sécrété par l'estomac à un pH proche de 3. L'enzyme présente dans ce milieu est la pepsine. A l'inverse du pancréas qui sécrète un suc pancréatique acide où agit entre autres l'amylase pancréatique.

Plus on s'éloigne de ce pH, plus l'enzyme est dénaturée. En effet, l'acidité du milieu peut déformer la structure tertiaire d'une enzyme de façon plus ou moins importante. Cette déformation de l'enzyme modifie son action. L'enzyme ne fonctionne plus normalement et sa vitesse catalytique est réduite (J Dairy Sci, 2012). Ce qu'est pas le cas pour la ficine où il est démontré qu'à un pH faiblement acide, la ficine possède une activité catalytique plus élevée et l'activité relative maximale de la ficine a été trouvée à pH 5 ([Yufang yang et al., 2017](#)).

4.2 Effet de la température

Comme pour le pH, chaque enzyme possède une température optimale spécifique. Cette température est en moyenne comprise entre 37 et 40°C pour les enzymes humaines, ce qui correspond à la température naturelle du corps humain. Plus cette température baisse plus le mouvement moléculaire sera réduit et plus la cinétique enzymatique sera lente. En effet, lorsque la température du milieu augmente les particules (molécules ou ions) sont plus agitées ce qui favorise la rencontre des différents réactifs. Les molécules s'entrechoquent et libèrent de l'énergie. Cette énergie permet ensuite d'atteindre plus rapidement le palier de l'énergie d'activation nécessaire à la réaction. Dans ce cas, l'augmentation de la température a un effet positif sur la réaction. Ainsi à température basse, l'enzyme devient inactive (J Dairy Sci, 2012). Cependant, la température optimale et le temps de réaction pour l'activité relative maximale de la ficine est 35 °C durant de 2 heures. L'effet de la concentration de TMB (Tetramethylbenzidine) a également été étudié ([Yufang yang et al., 2017](#))

4.3 Effet de la concentration du substrat

L'activité d'une enzyme dépend de la concentration de substrat de la réaction. Si le substrat est en quantité très faible ou nulle, l'activité sera négligeable. Elle dépend aussi d'autres molécules présentes dans le milieu. Par exemple, la présence des inhibiteurs qui peuvent être des molécules de structures voisines du substrat de la réaction. Occupant sa place dans le site actif de l'enzyme, l'activité peut être fortement diminuée. D'autre part,

certaines molécules sont parfois indispensables pour que l'enzyme fonctionne comme les coenzymes et les ions.

La concentration optimale de Tetramethylbenzidine pour l'activité relative maximale de la ficine est de 0,80 mM. L'effet de la concentration en H₂O₂ sur l'activité relative est testé dans la gamme de 0,10 à 5,0 mM. L'activité relative augmente avec une concentration croissante de H₂O₂ dans la gamme de 0,10 à 0,80 mM. Avec une concentration de H₂O₂ supérieure à 0,80 mM, l'activité relative diminue. Des concentrations plus élevées de H₂O₂ inhiberont l'activité semblable à la peroxydase de la ficine et ce comportement est similaire à HRP30(Histidine riche en protéines) ([Yufang yang et al., 2017](#)).

5. Effet antimicrobien de la ficine

Plusieurs études ont démontré les propriétés antimicrobiennes de certaines protéines alimentaires (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine, les poissons...) ainsi que la possibilité de générer des peptides actifs par hydrolyse enzymatique de protéines *in vivo* ou bien *in vitro*. En effet, par hydrolyse enzymatique, *in vitro*, il était possible de libérer, à partir des protéines alimentaires, des peptides très actifs que les protéines initiales. Ou bien à partir de protéines dépourvue d'activité antimicrobienne à l'état native (Kitts et Weiller., 2003 ; Pellegrini, 2003).

Le lysozyme, la lactoferrine et l'ovotransferrine sont des exemples de ces protéines antimicrobiennes. En 1998, Ibrahim *et al.*, ont isolés par hydrolyse d'acide ménagée de l'ovotransferrine de poule un peptide (109-200) actif contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* K 12.1. Le lysozyme de blanc d'œuf de poule, libère après action de la clostripaine un peptide (98-112) ayant des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (Ibrahim *et al.*, 2001). Ainsi, il est démontré la présence de cinq peptides présentant des activités antimicrobiennes dans un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine. Dont trois d'entre eux correspondant aux séquences 107-141, 137-141 et 133-141 de la chaîne α et le quatrième à la séquence 126-145 de la chaîne β . Ces peptides montrent une activité contre *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus* (Nedjar-Arroume *et al.*, 2006 - 2008).

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de feuilles de *Ficus carica* présente une forte activité antibactérienne contre *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus anginosus*, *Prevotellaintermedia*, *Aggregatibacter*, *actinomyces comitans* et *Porphyromona gingivalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguinis* et *Streptococcus criceti* semblent moins sensibles. Les figes pourraient être utilisées comme un agent antibactérien

naturel dans les recettes de soins buccaux contre les bactéries pathogènes de la cavité buccale (Jeong M et *al.*, 2009). Ainsi, la spectroscopie de masse et le séquençage d'acides aminés d'une protéine antifongique caractérisée à partir du latex de *Ficus carica* ont donné : la séquence de sept acides aminés N-terminale de la protéine de faible poids moléculaire (6481 daltons) : Arg-Pro-Asp-Phe-Phe-Leu-Glu (Mavlonov GT, Ubaidullaeva KA, MI Rakhmanov, et *al.*, 2008).

6. Effet de la ficine sur l'agglutination des globules rouges humains

Une concentration de 1,5 mg de ficine par ml de cellules compactées, une plage de pH de 4,7 à 7,8, une température d'incubation de 22 à 37 ° C et une période d'incubation de 10 à 30 minutes se sont révélées être les conditions optimales pour l'agglutination des globules rouges A, B Rh-positives, agglutinables par les anticorps "complets" et "incomplets" homologues. De plus, la ficine s'est avérée plus efficace que la trypsine et la papaïne pour augmenter la sensibilité des cellules A, B Rh-positives à l'hémagglutination. Ainsi, l'activateur de protéase intracellulaire qui est la L-cystéine-HCl, a accéléré significativement la vitesse de sensibilisation des cellules O Rh-positives par la papaïne, mais pas par la ficine (TakashiMakinodan et *al.*, 1955).

PARTIE
MATERIEL &
MÉTHODES

1. Extraction de la ficine

Les feuilles utilisées dans ce travail proviennent des arbres unifères et bifères de l'espèce *Ficus carica*, cultivés dans la région de DIDOUCHE MOURAD (wilaya de CONSTANTINE).

L'extraction de la ficine est faite selon les étapes suivantes

- Collecte des feuilles (dauphine et marseillaise).
- Séchage de feuille de figuier (10g) les deux variétés.
- Broyage légère a main dans l'azote liquide.
- La Pesé de la masse dans un tampon (la masse x10).
- Agitation légère.
- L' Ajout de triton X (1%)
- Agitation légère.
- Macération pendant 24h.
- Filtration a gaze.
- Centrifugation 5000 tours / min pendant 10 minutes.
- Récupération du surnageant.

2. Caractérisation physico-chimique de la ficine extraite

2.1 Mesure de la teneur en matière sèche

La détermination de la teneur en matière sèche se fait selon la norme AFNOR NF VO4-207 .1ml d'échantillon de chaque variété de figuier est mis dans un verre de montre. Il est mis quelques minutes à l'étuve à 103°C pour que la masse obtenue soit constante et sèche. L'échantillon est ensuite séché par l'HCL dans un dessiccateur (Anonyme, 1993). Le pourcentage en matière sèche est alors déterminé par la relation :

$$MS(\%)=P \times 100 / P_i$$

où :

P_i : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à 103°C.

2.2 Mesure du pH

Le pH est mesuré directement en utilisant un pH-mètre électronique (Hanna Instruments Digital, Bench-model PH Mètre Model HI-2210) qui affiche la valeur sur écran, après avoir trempé l'électrode dans un bécher contenant la solution de l'extrait enzymatique.

2.3 Dosage des protéines dans l'extrait enzymatique

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé selon la méthode de Bradford. C'est une méthode rapide et sensible pour la quantification des quantités en microgrammes (μg) de protéines en utilisant le principe de la liaison protéine-colorant.

- **Principe**

Cette méthode, développée par Bradford (1976), repose sur l'utilisation de bleu brillant de Coomassie G250. En milieu acide, ce colorant se lie aux protéines, des liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (Arg, His, et Lys) et interactions hydrophobes avec les acides aminés hydrophobes. Cette liaison entraîne un déplacement du pic d'absorption de 465 nm à 595 nm. Un changement de teinte du milieu qui passe du brun orangé au bleu. plus qu'il y a des protéines dans la solution, plus la coloration bleue est intense, c'est à dire que l'absorption à 595 nm est élevée.

- **Mode opératoire**

Pour 100 μl de chaque extrait enzymatique, 3ml de réactif de Bradford est ajouté homogénéisé immédiatement avec un vortex. Après 5 minutes de repos à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595nm. L'essai est répété trois fois pour chaque extrait enzymatique.

3. Mesure de l'activité enzymatique des extraits de la ficine

3.1 Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait selon la méthode de (Berridge, 1955), (Libouga, 2006). C'est une évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de caséine visible à l'œil nu sur la paroi de tube incliné subissant un lent mouvement de rotation et elle est exprimée par la force coagulante (F). Cette dernière donnée en unité soxhlet (US) représente le nombre de volume du lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant en 40min à 35°C. L'activité coagulante est calculée selon la formule suivante :

$$F = 2400 \times V / T \times v$$

V : volume du lait

T : temps de coagulation en secondes

v : volume de l'extrait d'enzyme

L'activité coagulante des extraits, peut être également exprimée en «force coagulante de SOXHLET » (F), selon la relation suivante : (BOURDIER et LUQUET, 1981 ; SIBOUKEUR, 2005).

$$F=UP/0,0045$$

3.2 Détermination de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique de la ficine est déterminée en employant la caséine (protéine du lait) comme substrat.

- **Principe**

Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé selon la méthode d'Anson (1938). Elle est basée 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 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 (Mechakra, 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 (Mechakra, 1999)

- **Réaction enzymatique**

Il s'agit de faire faire agir la ficine (extrait enzymatique) sur le substrat qui est la caseine du lait.

- **Mélange réactionnel**

- 1ml d'extrait enzymatique (ficine)
- 1,5 ml du tampon phosphate (0.1M) pH 7
- 2,5 ml de la caséine (solution de la caséine 1% préparé dans le tampon phosphate)
- Agitation et incubation pendant 1 heure au bain-marie à 40°C
- Arrêt de la réaction par l'addition de 5ml du TCA froid à 4%
- Laisser reposer 30 minutes dans un bain de glace

- Une centrifugation à 6200g pendant 5 minutes à 4°C
 - **Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique**

Le dosage colorimétrique est réalisé par le mélange de 0,5 ml de filtrat avec 2,5 ml Na_2CO_3 . 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 ciocalteu à 50%. Après incubation à température ambiante pendant 30 min. la lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm au spectrophotomètre.

Les mesures de l'activité enzymatique sont faites en se référant à l'équation de la courbe d'étalonnage de la Tyrosine et par l'application de la loi:

$$1 \text{ Unité International} = 1 \text{ tyrosine} / 1 \text{ ml de l'extrait enzymatique} / 1 \text{ heure} .$$

4. Effet de la température, du pH et de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine

4.1 Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité enzymatique (protéolytique) est étudié en mesurant l'activité enzymatique en fonction des températures (de 30°C jusqu'à 70°C) en utilisant la caséine bovine comme substrat de la réaction enzymatique.

- **Protocole**

Il s'agit de préparer dix tubes à essai pour chaque variété de figuier *Ficus carica* pour les différentes températures (30°, 40°, 50°, 60°, 70°), avec un tube de témoin pour chaque variété.

Chaque tube contient :

- 1ml d'extrait enzymatique.
- 1.5 ml du tampon phosphate (0.1M) pH 7.
- 2.5 ml de caséine.
- Agitation et incubation pendant 1h au bain-marie à (30°, 40°, 50°, 60°, 70°).
- Arrêt de la réaction par l'addition de 5ml du TCA froid à 4%.
- Laisser reposer 30 min dans un bain de glace.
- Centrifugation à 6200g pendant 5min à 4°C.

4.2 Effet du pH

L'effet du pH sur l'activité protéolytique est étudié en mesurant l'activité enzymatique en fonction de la variation de pH, avec un intervalle allant de pH= 4 jusqu'au pH= 9, en utilisant la caséine comme substrat de la réaction enzymatique.

- **Protocole**

Douze tubes à essai pour chaque variété de figuier pour les différents pH (4, 5, 6, 7, 8, 9). Avec six tubes de témoins pour chaque variété.

Chaque tube contient :

- 1ml d'extrait enzymatique
- 1.5 ml du tampon phosphate (0.1M) pH (4, 5, 6, 7, 8, 9)
- 2.5 ml de caséine.
- Agitation et incubation pendant 1h au bain-marie à 40°.
- Arrêt de la réaction par l'addition de 5ml du TCA froid à 4%.
- Laisser reposer 30 min dans un bain de glace.
- Centrifugation à 6200g pendant 5min à 4°C.

4.3 Effet de la concentration du substrat (caséine) sur l'activité enzymatique de la ficine

L'effet de la concentration de la caséine sur l'activité enzymatique de la ficine est étudié, en mesurant l'activité protéolytique à trois concentrations différentes de la caséine du lait, qui est toujours le substrat de la réaction enzymatique.

- **Protocole**

Préparer six tubes à essai pour chaque variété du figuier pour les trois concentrations (1% . 2% . 3%), plus 3 tubes de témoin pour chaque variété. Chaque tube contient :

- 1ml d'extrait enzymatique.
- 1.5 ml du tampon phosphate (0.1M) pH 7.
- 2.5 ml de caséine (1%, 2%, 3%)
- Agitation et incubation pendant 1h au bain-marie à 40°C
- Arrêt de la réaction par l'addition de 5ml du TCA froid à 4%.
- Laisser reposer 30 min dans un bain de glace.
- Centrifugation à 6200g pendant 5min à 4°C.

5. Etudes de l'effet anti microbien de la ficine

- **Antibiogramme standard en milieu gélosé**

- ✓ **Méthode des disques**

Le principe de l'antibiogramme est de mettre en culture des bactéries et d'appliquer un disque imbibé par la ficine extraite de chaque variété de figuiers.

Quinze boîtes de gélose sont ensemencées pour tester l'effet antibactérien de la ficine sur les espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteussp* et *Bacillus subtilis*.

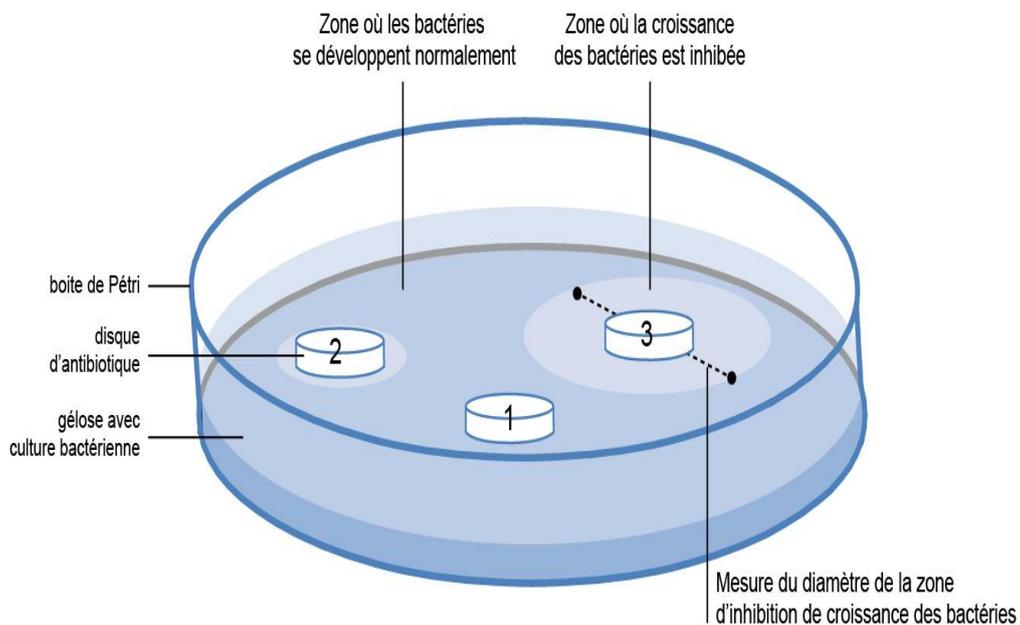


Figure 10 : Illustration représente la méthode des disques de l'antibiogramme.

- **Manipulation**

Nettoyer la paillasse avec le désinfectant afin de minimiser les risques de contamination extérieur lors de la manipulation.

Allumer le bec Bunsen afin de stériliser l'air alentour et détruire ainsi les organismes pouvant altérer les résultats. Toute la manipulation doit se faire dans un rayon de 20/25 cm autour de la flamme.

A l'aide d'une pince stérile, un disque pré-imbibé par la ficine est déposé au centre d'une boîte de pétri déjà ensemencée par une des souches bactérienne utilisées. L'opération est renouvelée pour le reste des souches bactériennes pour les deux variétés de la ficine. En prenant soin de changer les pinces à chaque bio-disque et à chaque souche bactérienne. La lecture des résultats est effectuée après 24 h et 48h. Le résultat positif se manifeste par

l'observation d'un halo (zone clair) entourant les bio-disques avec absence de croissance bactérienne dans la même zone.

PARTIE
RÉSULTATS &
DISCUSSIONS

1. Caractérisations physicochimiques de la ficine extraite

1.1 Mesure de la teneur en matière sèche

Les résultats de mesures de la matière sèche des deux variétés de la ficine extraite, sont regroupés dans le tableau 2.

Selon le tableau 2, le 1 ml du surnageant obtenu de la ficine extraite de la variété Dauphine contient 15.73% de la matière sèche. Cette valeur est supérieure à celle obtenue de la variété Marseillaise avec 9% de la matière sèche.

Tableau 02 : Caractéristiques physico-chimiques des deux variétés du figuier

Variétés	Variété Dauphine	Variété Marseillaise
Caractéristiques		
Poids de verre de montre (g)	106,66	101,5
Poids de 1ml de l'extrait + poids de verre de montre (g)	107.69	102.48
Le poids final après séchage (g)	106.80	101.59

1.2 Caractéristiques de l'extrait brut de la ficine

- **Variété Marseillaise**

L'extrait brut de la ficine obtenu est une solution de couleur brune claire avec un aspect homogène et de texture peu visqueuse. Le pH de l'extrait est de 6,2.

- **Variétés Dauphine**

L'extrait brut de la ficine obtenu est une solution de couleur brune claire avec un aspect homogène et texture peu visqueuse. Le pH de l'extrait est de 6,6.

Tableau 03 : Caractéristiques de l'extraite brute des deux variétés du figuier.

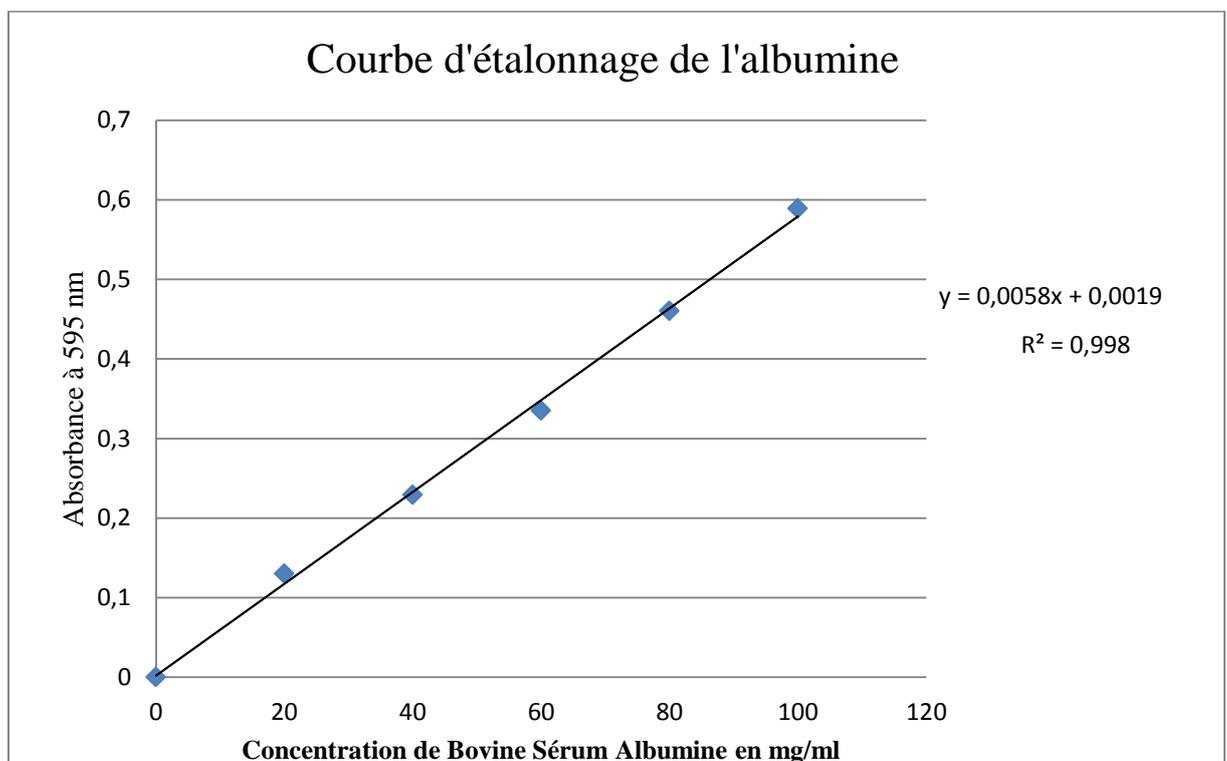
Variétés	Variété Marseillaise	Variété Dauphine
Caractéristiques		
Ph	6,2	6,6
Couleur	Brune claire	Brune claire
Texture	Liquide peu visqueux	Liquide peu visqueux

1.3 Dosage des protéines de l'extrait enzymatique

➤ Gamme d'étalonnage de l'Albumine

Tableau 04 : Préparation de la courbe d'étalonnage de l'albumine

Bovine sérum albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Volume de h2o	100	80	60	40	20	0
Bleu de coomassie (ml)	3	3	3	3	3	3
La lecture de l'absorbance à lieu à 595 nm						

**Figure 11**: Courbe d'étalonnage de la Bovine Sérum Albumine

Selon la méthode de Bradford et en se référant à la courbe d'étalonnage de l'albumine, la concentration des protéines est déterminée. Les résultats obtenus sont:

- **Variété Marseillaise**

La teneur en protéines est de 77,3 mg/ml. Cette teneur est proche de celle trouvée par Siar (2014) estimée à 89,31 mg/ml et inférieure à celles obtenues par Devaraj (2008) évaluées à 150 mg/ml. Elle est aussi supérieure à celle obtenue par Nouani (2009) estimée à 22 mg/ml.

- **Variétés Dauphine**

La teneur en protéines est de 68,9 mg/ml. Cette teneur est proche de celle trouvée par Siar (2014) estimée à 89,31 mg/ml et inférieure à celles obtenues par Devaraj (2008), évaluées à 116 mg/ml et 150 mg/ml. Elle est aussi supérieure à celle obtenue par Nouani (2009) estimée à 22 mg/ml. Ces résultats montrent que, la teneur en protéines de la ficine extraite de la variété Marseillaise est supérieure à celle de la ficine extraite de la variété Dauphine.

2. Mesure des activités enzymatiques des extraits de la ficine

2.1 Activité coagulante

- **Variété Marseillaise**

Les résultats indiquent que l'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de 199,1 UP cette valeur est proche de celle trouvée par Siar (2014), Williams et al., (1968) qui ont trouvé 121,09 UP et 320 UP respectivement; elle est largement inférieure à ceux rapportés par Nouani et al., (2009) estimée à 1500 UP.

- **Variété Dauphine**

Les résultats indiquent que l'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de 171,8 UP cette valeur est proche de celle trouvée par Siar (2014), Williams et al., (1968) qui ont trouvé 121,09 UP et 320 UP respectivement; elle est largement inférieure à ceux rapportés par Nouani et al., (2009) estimée à 1500 UP.

- L'activité coagulante de la ficine de la variété Dauphine est inférieure à celle de la ficine de la variété Marseillaise

2.2 Force coagulante

- **Variété Marseillaise**

La force coagulante de l'extrait de la ficine est de 1/44244,44. Cette valeur est fonction de la quantité du lait coagulable. Cependant, 1ml de l'extrait enzymatique est capable de coaguler 44 litres de lait. Cette force est inférieure de celles déjà rapportée, qui est estimées à 1/40000 Nouani (2009) (Tableau 5).

- **Variété Dauphine**

La force coagulante de l'extrait de la ficine de cette variété est de 1/38177,77. Cette valeur est comme dans le cas de la variété Marseillaise, fonction de la quantité du lait coagulable. Dont, 1ml de l'extrait enzymatique est capable de provoquer la coagulation de 38 litres de lait. Ce résultat montre que cette force coagulantes est supérieure à celles déjà rapporté, estimée à 1/40000 Nouani (2009)(Tableau 5).

- La force coagulante de la variété la Marseillaise est inférieure de celle de la variété la Dauphine

Tableau 05: Les valeurs des activités coagulantes et les forces coagulantes des deux variétés Marseillaise et Dauphine.

Variétés	Variété Marseillaise	Variété Dauphine
Activités		
Activité coagulant (UP)	199,1	171 ,8
Force coagulante (F)	1 /44244,44	1/38177,77

2.3 Détermination de l'activité protéolytique

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

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

Tableau 06 : Préparation de la courbe d'etalonnage de la tyrosine

Concentrations des dilutions (µl/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
TCA (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante						
Réactif dilué à ½ (ml)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

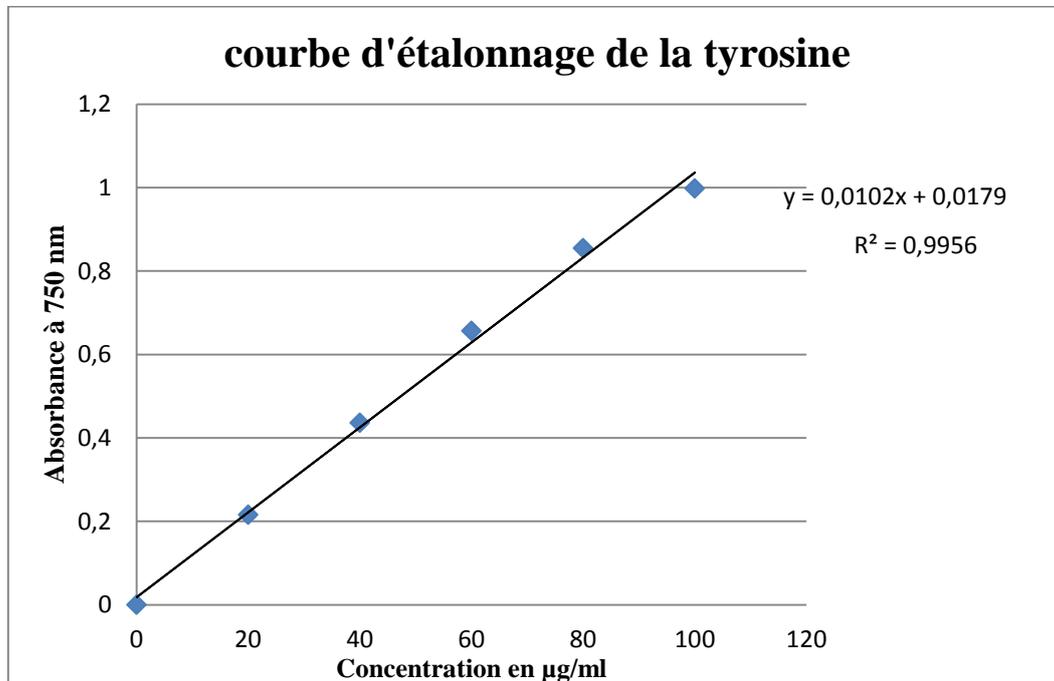


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine (100 µl/ml)

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de tyrosine avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml en se référant à la courbe d'étalonnage de la tyrosine on a trouvé les activités enzymatiques suivantes :

- **La variété Marseillaise**

Activité protéolytique = 95UI

- **La variété Dauphine**

Activité protéolytique = 83 UI

➤ les conditions suivantes pH de 7, une température de 40°C et une concentration de substrat 1% de la caséine. On a trouvé une activité protéolytique de la variété Dauphine 83 UI, elle est inférieure à celle de la variété la Marseillaise (95 UI)

3. Effet de la température, pH et la concentration du substrat (la caséine) sur l'activité enzymatique

Les résultats de mesures de l'effet de la température, du pH et de la concentration du substrat qui est la caséine bovine sont mentionnés dans le tableau 7, tableau 8 et tableau 9.

3.1 Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité enzymatique protéolytique des extraits enzymatiques des feuilles étudiés est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes températures d'incubation (de 30 à 70 °C).

Tableau 07: Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différentes températures pour les deux variétés Marseillaise et Dauphine.

T°	30°	40°	50°	60°	70°
Variété Dauphine					
Tube1	0.387	0.398	0.428	0.434	0.347
Tube2	0.393	0.384	0.439	0.442	0.354
Moyenne	0.390	0.391	0.433	0.438	0.350
Activité enzymatique (UI)	74.6	74.8	83.2	84.2	66.6
Variété Marseillaise					
Tube1	0.473	0.474	0.480	0.486	0.453
Tube2	0.480	0.478	0.487	0.485	0.450
Moyenne	0.476	0.476	0.483	0.485	0.451
Activité enzymatique (UI)	91.8	91.8	93.2	93.6	86.8

La figure (13) montre que l'activité enzymatique des extraits de la ficine est dans son maximum dans l'intervalle de température de 50°C à 60°C. Cependant, l'activité enzymatique est de 84.2 UI pour la variété Dauphine et 93.6 UI pour la Marseillaise à 60°C, à 70°C l'activité enzymatique de la ficine diminue à 66.6 UI pour la variété Dauphine et 86.8UI pour la variété Marseillaise. Par comparaison de ces résultats, la variété marseillaise a une forte activité enzymatique par rapport à celle de la Dauphine. L'intervalle de température optimale obtenu pour l'activité enzymatique des deux variétés est proche à ce qui est trouvée par (Fadyloglu, 2001) qui est de 60°C. Par contre, il est inférieur à la valeur trouvée par (Siar, 2014),75°C.

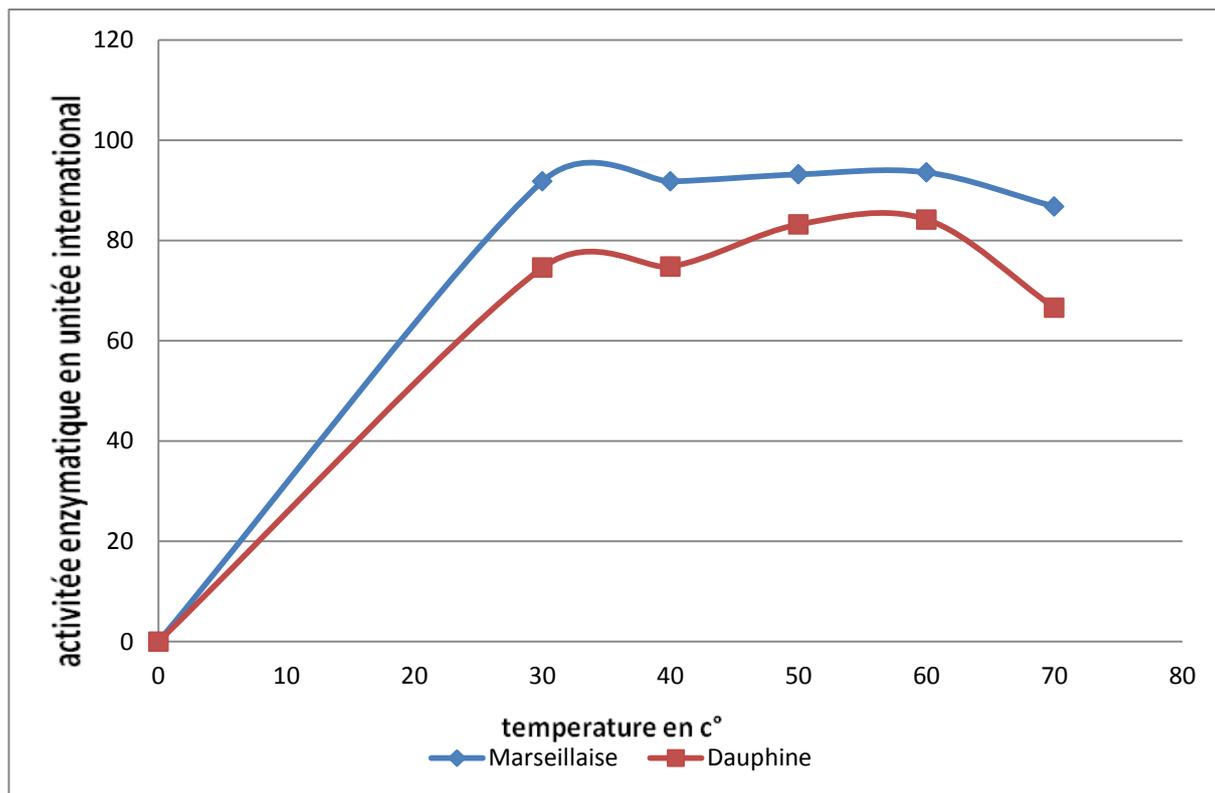


Figure 13: Représentation graphique de l’effet de la variation de la température sur l’activité enzymatique de la ficine des deux variétés de figuiers.

3.2 Effet du pH

Selon le tableau 8 et la figure 14, la variation du pH a un effet sur l’activité protéolytique de la ficine extraites des deux variétés Dauphine et Marseillaise.

Tableau 08: Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différents pH pour les deux variétés Marseillaise et Dauphine.

pH	4	5	6	7	8	9
Tubes						
Variété Dauphine						
Témoin	0.152	0.189	0.201	0.217	0.204	0.200
Tube1	0.208	0.292	0.306	0.377	0.370	0.292
Tube2	0.212	0.288	0.314	0.383	0.382	0.298
Moyenne	0.210	0.290	0.310	0.380	0.376	0.295
Activité enzymatique (UI)	38.6	54.6	58.6	72.6	71.8	55.6
Variété Marseillaise						

Témoin	0.211	0.236	0.247	0.262	0.295	0.317
Tube1	0.270	0.300	0.345	0.448	0.330	0.354
Tube2	0.282	0.308	0.355	0.432	0.338	0.374
Moyenne	0.276	0.304	0.350	0.440	0.384	0.364
Activité enzymatique (UI)	51.8	57.4	66.6	84.6	73.4	69.4

Les résultats obtenus montrent que le pH optimal est 7, c'est le même pH optimal pour les deux variétés Dauphine et Marseillaise (Figure 14). L'activité enzymatique de la variété Marseillaise est de 84.6 UI et celle de la Dauphine est 72.6 UI. Donc la variété Marseillaise a une forte activité enzymatique par rapport à celle de la variété Dauphine.

La valeur du pH optimal (7) est proche à celle de (Fadyloglu, 2001) qui se situe entre 5 et 8. Cet intervalle est obtenu à partir de la ficine extraite du latex de l'espèce *Ficus carica*.

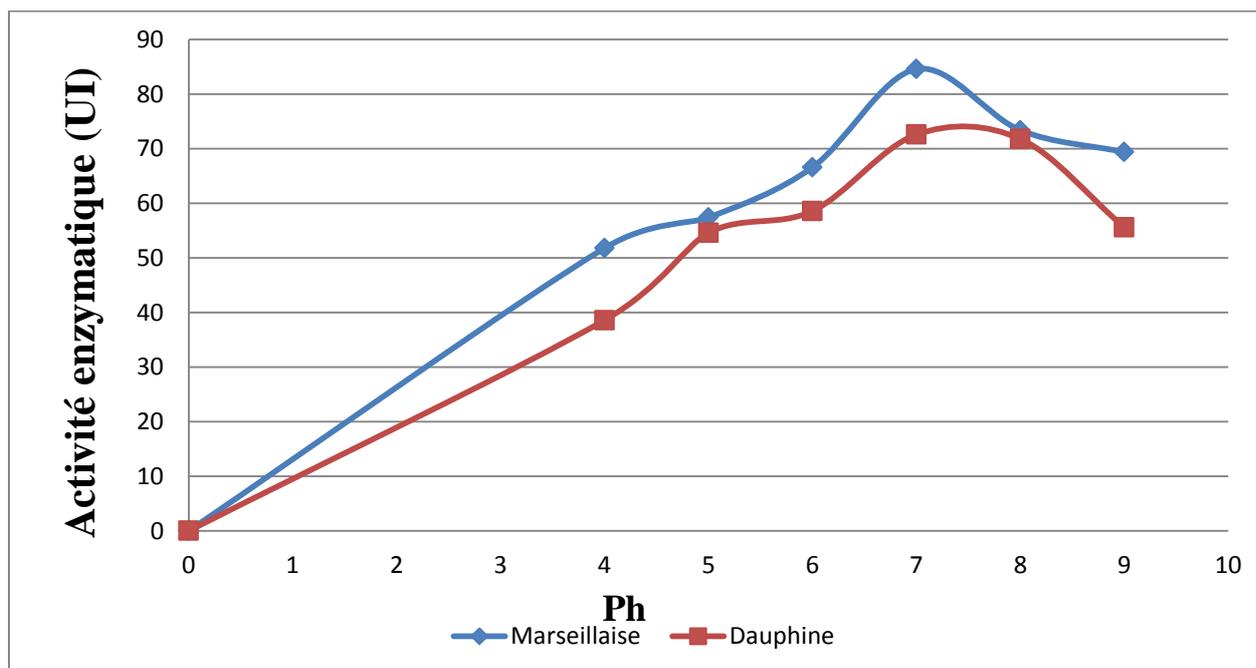


Figure 14 Représentation graphiques de l'effet de la variation du pH sur l'activité enzymatique de la ficine des deux variétés Marseillaise et Dauphine.

3.3 Effet de la concentration du substrat (caséine bovine)

L'effet de la concentration du caséine du lait sur l'activité enzymatique protéolytique des extraits enzymatiques des feuilles étudiés est déterminé par la mesure de l'activité enzymatique à différentes concentrations de cette substrat (la caséine) (1%, 2% et 3%).

Tableau 09: Les absorbances et les activités enzymatiques obtenues à différents concentrations de la caséine du lait, pour les deux variétés Marseillaise et Dauphine.

concentration Tubes	1%	2%	3%
Variété Dauphine			
Témoin	0.212	0.241	0.244
Tube1	0.270	0.290	0.560
Tube2	0.261	0.318	0.531
Moyenne	0.265	0.304	0.541
Activité enzymatique (UI)	49.6	57.4	104.8
Variété Marseillaise			
Témoin	0.223	0.250	0.251
Tube1	0.310	0.379	0.580
Tube2	0.290	0.398	0.591
Moyenne	0.300	0.388	0.585
Activité enzymatique (UI)	56.6	74.2	113.6

D'après le tableau 9 et la figure (15), on constate que a 3% de concentration de caséine, l'activité enzymatique est plus élevée.

L'activité enzymatique de la variété Marseillaise est 113.6 UI et celle de la Dauphine est 104.8 UI. Donc la variété Marseillaise a une forte activité enzymatique par rapport a celle de la Dauphine.

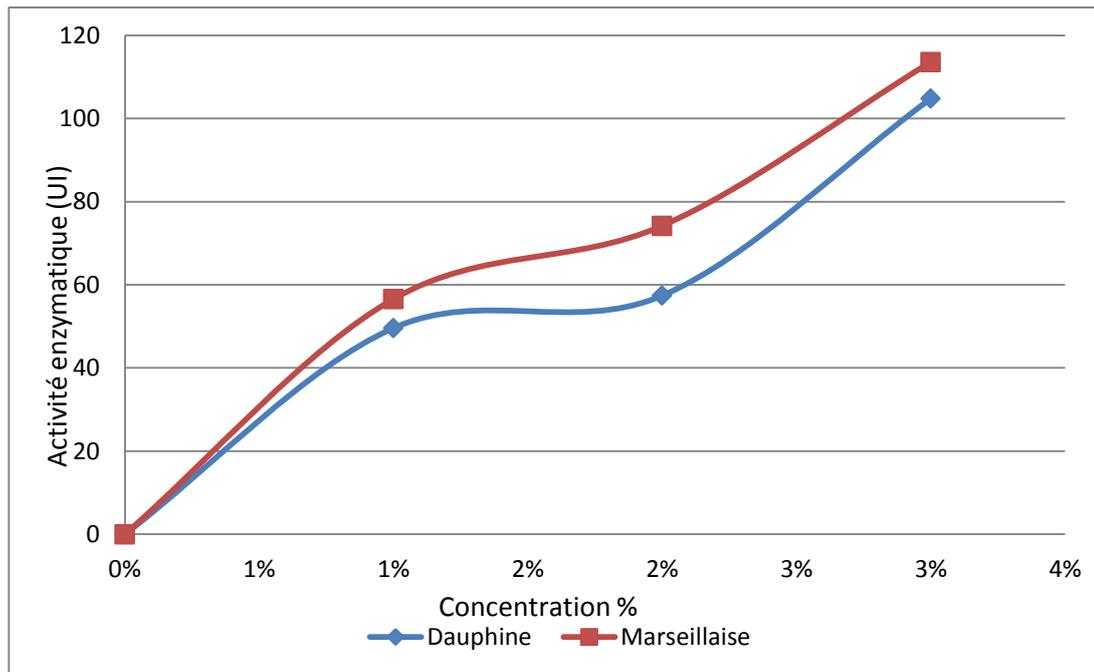


Figure 15: Représentation graphique de l'effet de la concentration du substrat sur l'activité enzymatique de la ficine des deux variétés Marseillaise et Dauphine.

4. Activité protéolytique de la ficine dans les conditions optimales de pH, température et concentration du substrat (la caséine)

D'après les résultats obtenus précédemment, le dosage de l'activité enzymatique de la ficine à différentes températures (de 30°C à 70°C), à différent pH (4, 5, 6, 7,8 et 9) et à différentes concentrations du substrat de la réaction, On constate que, l'activité enzymatique de la ficine est optimale à une température de 60°C. Elle est de 84.2 UI pour la variété Dauphine et de 93.6 UI pour la variété Marseillaise. Ainsi, l'activité enzymatique de la ficine est optimale au pH = 7 pour les deux variétés avec les valeurs de l'activité enzymatique protéolytique de 72.6 UI pour la variété Dauphine et de 84.6 UI pour la variété Marseillaise. Avec une activité optimale en concentration de substrat de 3% (104.8 UI pour la variété Dauphine et de 113.6 UI pour la variété Marseillaise).

➤ Malgré que la ficine des deux variétés a les mêmes circonstances de pH et T° et de la concentration du substrat la caséine on remarque que l'activité enzymatique de la ficine de la variété Marseillaise est supérieure a celle de la ficine de la variété Dauphine

➤ **Calcule de l'activité protéolytique aux conditions optimales**

Le Calcul de l'activité enzymatique aux conditions optimales est effectué en suivant le protocole de la mesure de l'activité protéolytique mais cette fois ci avec les conditions suivantes :

pH= 7

T°= 60°

3% concentration du substrat

L'activité enzymatique (Variété Dauphine)= 111.3 UI

L'activité enzymatique (Variété Marseillaise) = 120.5

➤ Calcul de l'activité spécifique

L'activité spécifique = l'activité enzymatique / le taux des protéines

- Activité spécifique (Variété Dauphine) = $111.3 / 68.9 = 1.61$ (U/mg)
- Activité spécifique (Variété Marseillaise) = $120.5 / 77.3 = 1.55$ (U/mg)

L'activité spécifique (Variété Dauphine) = 1.61 (U/mg)

L'activité spécifique (Variété Marseillaise) = 1.55 (U/mg)

En comparant les résultats de la ficine des deux variétés du figuier *Ficus carica* nous remarquons que l'extrait de la ficine a une activité spécifique de 1.61U/mg pour l'extrait de la ficine (variété Dauphine) et 1.55U/mg pour l'extrait de la ficine (variété Marseillaise)

➤ La ficine de la variété Dauphine a une activité spécifique proche de celle de la ficine de la variété Marseillaise

5. Etudes de l'effet antibactérien de la ficine

Pour les espèces *Escherichia coli* , *Bacillus subtilis* , *Staphylococcus aureus* on remarque que y a l'absence de développement bactérien autour du disque imbibé par la ficine pour les deux variétés de la ficine (la Dauphine et la Marseillaise) ce qui signifie que l'antibiotique (la ficine) est efficace malgré que ces deux espèces de bactérie Sont des

bactéries naturellement très résistantes Aux antibiotiques et adaptant rapidement aux attaques médicamenteuses.

Il y a pas une croissance bactérien avec l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* mais cette fois ci est avec un grand diamètre d'inhibition car l'halo d'inhibition avec cet espèce est un peu plus grand si en le comparant avec les halos des autres espèces (*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) par contre pour l'espace *Proteus* on trouve que la zone autour des disque imbibé par l'antibiotique (la ficine) les bactéries se développent normalement.

- Pour l'espèce *Escherichia coli*

Témoin

la Variété Dauphine

la Variété Marseillaise



Figure 16 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce *Escherichia coli*.

- Pour l'espèce *Proteus*

Témoin

la Variété Dauphine

la Variété Marseillaise

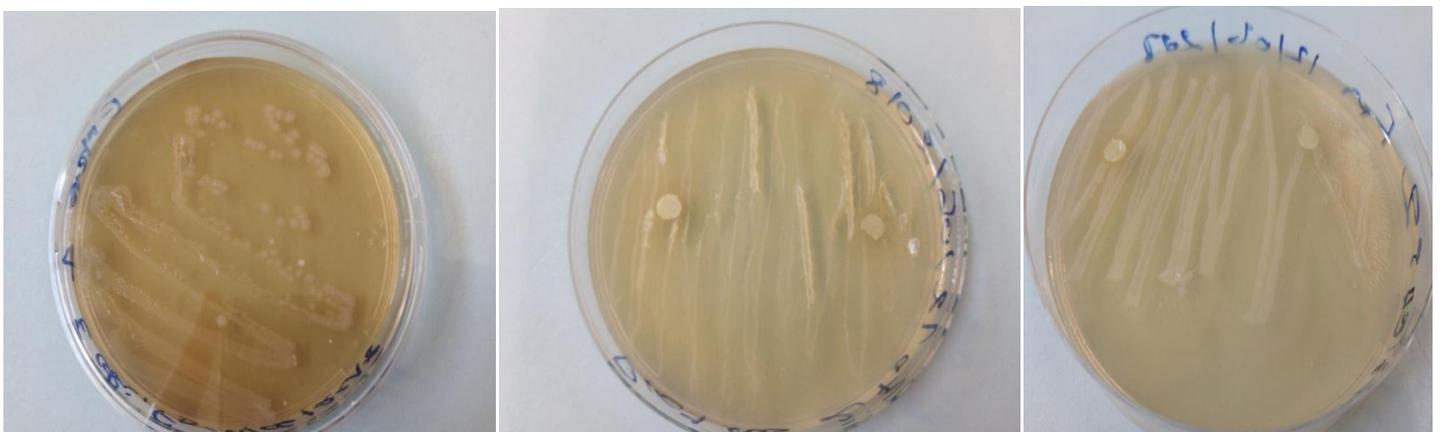


Figure 17: Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce *Proteus*.

- Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

Temoin

la variété Dauphine

la variété Marseillaise

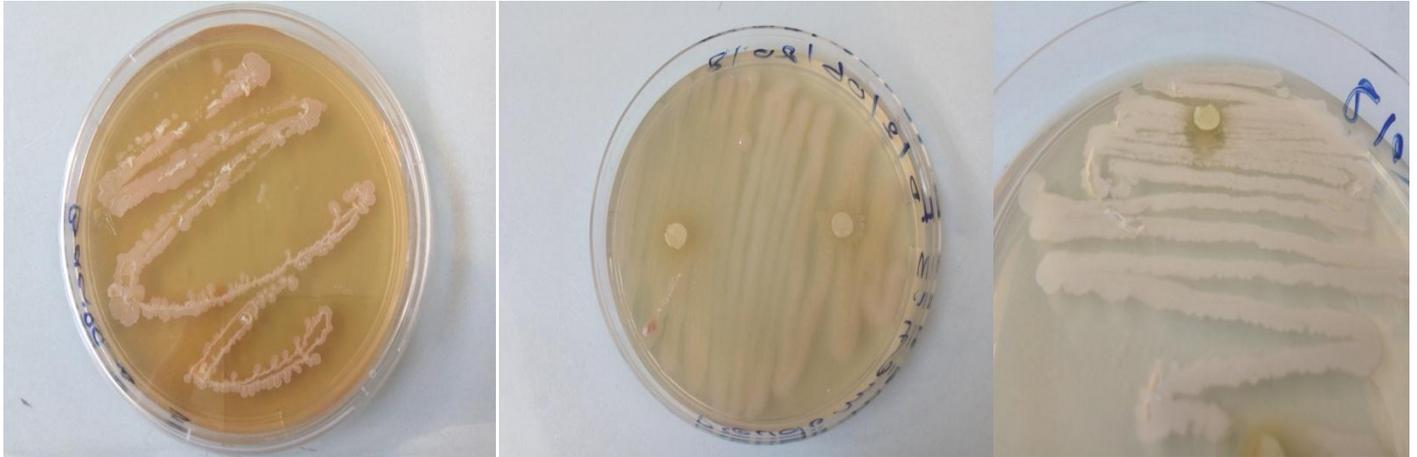


Figure 18 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

- Pour l'espèce *Bacillus subtilis*

Témoin

la variété Dauphine

la variété Marseillaise

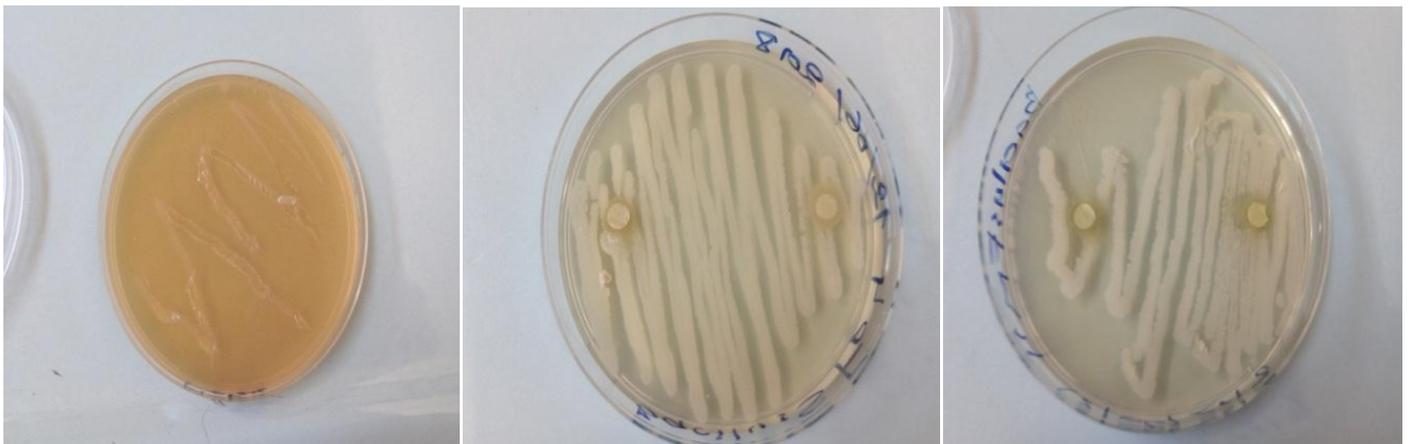


Figure 19 : Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce *Bacillus subtilis*.

- Pour l'espèce *Staphylococcus aureus*

Témoin

la variété Dauphine

la variété Marseillaise

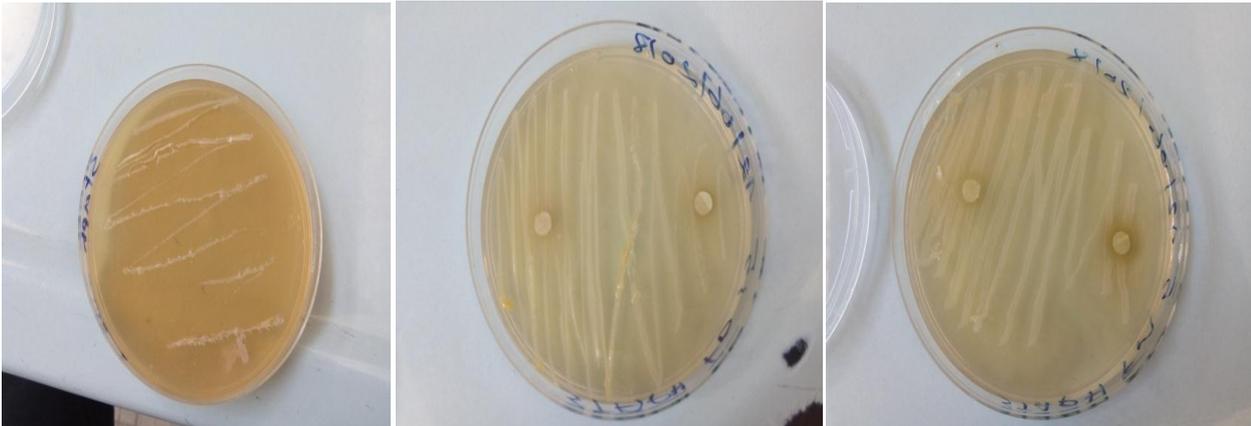


Figure 20: Photographie représente le témoin et les résultats après incubation pour l'espèce *Staphylococcus aureus*.

la ficine extraite des deux variétés Dauphine et Marseillaise de l'espèce *Ficus carica* à un effet antibactérien vis-à-vis des espèces bactériennes *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

CONCLUSION

Conclusion

Le figuier de l'espèce *Ficus carica* est une source des protéases végétales qui se trouve au niveau de ses différentes parties : feuilles et latex. Ces enzymes sont d'un intérêt médical et industriel très importants .

La ficine (EC 3.4.22.3), est une endopeptidase à cystéine. Elle est présente dans le système enzymatique des feuilles du figuier. Elle est d'une importance particulière, en raison de ses propriétés physico-chimiques importantes

L'objectif de ce travail est l'extraction du système enzymatique des feuilles du figuier de l'espèce *Ficus carica* de deux variétés : Dauphine et Marseillaise. L'étude de quelques caractéristiques physico-chimiques de la ficine extraite est également réalisée. Et même l'activité antibactérienne

Les résultats obtenus montrent que le profil des activités protéolytiques déterminé, en fonction du pH a permis de caractériser la ficine des deux variétés Dauphine et Marseillaise. Avec un pH optimal de 6.6 et 6.2 respectivement. L'étude de l'effet coagulant de la ficine de la variété Dauphine a donné une activité coagulante de 171,8 UP avec une force coagulante de 1/38177,77 F. Pour la variété Marseillaise l'activité coagulante est de 199,1 UP avec une force coagulante de 1/44244,44 F.

L'étude des effets de la température, du pH et de la concentration du substrat sur l'activité de la protéase extraite a donné un pH optimum de 6,8 et une température optimale de 60°C et une concentration du substrat de 3% de caséine du lait, pour les deux variétés de la ficine..

L'étude de l'effet antibactérien de la ficine, des deux variétés, effectuée sur quelques espèces bactériennes pathogènes montre que notre enzyme a un effet antibactérien très important sur : *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Ainsi, la ficine extraite des deux variétés a un effet moins important sur les espèces bactériennes : *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cependant, aucune zone d'inhibition n'est constatée pour l'espèce *Proteus sp*. Ce qui donne une première estimation de la résistance de cette espèce à la ficine.

Par cette étude, notre travail a montré encore une fois le rôle prépondérant des enzymes protéolytiques d'origine végétales. En perspective, il est intéressant de purifier la ficine et d'optimiser ses caractéristiques physico-chimiques, afin d'une application médicale et industrielle.

LES RÉFÉRENCES

Références bibliographiques

- **AKAR B., ET FADYLOGLU S. (1999).** Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality*, **22**: 671-680.
- **ARRUDA M. S., SILVA F. O., EGITO A. S., SILVA T. M. S., LIMA J. L., PORTO A.L. F. (2012).** New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensi*. *LWT-Food Science and Technology*, **49**: 73-79.
- **AZARKAN, M., DIBIANI, R., BAULARD, C., BAEYENS-VOLANT, D., (2011).** Effects of mechanical wounding on *Carica papaya* cysteine proteinases accumulation and activity. *Int. J. Biol. Macromol*, **38**: 216–224.
- **BARRETT A. J. (1994).** Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*, **244**: 1–15.
- **BEKA R. G. (2011).** Une alternative végétale en fromagerie: Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*; Etude biochimique et application technologique. Thèse de doctorat en Sciences Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Université de Lille I. 167p.
- **BENJAMIN H. ROBBINS. (1930).** *J. Biol. Chem*, **87**: 251-257.
- **BRADFORD M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- **BRETAUDEAU J., FAURE Y., (1990).** Atlas d'arboriculture fruitière. Ed. Tes et doc Lavoisier, 3eme Edition, **4**: 289.
- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. Éd Lavoisier, France. 1292p.
- **DELRIEU D., (1997).** Figue de l'espèce *Ficus carica* , **4**: 10-13.
- **DEVARAJ K.B., GOWDA LALITHA R. et PRAKASH V. (2009).** An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.) *Phytochemistry* **69**: 647–655.
- **DEVARAJ K.B., PARIGI RAMESH KUMAR, PRAKASH V. (2011).** Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry*, **46**: 458–464.

- **DEVARAJ KB., KUMAR PR. AND PRAKASH, V. (2008).** Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23**: 11417–11423.
- **DI PIERRO G., O'KEEFFE M.B., POYARKOV A., LOMOLINO G., FITZGERALD R.J. (2014).** Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica L.* derived proteinase. *Food Chemistry*. Journal home page. 7p .
- **DOMSALLA A, MELZIG MF. (2008).** Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med*, **74**:699–711.
- **DURAND P. (1982)** "Etude de la fraction azotée soluble de l'anchois salé au cours de la maturation." *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **4**: 271-281.
- **EL-SHOBAKI .F .A., EL-BAHAY A.M., ESMAIL R.S.A., ABD EL MEGEID A.A. AND ESMAIL N.S. (2010).** Effect of figs fruit (*ficus carica L.*) and its leaves on hyperglycemia in alloxan diabetic rats. *world journal of dairy and food sciences* **5**: 47-57.
- **FEIJOO-SIOTA L. et VILLA T. G., (2011).** Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* **4**: 1066–1088.
- **GONZALEZ-RABADE N, BADILLO-CORONA JA, ARANDA-BARRADAS JS, OLIVER-SALVADOR MC (2011).** Production of plant proteases in vivo and in vitro - a review. *Biotechnol Adv* **29**:983–996.
- **GRZONKA Z., KASPRZYKOWSKI F et WICZK W. (2007).** Cysteine proteases. CHAPTER 11. J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), *Industrial Enzymes*, p181–195.
- **HASSANANE M.S., EL FIKY S., ABD EL BASET S.A., ET AL., (2001).** A geotaxis study of the *Citrullus colocynthis* extract. *Bulletin Nat. Res. Cen. (Egypt)*; **26**: 223–235.
- **HOGAN S., ZHANG L., LI J., WANG H., et ZHOU K. (2009).** Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteinases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, **117**: 438–443.
- **IBRAHIM H.R., THOMAS U., and PELLEGRINI A. (2001)** . A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J Biol Chem.*, **276(47)**: 43767-74.

- **IUBMB. (1998).** Life 5 ; **46:** 857-1070 .
- **J DAIRYSCI . (2012) .** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropéptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions, **95** : 1–8 .
- **JANDER E.A., MACHADO K.C., (2008).** Evolutionary ecology of figs and their associates: Recent progress and outstanding puzzles. *Ann. Rev. Evol. Syst.* **39:**439-458.
- **J BACTERIOL VIROL (2013) .** Evaluation of antimicrobial activity of *Malus domestica* fruit extract from Kashan area Avicenna J Phytomed. **39:** 97-102
- **JEONG M, KIM H, CHA J. (2009) .** Antimicrobial Activity of Methanol Extract from *Ficus carica* Leaves Against Oral Bacteria Journal of Bacteriology and Virology.
- **JOANNET H., (2002).** Mémoires de la figue. Edition quinoxé. 143p.
- **JOSEPH J. ET RAJ S. J. (2011).** Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn–An overview. *International Journal of Pharm-Tech Research.* **3:** 08-12.
- **KARABIYIK ET NIYAZI (1971).** Thèse de Doctorat : Contribution a l'étude botanique et pomologique des figuiers. Sciences naturelles : Toulouse : Faculté des sciences .
- **KIM Y. S., PARK S. J., LEE E. J., CERBO R. M., LEE S. M., and RYU C. H. (2008).** Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of b caryophyllene. *Journal of Food Science,* **73:** 540–545.
- **LESPINASSE JM ; LETERME E. (2000).** De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Ed. Rouergue-Parc Saint-Joseph, 104p.
- **M.A.J.S. (1999).** Dairy technology: Principles of milk properties and processes. New
- **MAURI N., (1944).** Les figuiers cultivés en Algérie. Documents et renseignements agricole, Bulletin N° 150, 56p. Notice spéciale de gravures, 98 figures, 103 p.
- **MAURI N., (1952).** Les figuiers cultivés en Algérie. Documents et renseignements agricoles, bulletin n°105, Alger.57P.
- **MAURI N.,(1939).** Les figuiers cultivés en kabylie. Documents et renseignements agricoles. Bulletin N° 5.66p.
- **MAVLONOV GT, UBaidullaeva KA, MI RAKHMANOV, (2008) .** Medicinal and Pharmacological Potentiality of the Plant At-Tîn-Common Fig (*Ficus carica* L.).

- MICHEL AUBINEAU. (2002). La rousse agricole.
- NEDJAR-ARROUME N, DUBOIS-DELVAL V, ADJE EY, KRIER F, MARY P, KOUACH M, ET GUILLOCHON D. (2008) . Bovine hemoglobin; an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, **29**: 969-77.
- NEDJAR-ARROUME N, DUBOIS-DELVAL V, MILOUDI K, DAOUD R, KRIER, F, KOUACH M, BRIAND G, GUILLOCHON D. (2006) . Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, **27**: 2082 - 2089.
- NEHA SONI, SANCHI MEHTA, GOURI SATPATHY, RAJINDER K GUPTA. (2014). Estimation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried fig (*Ficus carica*), *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* , **3** (2): 158-165.
- OLIVEIRA A. P., SILVA L. R., DE PINHO P. G., GIL-IZQUIERDO A., VALENTÃO P., SILVA B. M., *et al.* (2010). Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-ITMS. *Food Chemistry*, **123**: 548–557.
- PALMA JM., SANDALIO LM., CORPAS FJ., ROMERO-PUERTAS MC., MCCARTHY I., DEL RIO LA. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 521–30.
- PAYNE T. C. (2009). Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8. R. Tarté (ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications*. 26p.
- PELLEGRINI . (2003) . Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays.
- POLAINA, J., AND MACCABE, A. P. (2007). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. New York: Springer.
- RAJ J.S., BABY J., (2011). Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn –Anoverview. *Inter. J. of Pharm. Tech. Research*, **3** (1): 08-12.
- RAMEAU J. C., MANSION D., DUME G, et GAUBERVILLE C. (2008). *Flore forestière de France : Région méditerranéenne*. Ed. France. Institut pour le développement forestier. 631p.
- RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 597–635.

- **REBOUR, H., (1968).** Fruit méditerranéens autre que les agrumes. Ed. La maison rustique, p190-206.
- **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.
- **SULLIVAN G A., AND CALKINS C R. (2010).** Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. Meat science ; 27p.
- **TAKASHI MAKINODAN , ALEXANDER I. KHARAZI , INGRID SCHMID , LAWRENCE T. NAKAMURA , T MAKINODAN . (1995) .** Product of murine adult thymic epithelial cell line inhibits proliferation of double negative thymic T cells.
- **UHLIG H. (1998).** Industrial enzymes and their applications. New York: Willey & Sons.
- **VIDAUD J. (1997).** Le figuier monographie de CTIFL (centre technique interprofessionnel des fruits et légumes). 267p.
- **WALSTRA P., GEURTS T.J., NOOMEN A., JELLEMA A and VAN BOEKEL** York: Marcel Dekker Inc.
- **YUFANG YANG , DONGJUN SHEN, YIJUAN LONG, ZHIXIONG XIE & HUZHI ZHENG . (2017) .** Intrinsic Peroxidase-like Activity of Ficin Scientific Reports ,7: 43141.

RÉSUMÉS

Résumé

Ce travail porte sur l'extraction de la ficine, qui provient de deux variétés de l'arbre de figuier *Ficus carica* : variété Marseillaise et variété Dauphine. Quelques propriétés physico-chimiques de cette enzyme sont étudiées. Ainsi que leur effets sur l'activité protéolytique de la ficine, dont principalement: l'effet de la température, l'effet du pH et l'effet de la concentration du substrat qui est la caséine bovine. De plus, l'effet antibactérien de la ficine sur quelques espèces bactériennes pathogènes est aussi réalisé. Les résultats obtenus montrent que, l'activité protéolytique optimale de la ficine des deux variétés s'étend dans un intervalle de température de 50°C à 60°C. Avec un pH optimal de 7, 8 et une concentration de substrat de 3%. L'antibiogramme obtenu montre clairement que la ficine a un effet antimicrobien important sur les espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Cependant, la zone d'inhibition est peu importante sur les espèces bactériennes: *Escherichia coli* et *Staphylococcus*. Par contre, la ficine n'a aucun effet antimicrobien sur l'espèce *proteus sp.*

ملخص

يركز هذا العمل على استخراج إنزيم الفيسين ، الذي يأتي من نوعين من شجرة التين *Ficus carica* اولا النوع Dauphine و ثانيا النوع Marseillaise.

تمت دراسة بعض الخواص الفيزيائية الكيميائية لهذا الإنزيم. وكذلك أثارها على النشاط البروتيني للفيسين ، حيث يتأثر النشاط البروتيني بشكل رئيسي بكل من : درجة الحرارة ، درجة الحموضة وكذلك تركيز الركيزة التي هي الكازيين. بالإضافة إلى ذلك ، دراسة التأثير المضاد للبكتيريا بالنسبة لإنزيم الفيسين على بعض الأنواع البكتيرية المسببة للأمراض.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن النشاط الأمثل لإنزيم الفيسين بالنسبة لكلا النوعين يبلغ أقصاه عند درجة حرارة مثلى بين 50 درجة مئوية إلى 60 درجة مئوية. و درجة حموضة امثل من 7 و 8 وتركيز ركيزة امثل من 3 ٪. يبين المضاد الحيوي الذي تم الحصول عليه بوضوح أن انزيم الفيسين له تأثير مضاد للميكروبات خاصة على الأنواع البكتيرية *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus subtilis* وذلك حسب مساحة منطقة التثبيط و أيضا على الأنواع البكتيرية: الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية. في المقابل ، لا يوجد لانزيم الفيسين أي تأثير مضاد للميكروبات على النوع proteus sp

Abstract

This work focuses on the extraction of ficin from two varieties of the fig tree *Ficus carica*. Some physico-chemical properties of this enzyme are studied. As well as their effects on the proteolytic activity of ficine, which mainly: the effect of temperature, the effect of pH and the effect of the concentration of the substrate which is bovine casein. In addition, the antibacterial effect of ficin on some pathogenic bacterial species is also realized. The results obtained show that the optimal proteolytic activity of the ficin of both varieties is in a temperature range of 50 °C to 60 °C. With an optimal pH of 7, 8 and a substrate concentration of 3%. The antibiogram obtained clearly shows that ficin has a significant antimicrobial effect on bacterial species: *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. However, the zone of inhibition and not very important on the bacterial species: *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureuse* . On the other hand, ficine has no antimicrobial effect on *Proteus sp.*

Année universitaire : 2017/2018

Présenté par : **BOULKARA** Med El Amine
BRAHIMI Abdelkader

Thème : Extraction de la ficine de l'espèce *Ficus carica* et étude de ses caractéristiques biochimiques et de son effet antimicrobien sur quelques espèces bactériennes pathogènes.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master
Domaine : Science de la Nature et de Vie
Filière : Biochimie
Spécialité : Biochimie appliquée

Résumé

Ce travail porte sur l'extraction de la ficine, qui provient de deux variétés de l'arbre de figuier *Ficus carica* : variété Marseillaise et variété Dauphine. Quelques propriétés physico-chimiques de cette enzyme sont étudiées. Ainsi que leur effets sur l'activité protéolytique de la ficine, dont principalement: l'effet de la température, l'effet du pH et l'effet de la concentration du substrat qui est la caséine bovine. De plus, l'effet antibactérien de la ficine sur quelques espèces bactériennes pathogènes est aussi réalisé. Les résultats obtenus montrent que, l'activité protéolytique optimale de la ficine des deux variétés s'étend dans un intervalle de température de 50°C à 60°C. Avec un pH optimal de 7, 8 et une concentration de substrat de 3%. L'antibiogramme obtenu montre clairement que la ficine a un effet antimicrobien important sur les espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Cependant, la zone d'inhibition est peu importante sur les espèces bactériennes: *Escherichia coli* et *Staphylococcus*. Par contre, la ficine n'a aucun effet antimicrobien sur l'espèce *proteus sp.*

Mots clés: Ficine, *Ficus carica*, Figuier, variété Marseillaise, Variété Dauphine.

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

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^{me} BENSMIRA S. Maître Assistante A à l'UFM Constantine.
Rapporteur : M^{me} DAFFRI A. Maître de Conférences B à UFM Constantine.
Examineur : M^{me} KASSA- LAOUAR M. Maître Assistante A à UFM Constantine.

Date de soutenance : 04/07/2018