

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et populaire

Ministère de l'enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique

Université 1 Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biochimie et biologie

Cellulaire et moléculaire

N° d'ordre :.....

N° de série.....

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

En Biochimie

Option : Analyse Protéomique et Santé

Thème

Les propriétés protéolytiques de Galactite tomentosa , Extraction, purification partielle et caractérisation

Présenté par :

MERRAD NASSIMA

KERBACHE SANA

Soutenu le :

26/06/2014

Devant le jury

Présidente : Mme .MERAIHI Z.

Pro. Univ1 .Constantine

Rapporteur : Mme. BENKAHOUL M.

M.A.A. Univ1. Constantine

Examineur : Mme. BOULMELTOUT M.

Dr: Univ1. Constantine

Année universitaire : 2013-2014

REMERCIEMENTS

Nous tenons à adresser nos remerciements :

A notre directrice de recherche Mme BENKAHOUL MALIKA., maitre assistante à l'université1 Constantine QUI nous a permis de mener à bout ce travail, pour son aide précieuse, sa générosité scientifique et ces conseils judicieux.

A Mme MECHAKRA A., professeur à l'université 1 Constantine, de nous avoir ouvert les portes du laboratoire et mis à notre disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail.

Je tiens à exprimer ma grande considération et mes sentiments de reconnaissance à Mme. MERAIHI Z., Professeur à l'université 1 Constantine, qui me fait l'honneur de présider le jury.

C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment Mme BOULMELTOUT M., Docteur à l'université1 Constantine, et d'avoir bien voulu juger ce modeste travail, qu'elle trouve ici ma très profonde gratitude.

Je dédie ce travail

A mes très chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours

Aimé me voire réussir. Merci maman et merci papa

A mes frères saber sami mohamed

A mes soeurs Amel Laila

A mes amies baya mereim , amel , sana et hasna

Je dédie ce travail

A mes très chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours

Aimé me voir réussir. Merci maman et merci papa

A mes frères djalal ahmed

A ma seour amina

A mes amies Asma, Besma et Radia

Table des matières

Sommaire

Introduction.....	.1
--------------------------	-----------

Chapitre 1 :synthèse bibliographique

1. Généralité.....	2
2. Les enzymes protéolytiques.....	2
2.1.Source des protéases.....	2
2.1.1. Protéase animale	3
2.1.2. Protéase microbienne.....	3
2.1.3. Protéase végétale.....	4
2.2. Classification des protéases.....	4
2.2.1.la spécificité du clivage	5
2.2.2. Leur besoin en ATP.....	7
2.2.3. Selon leur pH d'activité.....	7
2.3.Les applications industriels des protéases.....	8
2.3.1. Industrie alimentaire	8
2.3.2. Domaine pharmaceutique et médicale	9
2.3.3. Tanneries.....	9
2.3.4. Détergents	10
2.3.5. Traitements des eaux.....	11
3. Techniques de purification des protéines.....	11
3.1. Solubilisation des protéines	11
3.2. Précipitation des protéines.....	12
3.3. Dialyse.....	12
3.4.Technique de chromatographie.....	13

3.4. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	14
4 . les plantes.....	15
5. Les astéracée	16
5.1. Taxonomie.....	16
5.2. Description	17
6. La plante d'étude.....	17
6.1. Galactite Tomentosa.....	17
6.2. Classification.....	17
6.3. Ecologie et habitat.....	18
6.4. Morphologie générale et végétatif.....	18
6.5. Morphologie florale.....	18

Partie II : Matériels et méthodes

1. préparation de l'extrait brut.....	19
2. quelques tests réalisés par l'extrait brut	19
2.1. Test de lavage.....	19
2.2. Test de tannerie.....	19
2.3. Digestion des protéines naturelles.....	19
3. la purification.....	20
3.1. La précipitation par sulfate d'ammonium	20
3.2. La dialyse	20
3.3. Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100	20
4. Méthode de dosage.....	20
4.1. Dosage de l'activité protéolytique	20
4 .2. Dosage des protéines selon la méthode de lowry.....	21

5. Caractérisation de la protéase partiellement purifiée.....	22
5.1. Détermination du pH optimale.....	22
5.2. Détermination de la température.....	23
5.3. La stabilité thermique.....	23
5.4 . Effet de la concentration du substrat	23
Chapitre III : Résultats et discussion	
1. Quelques tests réalisés par l'extrait brut	24
1.1. Digestion des protéines naturelles.....	24
1.2. Test de tannerie	24
1.3. Test de lavage.....	24
2. Purification de la protéase produite par <i>Galactite tomentosa</i>	24
2.1. La précipitation fractionnée.....	25
2.2. La dialyse.....	26
2.3. la chromatographie.....	26
3. Etude des caractéristiques de la protéase.....	27
3.1. Effet du pH	27
3.2. Effet de la température	27
3.3. La stabilité thermiques.....	27
3.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité protéolytique	28
Conclusion	29

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Introduction

Introduction

Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs spécifiques et indispensables aux mécanismes les plus complexes (Pelmont., 1995). Ces catalyseurs sont divisées en six classes selon leur action dont les hydrolases (Meunier ., 1999). Environ 75% des enzymes industrielles appartiennent à la classe des hydrolases (Rao et al., 1998 ; Assamoi et al., 2009) qui clivent les protéines en peptides et en acides aminés (Aprana et al., 1998) .Ces derniers ont divers origines : animales, végétales et microbiennes.

La plus grande partie du marché des enzymes est liée aux enzymes de type hydrolytique comme les protéases, les amylases et les cellulases . Les protéases représentent 60% du total des enzymes industrielles (Garcia-Gomez et al., 2009) et sont utilisées dans : l'industrie alimentaire, les produits pharmaceutiques, les détergents, la tannerie et le traitement des eaux usées .

Il y'a environ 20.000 espèces végétales, 10000 d'entre elles, possèdent des propriétés médicinales. A travers les siècles, les traditions humaines ont développés la connaissance et l'utilisation des plantes médicinales pour traiter divers maladies grâce à leurs effets bienfaisants et thérapeutiques sur l'organisme (Benarous., 2006).

Les chardons sont des plantes médicinales possédant une caractéristique pharmacologique et autres grâce à leur richesse en plusieurs composés. Ces plantes ne sont pas seulement utilisées pour leur vertu thérapeutiques mais aussi dans la fabrication traditionnelle du fromage (Sidrach et al, 2005) et bien d'autres application, de ce fait nous avons choisis de travailler sur l'une de ces plantes qui est *Galactite tomentosa* appartenant a la famille des composées.

L'objectif principale de ce travail est de connaître la composition de cette plante en protéases, étudier la capacité de ces protéases à hydrolyser les différents substrats et donc leurs applications éventuelles par les différentes industries, quelques application sont réalisées par les protéases extraites a partir de cette plante aussi nous avons réalisé une purification partielle d'une protéase acide et déterminer certains de ses propriétés.

Chapitre I :

Recherche bibliographique

1. Généralités

Les enzymes sont des protéines de hautes masses moléculaires (10 000 à 100 000 daltons). Ces macromolécules appartiennent à la classe des protéines globulaires. Elles sont 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. Les enzymes sont ainsi responsables de la dégradation des molécules complexes en molécules plus facilement assimilables. Les enzymes agissent comme catalyseurs de plusieurs réactions chimiques, une caractéristique importante des enzymes est leur très grande sélectivité à catalyser des réactions chimiques précises. En effet, contrairement aux agents chimiques qu'elles tendent à remplacer, les enzymes sont très spécifiques. Elles peuvent être divisées selon leur action spécifique en six classes principales (Tableau 1) (Meunier., 1999).

2. Les enzymes protéolytiques

Au niveau industriel, la classe d'enzyme la plus importante est la classe des hydrolases ou enzymes hydrolytiques. En 1998, 75% des enzymes destinées à l'industrie étaient hydrolytiques (Rao et al., 1998).

Les enzymes protéolytiques, font partie de cette classe. En effet, les protéases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines (Iopez., 2008 ; Morgane., 2009) , en scindant la liaison peptidique qui relie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Elles sont universelles et interviennent dans les processus physiologiques, comme la digestion des nutriments, la maturation, l'inactivation des hormones et le transport transmembranaire.

Dans la nomenclature internationale officielle des enzymes, les protéases représentent la catégorie : E.C.3.4 (E.C .pour Enzyme Commission) ou le « 3 » fait référence aux hydrolases et le « 4 » aux peptidases (Rawlings et al., 2006) .

2.1. Source des protéases

Les protéases sont extraites aussi bien des animaux que des microorganismes ou des plantes (Rao et al., 1998 ; Smriti et al., 2009). (fig1)

Tableau 1 : principales classes d'enzymes selon Meunier(1999)

Classes	Réactions catalytiques
Oxydoréductases	Réactions de transfert d'électron (ou atome d'hydrogène)
Transférases	Transfert de radicaux(groupements phosphates, amines ,méthyle,ect)
Hydrolases	Réaction d'hydrolase (bris d'un lien chimique par addition d'une molécule d'eau)
Lyases	Addition de double liaison à une molécule et enlèvement de groupements chimiques sans hydrolase
Isomérases	Réactions d'isomérisation (réaction ou un composé une transformé en un de ses isomères)
Ligases	Formation de liens chimiques couplés avec la rupture d'ATP

2.1.1. Protéase animales

Les protéases les plus familières d'origine animale sont la trypsine pancréatique, la chymotrypsine, la pepsine, et la rénine. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires.

A) **La trypsine** : La trypsine (MM 23,3kda) est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. C'est une protéase à sérine, elle hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquels les groupes carboxyliques sont apportés par des résidus de lysine et d'arginine. Elle est utilisée dans la préparation des milieux bactériens et dans certaines applications médicales spécialisées (Mala et al., 1998). Elle a cependant des applications limitées dans l'industrie alimentaire à cause de l'amertume générée par les hydrolysats.

B) **la Chymotrypsine** : chymotrypsine (MM 23,8kda) se trouve dans l'extrait pancréatique animal. La Chymotrypsine pur est une enzyme coûteuse et n'est utilisée que pour les applications du diagnostic et d'analyse. Elle est spécifique de l'hydrolyse des liaisons peptidiques dans lesquels les groupes carboxyle sont fournis par l'un des trois acides aminés aromatiques, à savoir, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Mala et al., 1998).

C) **la pepsine** : (MM 34,5kda) est une protéase acide présente presque dans l'estomac de tous les vertébrés (Rao et al., 1998), seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (Scriban., 1993). On a pu montrer que d'une part cette enzyme possède un rapport activité coagulante (AC) /activité protéolytique (AP) satisfaisant et que, d'autre part, ses propriétés biochimiques sont compatibles avec une utilisation en industries fromagères.

D) **la Rénine** : (MM 30,7 kda) pepsin-like-protease (Chymosin EC.3.4.23.4) est une protéase à aspartate. C'est un constituant majeur de la présure utilisée par l'industrie laitière comme agent principale de caillage du lait (Pelmont., 1995).

2.1.2. Les protéases d'origines microbiennes

Les protéases commerciales sont produites exclusivement par les microorganismes (Chutmanop et al., 2008). Elles possèdent toutes les caractéristiques nécessaires pour leurs applications industrielles (Sandhya et al., 2005). Les protéases microbiennes sont produites par une grande diversité de bactéries dont les actinomycètes, les moisissures et les levures (Devi et al., 2008).

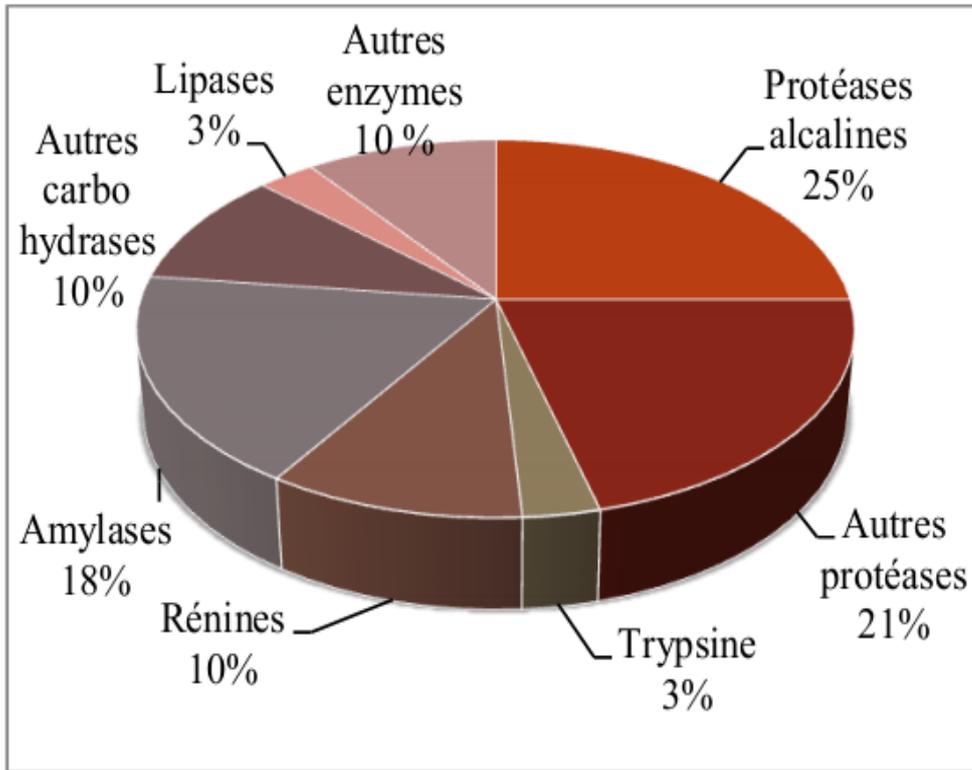


Figure 1 : Distribution des ventes des enzymes (Rao et al ., 1998)

2.1.3. Les protéases végétales

Les enzymes d'origine végétale, en particulier les protéases sont cités par ordre décroissant en technologie : la papaïne, la bromélaïne, la kératinase et la ficine. Ces enzymes représentent une partie des protéases les plus répandus (Rao et al ., 1998).

❖ **La papaïne** est une protéase traditionnelle qui a une longue histoire .Elle est extraite à partir de la plante équatoriale : *Carica papaya*, elle est active entre pH 5 et 9 et stable à une température de 90°C (Rao et al ., 1998 ; Pelmont., 1995 ; Scriban., 1993).

❖ **La Bromélaïne** est issu à partir de l'ananas (*Ananas comosus*). Elle est active entre le pH 5 et 9 et elle est inactive à 70°C, elle est donc, moins thermostable que la papaïne (Rao et al., 1998).

❖ **La Kératinase** a une fonction de la dégradation des cheveux et des laines, cette fonction est très importante pour la production des acides aminés essentiels tel que la lysine. Elle est active a pH 7,5 et sa température optimale est 50°C (LIN et al ., 1992).

2.2. Classification des protéases

Les protéases peuvent être classées selon 3 différents critères (Lopez ,2008)

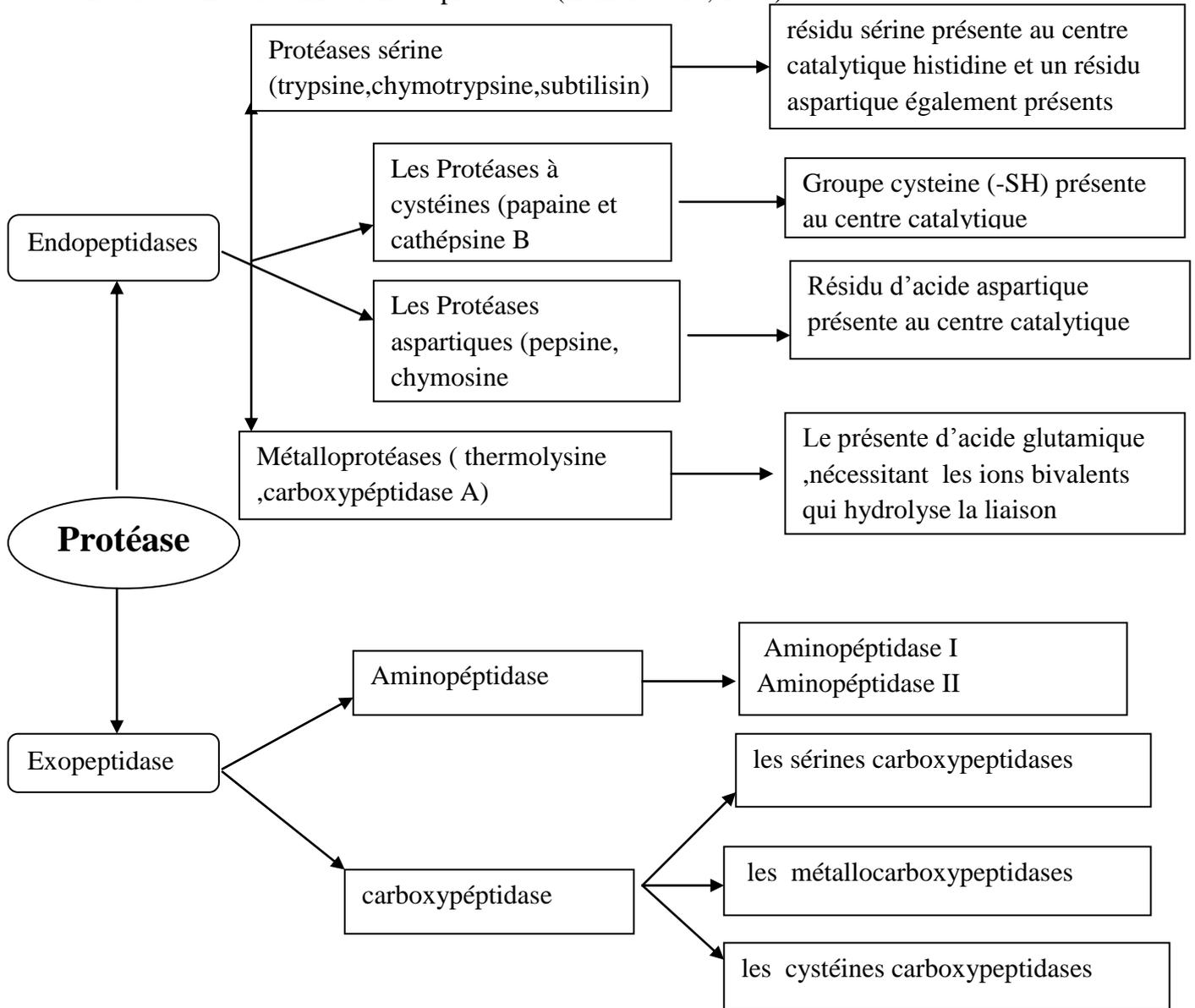
A) la spécificité du clivage.

B) leur besoin en ATP.

C) Selon le pH d'activité.

Les protéases se différencient également selon leur mode d'action: les endopeptidases et les exopeptidases. Les deux types de protéases sont divisés en plusieurs classes et sous classes. (Rao et al ., 1998 ; Kumar et al ., 2008) (Tableau 2).

Tableau 2 : classification des protéases (Kumar et al ., 2008)



2.2.1. La spécificité du clivage

▪ Les exopeptidases

Les exopeptidases sont des protéases qui hydrolysent les liens peptidiques près des extrémités N ou C-terminales des protéines. Il existe deux classes d'exopeptidases: les aminopeptidases et les carboxypeptidases. Ces enzymes sont très peu utilisées en industrie (Rao et al., 1998).

➤ Les aminopeptidases

Les aminopeptidases agissent près de l'extrémité N-terminale des protéines. Elles libèrent ainsi un seul acide aminé, un dipeptide ou un tripeptide, d'où les sous-classes. Beaucoup d'aminopeptidases sont spécifiques aux protéines ayant un résidu méthionine en position N-terminale, qui est alors libéré sous l'action de ses protéases .

➤ Les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases agissent près de l'extrémité C-terminale des protéines. Elle libère ainsi un seul acide aminé ou un dipeptide. Les carboxypeptidases sont divisées en trois sous-classes : les sérines carboxypeptidases, les métallocarboxypeptidases et les cystéines carboxypeptidases, selon la nature des acides aminés présents site actif de l'enzyme et selon leur mécanisme catalytique.

▪ Les endopeptidases

La plupart des enzymes utilisées en industrie sont des endopeptidases. Elles sont caractérisées par leur action hydrolytique à un site spécifique de la chaîne polypeptidique loin des extrémités N-terminale et C-terminale. La présence d'un groupement amino ou carboxyl libre peut avoir un effet répressur sur l'activité de ces protéases. Les endopeptidases sont divisées en 4 classes selon leur mécanisme catalytique : les protéases à cystéines, les métallo-protéases, les protéases aspartiques et les protéases sérines (Rao et al., 1998; Fogarthy et Kelly., 1990).

➤ **Les Protéases à cystéines (E.C.3.4.22.-)**

Les protéases cystéines, ou thiols, sont très peu utilisées en industrie. Ces protéases sont présentes autant chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La plupart des protéases de cette classe sont activées seulement en présence d'agents réducteurs comme la cystéine. Leur activité est inhibée par la présence d'agents sulphydryles comme le PCMB.

➤ **Métallo-protéases (E.C .3.4.24-)**

Les métallo-protéases forment un groupe de protéases très variées. Ces enzymes contiennent un ion métallique divalent, le plus souvent le Zn^{2+} , nécessaire à leur activité. Les métallo-protéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métallo-protéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10. La stabilité de ces protéases augmente considérablement si des ions Ca^{2+} sont ajoutés au milieu. Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex: EDTA), qui enlèvent le Zn^{2+} , alors que l'enlèvement des ions Ca^{2+} affecte seulement leur thermostabilité. Les métallo-protéases sont produits par plusieurs microorganismes tels que *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pseudomonas*. (Sumantha et al., 2006).

➤ **Protéases aspartiques (E.C.2.4.23-)**

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont des protéases dont l'activité catalytique dépend d'un résidu acide aspartique présent au site actif de l'enzyme (Deraison., 2002). La plupart des protéases aspartiques ont une activité maximale à de faibles pH, généralement entre 3 et 4. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 30 et 45 kda. Ces enzymes présentent un intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéines à faible pH est désirée (Drouin ,2005).

➤ **Protéases sérines(E.C.2.4.21-)**

Les protéases sérines sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel. La très grande majorité des protéases alcalines, très employées en industrie, sont des protéases de type sérine. Ces protéases sont caractérisées par la présence d'un résidu sérine au niveau de leur site actif, elles sont présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Ces protéases ont généralement un pH optimal de 10,

mais il peut varier entre 6 et 11. Ces enzymes sont inhibées par le DFP et le PMSF. Certaines protéases sérines sont aussi inhibées par des agents thiols, comme le PCMB, à cause de la présence d'un résidu cystéine près du site actif. Leur masse moléculaire se situe généralement entre 18 et 35 kDa (Drouin., 2005). Elles sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur la protéine: les protéases sérines de type trypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu chargé positivement, les protéases sérines de type chymotrypsine, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire, et les protéases sérines de type élastase, qui hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire (Drouin., 2005 ; Schellenberger., 1991).

2.2.2. Leur besoin en ATP

Cette classification est liée au besoin ou non d'ATP pour fonctionner. Ce groupe de protéases comprend des protéases composées de plusieurs sous-unités contenant des domaines protéolytiques.

2.2.3. Selon leur pH d'activité

Les protéases sont réparties en trois groupes

-protéases acides : elles possèdent deux acides aspartiques sur leur site actif et agissent à pH acide (pH 3 à 4).

-protéases neutres : sont des protéases agissantes à pH neutre (pH 6 à 7).

-protéases alcalines : appelées aussi protéases basiques elles agissent à pH alcalins (pH 8 à 10) (Cingoz., 2009).

2.3. Les applications industrielles des protéases

2.3.1. Industries alimentaires

Mise à part le cas de la protéase alcaline dans les détergents, les industries alimentaires constituent aujourd'hui encore le principal domaine d'application des technologies enzymatiques, qui à partir d'un nombre limité de types de réactions catalysées donnent lieu à une grande diversité d'application. Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont :

❖ fromagerie

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (Rao et al., 1998; Fogarthy et Kelly., 1990 ; Nouani et al., 2009). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utilisées dans la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes ou végétales (Drouin., 2005).

❖ Boulangerie

La farine de blé est grandement utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, à un degré plus ou moins important, selon les caractéristiques désirées de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Les protéases d'origine bactérienne sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao et al., 1998).

❖ Produit de base de soja

Des protéases neutres et alcalines sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline alcalase à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats de protéines solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et boissons fruitées et dans les formulations d'aliments diététiques (Rao et al., 1998).

❖ Synthèse de l'aspartam

Biens que les protéases soient des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse. Sous certaines conditions cinétiquement contrôlées , une préparation de

thermolysine provenant de *Bacillus thermoprorolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartam à partir de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine méthyle ester .il est produit industriellement au japon.

2.3.2. Domaine pharmaceutique et médicale

La grande diversité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez certains individus souffrant de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, les collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines, les deux sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures et de plaies. Enfin, une asparaginase provenant d' *E. coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie (Gupta et al., 2002).

2 .3.3.Tanneries

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées (Meunier 1999). Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés, et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis*. Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdis sage peuvent contenir des protéases de *A.oryzae*, *B. amyloliquefasciens* ou *B. licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement. De plus, le traitement des eaux usées de ces industries cause de sérieux problèmes. Par conséquent, l'emploi d'enzymes dans les procédés est maintenant privilégié (Drouin 2005). De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (Meunier, 1999; Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002; Kumar et al., 1999).

2.3.4. Détergents

Les protéases sont des ingrédients de base de toutes sortes de détergents (produits de blanchiment et de nettoyage des lentilles...ect) (Rao et al . ,1998). La plupart des protéases utilisées dans ce secteur sont des protéases bactériennes et fongiques (acides, neutre ou alcalines) qui enlèvent des taches protéiques (Kirko et al., 2005) les protéases sont ajoutées comme des ingrédients de base de toutes sortes des détergents pour l'usages domestiques (détergents à lessive, détergents à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires (Rao et al .,1998). Cependant, le marché le plus important au niveau de détergents est de loin celui des détergents à lessive (Kumar et al., 2008). Une protéase détergente idéal doit avoir une large spécificité de substrat et stable dans l'environnement hostile de la machine à laver (température élevée et pH alcalin). Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913 (Hajji et al., 2007), la plupart des protéases ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (Gupta et al., 2002 ; Hole et al., 2000). La protéase alcaline produite par *Botrytis cinerea* (Ferid et al., 2011).

2.3.5. Traitement des eaux usées industrielles

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels. En effet, les protéases peuvent traiter les rejets riches en protéines. Des essais effectués dans différentes industries alimentaires produisant des rejets riches en protéines ont donné des résultats très intéressants, qui permettent de constater le potentiel des protéases pour le traitement de ces déchets (Kumar et al., 1999). Dalev (1994) a utilisé des protéases alcalines provenant de *B. subtilis* pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles. Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (Ichida et al., 2001). Enfin, une préparation à base d'enzymes de *B. subtilis*, *B. amyloliquefasciens* et *Streptomyces sp.* est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques (Gupta., 2002).

3. Techniques de purification des protéines

Les protéines représentent une partie importante de la masse de tout organisme. La purification des protéines consiste à éliminer progressivement ses contaminants par une succession d'étapes indépendantes les unes des autres. le but de l'opération n'est pas tant de

réduire la perte de la protéine désirée, que d'éliminer sélectivement les autres composants du mélange afin que la protéine soit purifiée à un stade d'homogénéité avec un rendement acceptable (voet., 2005).

3.1. Solubilisation des protéines

Pour isoler une protéine ou toute autre molécule biologique, la première étape consiste à l'obtenir en solution. La technique choisie pour y parvenir va dépendre des caractéristiques mécaniques du tissu de départ ainsi que la localisation intracellulaire de la protéine. Parmi les techniques les plus utilisées on peut citer : la lyse osmotique, le lysosome, les détergents et les solvants organiques, l'homogénéisateuretc.

Une fois les cellules ouvertes, le lysat obtenu peut être filtré ou centrifugé afin d'éliminer les particules cellulaires laissant dans le surnageant la protéine recherchée (Voet., 2005).

3.2. Précipitation des protéines

Pour éliminer les protéines d'un échantillon, on peut utiliser la précipitation par exemple par : acide perchlorique ou par l'acide trifluoroacétique (TFA 100%) ou encore l'acétone à froid. Si à l'inverse, on utilise une précipitation plus douce et non dénaturante. ces méthodes de précipitation sélective reposent sur des différences de solubilité (Baudin et al., 2008).

La solubilité d'une protéine dépend de l'équilibre relatif entre les interactions protéines-solvant ; qui a tendance à la maintenir en solution et les interactions protéines-protéines ; qui tendent à provoquer son agrégation et sa précipitation.

La force ionique de la solution a une importance particulière pour déterminer lesquelles de ces interactions seront prédominantes. Pour une faible force ionique, les interactions avec le solvant sont favorisées et les protéines auront tendance à rester en solution (salting in), on dit qu'elles sont salées. Cependant, la solubilité des protéines peut diminuer rapidement lorsque les forces ioniques sont élevées (salting out) (Karp., 2004).

Le sulfate d'ammonium est souvent utilisé pour la précipitation des protéines. C'est un sel neutre, très soluble dans l'eau et possède une force ionique élevée dont l'intervalle de précipitation est compris entre 0.5 et 3M. l'addition progressive du sulfate d'ammonium à

l'extrait brut va priver les protéines de leurs possibilités d'établir des liaisons hydrogènes avec l'eau du solvant entraînant une précipitation des protéines. (Karp., 2004 ; Baudin et al., 2008).

3.3. La dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leurs capacités respectives à franchir les pores d'une membrane semi perméable appelée membrane de dialyse, elle concerne autant les macromolécules (protéines, ADN, anticorps...) que des molécules biologiques plus petites comme les oligonucléotides et les peptides. Les membranes de dialyse habituellement utilisées en biochimie se présentent sous forme de cylindre allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à analyser. Ce cylindre prend le nom de « boudin de dialyse ». Il est placé dans un récipient contenant le liquide contre lequel s'effectue la dialyse ou liquide de contre dialyse. (Boudin et al., 2008).

➤ Application de la dialyse :

- Dessaler des échantillons par dialyse simple, extensive ou par électrodialyse.
- Equilibrer une solution protéique avec un tampon qui modifie le pH de la solution protéique, par exemple entre deux étapes de purification.
- Eliminer les produits diffusibles contenues dans des solutions protéiques (Boudin et al., 2008 ; Voet., 2005).

3.4. Techniques de chromatographie

La chromatographie est une méthode expérimentale qui vise à séparer les constituants d'un mélange en utilisant deux phases, la phase stationnaire qui peut être solide ou liquide, et la phase mobile qui peut être un gaz, liquide, ou un fluide (Serge., 1989 ; Kabouch., 2007).

➤ Principe

L'échantillon est entraîné par la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de VAN DER WAALS ou les liaisons hydrogènes. Une fois la phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et

l'autre des deux phases, il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc une élution. Ceci permet de les séparer les uns des autres (Serge et al., 1989).

➤ Les types de chromatographie

Les différences techniques chromatographiques sont classées en fonction de leur phase mobile ou stationnaire :

➤ Selon la phase mobile

-La chromatographie en phase gazeuse CPG.

-la chromatographie en phase liquide CPL.

- La chromatographie sur couche mince CCM.
- La chromatographie de partage centrifuge CPC.
- La chromatographie liquide haute performance HPLC.

➤ Selon la phase stationnaire

- La chromatographie sur colonne (HPLC.CPG et les colonnes de silice).
- La chromatographie sur surface (CCM et chromatographie sur papier).

3.5. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Ce type de chromatographie également appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration , vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire bien que la forme intervienne également .pour aller plus loin.

Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est donc solide(les billes) et la phase mobile est liquide (un tampon dont le flux entraine les molécules). Selon la taille des pores des billes, on peut séparer efficacement des molécules dont la masse moléculaire est comprise dans une fourchette différente.

Les avantages les plus importants de cette méthode sont :

- Des temps de séparation courts et bien définis.
- Des pièces étroites qui conduisent à une bonne sensibilité.
- L'absence de perte d'échantillon.

- L'absence d'une désactivation de la colonne due aux interactions entre le soluté et le support (Douglas et al ., 2003).

4. La plante : le chardon

4.1. Historique

Depuis les temps les plus anciens, l'homme a toujours utilisé les plantes pour se nourrir et se soigner, pour se chauffer et s'abriter. Et aussi pour fabriquer des vêtements, créer des drogues, teintures et parfums, et de ce fait il a appris à reconnaître les plantes toxiques.

Plus de 20 000 espèces de végétaux sont aujourd'hui connus pour leurs usages condimentaires épuratoires, cosmétiques ou tinctoriaux et médicinaux.

Pendant longtemps, les remèdes naturels par les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours de la médecine de nos grands parents, cependant, malgré le développement de l'industrie pharmaceutique qui a permis à la médecine moderne de traiter un grand nombre de maladies qui étaient souvent mortelles, les plantes médicinales ne furent jamais totalement abandonnées et les gens ne cessèrent jamais de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui a conduit à maintenir vivante une tradition thérapeutique connue depuis nos ancêtres.

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques (Benarous., 2006), mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs. Parmi les plantes médicinales qui sont traditionnellement utilisées on cite :

- **Chardon marie : « *Marianum silybum* »** (F :Astéracée) : cette plante est utilisée pour soigner les dépressions et les troubles du foie .c'est un hépatoprotecteur contre les intoxications du foie par l'alcool et d'autres substances toxiques(Shabsoug et al ., 2008)

Grande camomille « Tanacetum parthenium » (F :Astéracée) :depuis longtemps préconiser contre les rhumatismes et les arthrites .cette plante l'est aujourd'hui contre la migraine, fait abaisser la fièvre et stimule le flux menstruel

➤ **Echinacée « Echinacea spp »**(F :Astéraceae) :elle possède des propriétés antibiotiques ,antibactériennes et antivirales, elle stimule donc la défense immunitaire .Elle peut également prévenir et traiter les infections. Certaines plantes médicinales ont montré leur efficacité dans divers types des cancers telles que :

➤ **Ailante glanduleux « Ailanthus Altissima »**
(F :Simaroubaceae) **et Arbre à créosote « Larrea tridentata »**(F :Zygophyllacée) :utilisées dans le traitement de beaucoup de cancers en particulier la leucémie (Madhuri et al., 2009).

5. les Astéracées

La famille des Astéracées (anciennement nommées « composées ») est une importante famille de plantes dicotylédones (principalement herbacées) qui comprend près de 13000 espèces réparties en 1500 genres. Ces plantes ont la caractéristique commune d'avoir une inflorescence en capitule , c'est-à-dire une multitude de fleurs sans pédoncule regroupées sur un réceptacle et entourées de bractées florales. Ainsi, contrairement à l'opinion populaire, ce qu'on appelle une « fleur » de tournesol, de marguerite, de pissenlit, n'est en réalité pas une fleur mais un capitule de fleurs entouré de bractées blanches ou jaune. En dehors de leurs usages alimentaires, cette famille a de nombreux autres usages :

- boissons spiritueuses
- pharmaceutiques : pommades à l'arnica (contre les coups), eau de bleuet (pour soigner les yeux),
- ornemental : aster, chrysanthème,...
- insecticide : pyrèthre

5.1. Taxonomie

Cette famille unique représentant l'ordre des astrales ,se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme ,sa grande variété écologique, l'importance et la plasticité de ses

composées chimiques(Heywood et al.,1977).elle comprend au moins 23000espèce et 1600 genres(Elizabeth et al.,2011) généralement herbacés .bien qu'elles soient très cosmopolites, elles préfèrent les régions tempérées ,subtropicales et tropicales, particulièrement les régions boisées.(Heywood et al.,1977).

5.2. Description botanique

Les fleurs de cette famille à symétrie radiale ou bilatérale sont toutes regroupées en inflorescences .Généralement hermaphrodites , petites, nombreuses et épineuses .Elles se réunissent autour d'un réceptacle commun sous forme de capitules habituellement pédonculé et entouré d'un involucre (Heywood et al.,1977).

6. La plante d'étude

6.1. Galactite tomentosa

Le genre botanique Galactite est essentiellement représenté par l'espèce Galactite elegans, le chardon laiteux ,une plante d'origine méditerranéenne proche des chardons et des cirses (synonyme : Galactite tomentosa).. Le nom scientifique du genre évoque en grec le lait. La galactite regroupe de nombreuse plantes de la famille des Astéracées et il comprend plusieurs espèce.

6.2. Classification

- Règne : Plantae
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous- classe : Asteridae
- Ordre :Asterales
- Famille : Asteraceae
- Genre : galactite



Figure 3 : Image de la Galactite tomentosa

6.3. Ecologie et habitat

Plante annuelle ou bisannuelle surtout présente dans l'ouest du bassin méditerranéen .En Europe , le chardon est bien établi dans les zones continentales en été quand le climat est sec (Mucina., 1989). Dans l'ouest américain, le chardon infeste les prairies humides et les pâturage (Hooper et al ., 1970). Il est souvent associé à des lieux de déchets , rivières, ruisseaux ,canaux ou autres cours d'eau.il peut être également abondant dans les pâturage secs ,les champs et les parcours (Dewey., 1991). La plante se développe dans la lumière et les sols sablonneux ou rocailleux (Piper., 1984), elle fleurie à partir du mois d'avril .

6.4. Morphologie générale et végétative

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. Tige très ramifiée en haut, tomenteuse. Les feuilles sont longues et étroites, lancéolées, pennatifidées, à segments lancéolés terminés par des épines. Nervures et taches blanchâtres, rappelant les marbrures ou les nervures de plantes comme *Silybum marianum* ou *Scolymus maculatus*.

6.5. Morphologie florale

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 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 intérieures, plus petites, sont hermaphrodites.

Chapitre II:

Materiels et méthodes

1. Préparation de l'extrait brut

Après séchage des fleurs de Galactite Tomentosa par le CaCl_2 , le broyage des pétales est réalisé dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier. la poudre ainsi obtenue est solubilisé dans du tampon citrate /sodium 0,05 M pH 5,5 avec une proportion de 1g d'échantillon pour 10 ml de tampon le mélange est alors filtré et ensuite clarifié par centrifugation à 4°C, le surnageant représente l'extrait brut. L'extrait enzymatique brut utilisé dans les tests de lavage et dans la tannerie est préparé par un tampon Tris HCl à pH 8

2. Quelques tests réalisés par l'extrait brut

2.1. Test de lavage

L'étude de l'application des protéases avec le détergent est réalisée sur des pièces de coton (5x5cm) salies par le sang. ces coupons sont mis avec différentes solutions :

- Eau distillée (100ml).
- Eau distillé (100ml) +1ml de détergent ISIS (7mg/ml)+2ml de l'extrait enzymatique.
- Eau distillé (100ml) +2ml de l'extrait enzymatique.

Tous les flacons sont incubés à température optimale 45°C pendant 1h (Aftab et al., 2006) .les pièces de coton sont rincées par l'eau puis séchées.une observation visuelle, permet d'observer l'effet de l'enzyme sur les pièces de tissus.

2.2. Test de tannerie

Deux pièces de peaux, la première de brebis et la deuxième d'une vache (5x5cm) baignent dans 20 ml d'extrait enzymatique et sont incubés à 45°C pendant 12h (Mohsen Fathi., 2005)

2.3. Digestion des protéines naturelles

Deux composés sont utilisés : le sang coagulé (2ml) et le blanc d'œuf (2ml).On ajoute un volume d'extrait enzymatique (2ml) et un tampon citrate phosphate pH6,8 (3ml) pour chaque échantillon, puis incubé durant 12h à température ambiante (Sen et al., 2011).

3. la purification partielle :

La purification de l'enzyme se fait en deux étapes : la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et la chromatographie d'exclusion

3.1. La précipitation par sulfate d'ammonium

Nous avons effectué une précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium de 30% à 80% de saturation, après chaque centrifugation on obtient un culot qu'on fait dissoudre dans le tampon et sur lequel on fait des dosages (activité protéolytique et protéines) afin de déterminer quel pourcentage de saturation qui donne la meilleure activité rendement.

3.2. La dialyse

La fraction présentant la plus grande activité est concentrée ensuite dialysée dans des boudins de dialyse contre le tampon déjà utilisé.

3.3. Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100

La chromatographie est réalisée sur une colonne en verre de dimension (50cm×1,5cm) avec le gel Sephadex G100.

Le gel de Sephadex G100 est mis à gonfler dans un tampon de citrate /sodium(0,05M .pH5,5)

Un échantillon de 1ml concentré de l'extrait enzymatique est déposé au sommet de la colonne équilibrée par le tampon les absorbances sont lues à 280nm et l'activité protéolytique ainsi que les protéines ont dosés selon les protocoles décrits.

4. Méthode de dosage

4.1. Dosage de l'activité protéolytique

➤ Principe

les protéases hydrolysent les protéines en peptides simples ainsi que des acides aminés , en particulier la tyrosine que l'on utilise comme standard de dosage de l'activité enzymatique . Les protéines non hydrolysées sont précipitées par le TCA tandis que les acides aminés et les peptides simples, se trouvent dans le filtrat .

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de folin-ciocalteu ; conformément à la technique décrite par MECHAKRA et al (1999)

➤ Réaction enzymatique

L'activité protéolytique est déterminée par utilisation de la caséine comme substrat. le mélange réactionnel est préparé comme suit :

- 1ml de l'extrait enzymatique
- 1,5 ml du tampon citrate-phosphate à pH 5,5
- 2,5 ml du substrat (solution de caséine à 2,5% dans le citrate de sodium à 0,02M)

Après agitation et incubation 1h au bain- marie à 40°C, la réaction est arrêtée par l'addition de 5ml de TCA à 4%, ce qui entraîne la précipitation des protéines .il est ensuite filtré sur papier whatman n°1.

➤ Protocole de dosage

Après filtration les composés azotés non protéiques qui se trouvent dans la phase soluble ,sont dosées selon la méthode d'ANSON (1958) .

-0.5ml filtrat.

-2.5ml de Na_2CO_3 dans de NaOH 0.1N

Après agitation et repos 10min, on ajoute 0.25ml du réactif de folin-ciocalteu dilué au 1/2.bien agiter et incubé 30min à température ambiante. L'absorbance est lue à 750nm au spectrophotomètre (JENWAY 6315).

Le blanc est préparé de la même façon, sauf que le TCA est rajouté avant l'incubation.

4.2. Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY(1951)

➤ Principe

La méthode de Lowry est une méthode de dosage colorimétrique qui permet de quantifier les protéines, Deux constituants actif utilisé dans cette méthode sont :l acide phosphomolybdotungstique est le réactif de folin, la présence d'une protéine entraîne sa réduction par perte

d'un à trois atomes d'oxygène. La fixation du cuivre par la chélation faciliterait le transfert d'électrons vers l'acide mixte. L'absorbance est lue à 750nm.

Les groupements chrommogéniques des protéines intervenants dans cette méthode sont la tyrosine et le tryptophana.

➤ **Solution utilisées**

-**Solution A** : 2% de Na_2CO_3 dans $\text{NaOH} 0.1\text{N}$

-**Solution B** : 1% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillé

-**Solution C** : 1% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillé.

-**Solution M** : c'est un mélange de :

- 20ml de la solution A
- 1ml de la solution B
- 1ml de la solution C

-**Solution E** : le réactif de folin-ciocalteu 1/10

➤ **Dosage**

A 1ml de l'extrait enzymatique, on ajoute 1ml de la solution M. On laisse reposer 15 min puis on ajoute 3 ml du réactif de folin. On agite juste après et on incube 45 min à température ambiante à l'obscurité. la lecture de l'absorbance se fait à 750 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6375).

5. caractérisation de la protéase partiellement purifiée

certaines propriétés de la protéase tels que: le pH, la température, la stabilité thermique , et l'effet de la concentration du substrat.

5.1. Détermination du pH optimal

Le pH optimum de la protéase est déterminé par l'utilisation d'une solution tampon qui est le citrate/Na à des pH variant de 3 à 6,5 .le mélange réactionnel est incubé à 40° pendant 1h.

5.2. Détermination de la température optimale

L'influence de la température sur l'activité de la protéase est étudiée en incubant le mélange réactionnel à différentes températures (20,30,40,50,60 et 70°) pendant 1h à pH 5.5 .

5.3. La stabilité thermique

La stabilité est déterminée par incubation à 60°C pour différent temps (10, 20, 30, 40,50 et 60minutes).

5.4. Effet de la concentration du substrat (détermination du V_m et K_m)

On mesure l'activité protéolytique en présence de différentes concentrations de Caséine 0.25g /l à 20g/l , l'incubation se fait à 40°C et à pH 5.5 pendant 1h

Chapitre III :

Résultats et discussion

1. Quelques tests réalisés par l'extrait brut

1.1. Digestion des protéines naturelles

Après l'incubation de sang coagulé et le blanc d'œuf avec l'extrait enzymatique à température ambiante on observe que le sang n'est plus coagulé et solubilisé. Aussi le blanc d'œuf devient moins visqueux et plus soluble. Ces résultats deviennent visibles après 12 h **fig.10**. Donc cette protéase réagit comme un anticoagulant, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Abidi et al. (2008) et sen et al. (2011).

1.2. Test de tannerie

Après l'incubation de l'enzyme avec la peau de vache et la peau de brebis pour l'épilation, on observe qu'à 45°C après 24 heures la peau de vache est totalement épilée comparée à la peau témoin (contrôle) quand à la peau de brebis on remarque une épilation non totale mais considérable. Des résultats similaires sont rapportés par Mohsen et al. (2005)

1.3. Test de lavage

D'après la **fig12** la pièce de coton avec l'eau distillée est toujours tachée avec du sang, alors que dans le 2^{ème} tissu mis dans l'eau distillée en présence du détergent et l'extrait enzymatique on n'observe presque pas de traces de la tache de sang, peu de traces sont observées pour le tissu N° 3 mis dans de l'eau distillée avec l'extrait enzymatique. Des résultats proches sont trouvés par (Abidi et al., 2008 ; Aftab et al., 2006).

On conclut que cette protéase peut être considéré comme un candidat potentiel pour l'utilisation dans les détergents industriels, même conclusion tirée par El -HadjAli et al (2011).

2. Purification partielle de la protéase produite par *Galactite tomentosa*

Pour la purification d'une protéine, un protocole de purification est conçu de telle façon à ce que chaque étape aboutit à une préparation contenant de moins en moins de protéines contaminants jusqu'à ce qu'il ne reste que la protéine recherchée.

Les étapes suivies dans cette manipulation pour la purification de l'enzyme sont les suivantes

- ❖ Précipitation fractionnée par le sulfate ammonium de 30% à 80%

- ❖ Dialyse
- ❖ Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Séphadex G-100

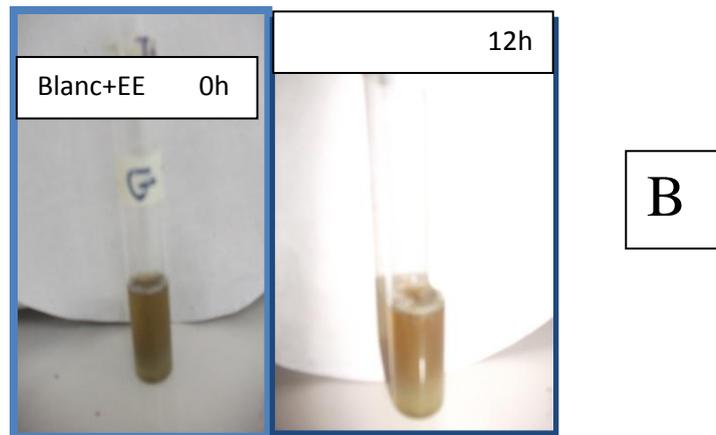
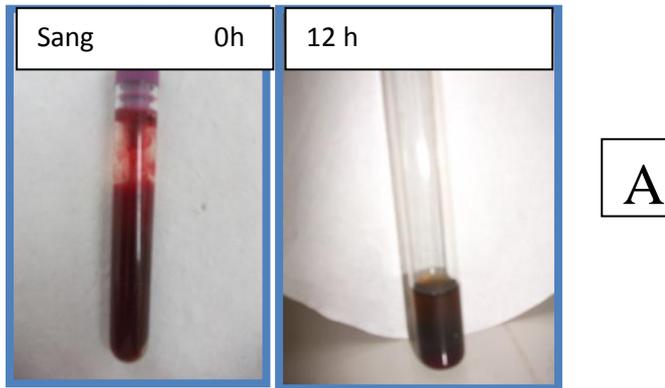


Figure 10 : Digestion des protéines naturelles par l'extrait enzymatique :

A :Sang coagulé avec l'extrait enzymatique

B : blanc d'œuf avec l'extrait enzymatique

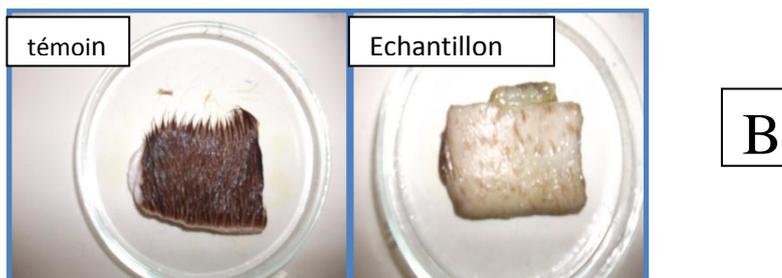
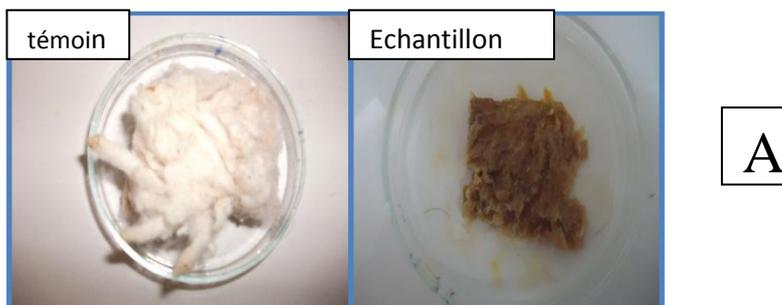


Figure 11 : Test de tannerie : A : peau de brebis

B : peau de vache

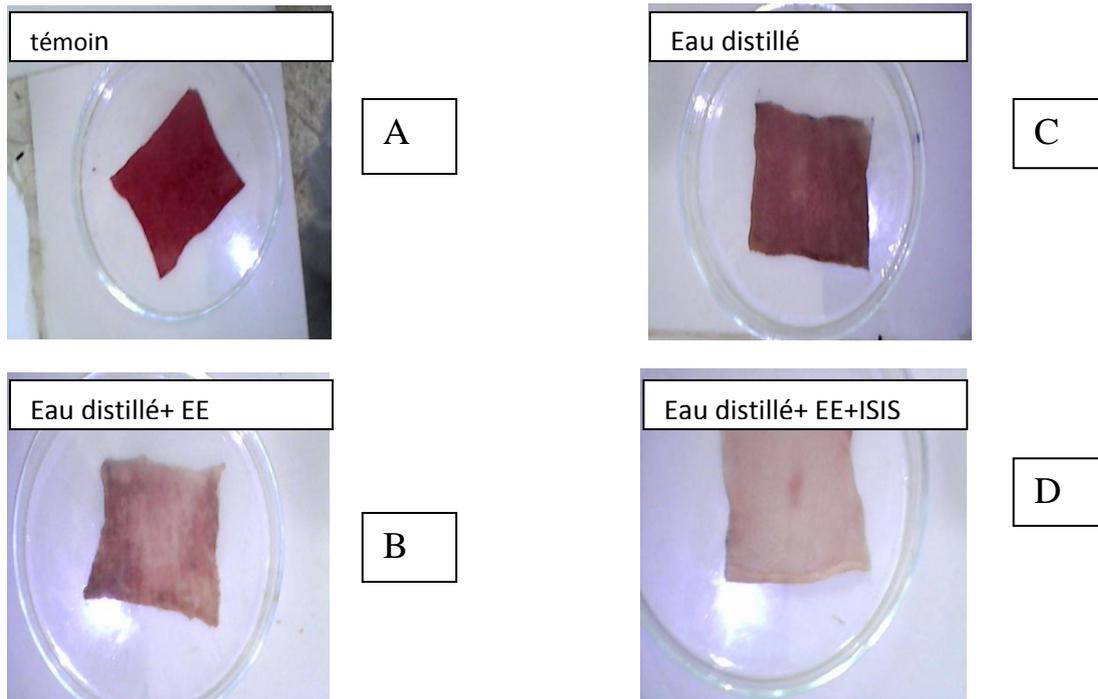


Figure 12 : Test de lavage

A : Témoin

B : Eau distillé + extrait enzymatique

C : Eau distillé

D : Eau distillé + Extrait enzymatique+ ISIS

Les résultats sont rapportés dans le tableaux suivant :

2.1. La précipitation fractionnée

Tableau3: Résultats de la précipitation Fractionnée par le sulfate d'ammonium

	Activité protéolytique(U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait Brut	504,79	11,38	44,35	1	100
Le précipité à 30% de saturation	213,31	1,34	159,18	3,58	42,19
Le précipité à 60% de saturation	169,29	0,68	247,86	5,58	33,53
Le précipité à 80% de saturation	70	0,49	142,85	3,22	13,86
Le surnageant	29	7,88	3,68	0,08	5,74

D'après ces résultats, les enzymes ont été séparées des autres composants d'extrait brut avec divers rendement et le meilleur rendement est donné par la fraction 30% .C'est donc la fraction retenue pour la suite de la purification

L'enzyme précipité à 30% est concentré et ensuite dialysé avant d'être déposé au sommet de la colonne .le tableau4 englobe les résultats des différents dosages effectués lors de la purification

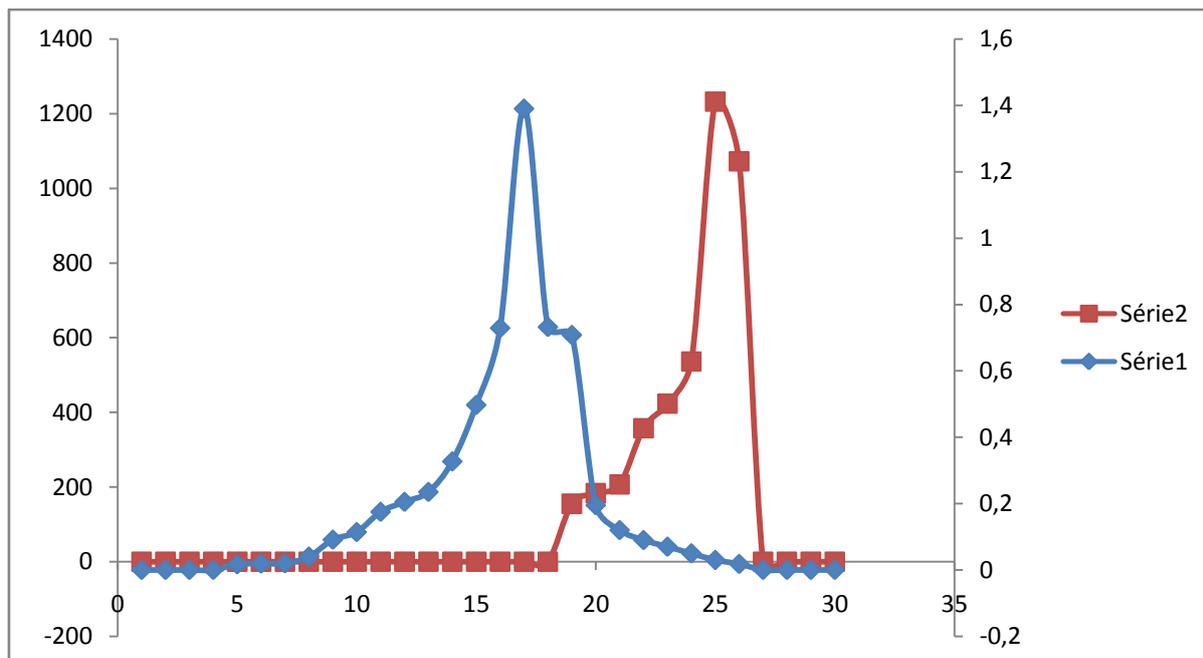


Figure 9 :profile d'éluion de la protéase de Galactite tomentosa sur le G100 de la fraction 30% .Elution par tampon citrate /sodium ,pH5 ,5

Tableau 4 : Bilan de purification partielle de l'extrait enzymatique

	Volume	Activité protéolytique (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait Brut	35	19584,25	402	48,71	1	100
Le précipité à 30% de saturation	2,5	7466,28	41,61	179,43	3,68	38,12
Après dialyse	3,25	9855,48	36,83	267,66	5,49	50,32
Fraction active	25	4523,8	06	753,96	15,47	23,09

Les résultats obtenus dans le tableau 4 confirment ceux du tableau 3 à savoir les résultats concernant la fraction 30%

2.2. La dialyse

La dialyse a permis de récupérer davantage d'activité protéolytique. Selon le tableau 4, on observe qu'après 24 h de dialyse, une augmentation très importante aussi bien du rendement que du degré de purification, ceci est démontré dans la revue bibliographique où nous avons mentionné que le degré de purification augmente après dialyse d'une fraction précipitée par le sulfate d'ammonium (Sidler et al., 1980). La dialyse permet de nous débarrasser du sulfate d'ammonium qui est dénaturant pour les enzymes.

2.3. la chromatographie d'exclusion moléculaire

La filtration sur Sephadex G-100 permet de séparer l'enzyme recherchée des autres protéines. Le profil d'éluion est représenté dans la figure (fig.9) et révèle une seule fraction active, celle-ci constitue la protéase partiellement purifiée sur laquelle quelques propriétés physico-chimiques et cinétiques ont été réalisées. Cette fraction est séparée avec un rendement en activité égale à 23,09%, une valeur proche de celle obtenue par Sushil Kumar et al., (2004) qui ont purifiés une protéase acide de *Rhizopus oryzae* par sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie échangeuse d'ions et d'une chromatographie sur Sephadex G100 et

pas très loin du rendement (28,45) obtenu par Dahot (2001) qui a aussi séparé sur sephadex G100 une protéase acide produite par *Penicillium expansum*. Le degré de purification obtenu est de 15,47 très proche de 15,8, valeur obtenue par Ganesh Kumar et al., 2007 qui a travaillé sur la protéase acide de *Synergistes sp* ou la purification c'est faite en suivant le même protocole que nous.

3. Etude des caractéristiques de la protéase

Après une purification partielle de l'enzyme, l'effet du pH, de la température, la stabilité thermique et la cinétique enzymatique sont étudiés.

3.1. Effet du pH

L'activité maximale est notée à pH 4, un résultat proche de celui rapportée par la bibliographie où des travaux réalisés par Matos et al., 2005 montrent que l'aspartyl protéase de *centaurea calcitrapa* présente un pH optimum compris entre 3.5 et 4.5 ; Vairo et al., 2005 trouvent aussi un pH optimum autour de 3.8 pour la protéase acide de *Silybum Marianum* tandis que Domingos et al., 1998 ont obtenus un pH entre 4.0 et 5.0 pour la protéase extraite à partir des fleurs de *centaure calcitrapa*.

3.2. Effet de la température.

L'activité maximale de la protéase est obtenue à 40°C, Cette activité reste importante jusqu'à la température 50°C (**fig.4**). ce résultat est rapporté par la littérature où la température optimale est comprise entre 40°C et 55°C (Sumantha et al., 2006).

3.3. La stabilité thermique

La vitesse à laquelle une enzyme se dénature à une certaine température est finalement un moyen très commode pour juger de sa stabilité. Sur le plan général, la dénaturation d'une protéine est mesurée par la perte de ses propriétés biologiques (Pelmont., 1995).

Dans ce travail la stabilité thermique de l'enzyme est réalisée à 60°C pendant des temps variant de 10 à 60 min à pH 5.5. La **fig.3** montre que l'activité résiduelle de l'enzyme après 20 minutes d'incubation diminue de 50% par rapport à l'activité initiale. Un taux d'inactivation de 90% est atteint en temps voisin de *Cucumis trigonus* 60 min. Des résultats obtenus par Mufti et al., 2006 sur la stabilité thermique d'une protéase démontre que l'enzyme perd 50% de son activité initiale dans la première heure à 70°C. l'étude faite par

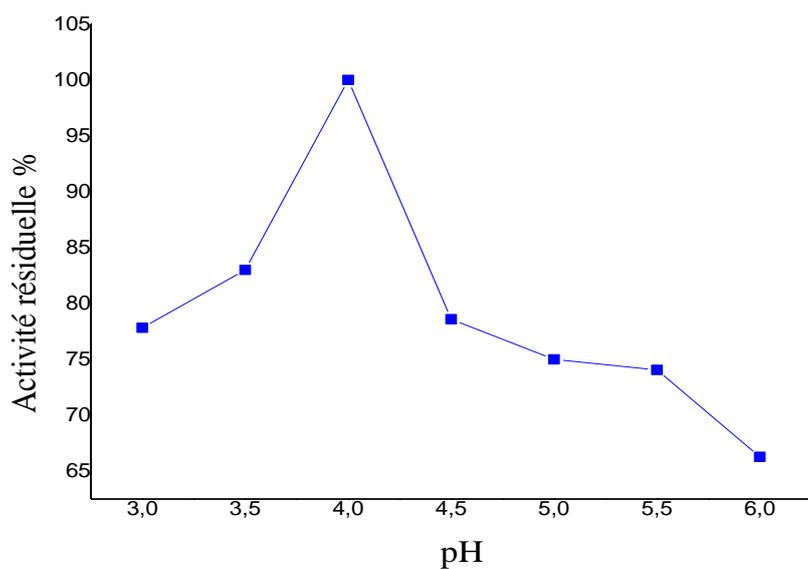


Figure 5: Effet du pH sur l'activité protéolytique (tampon citrate /Na)

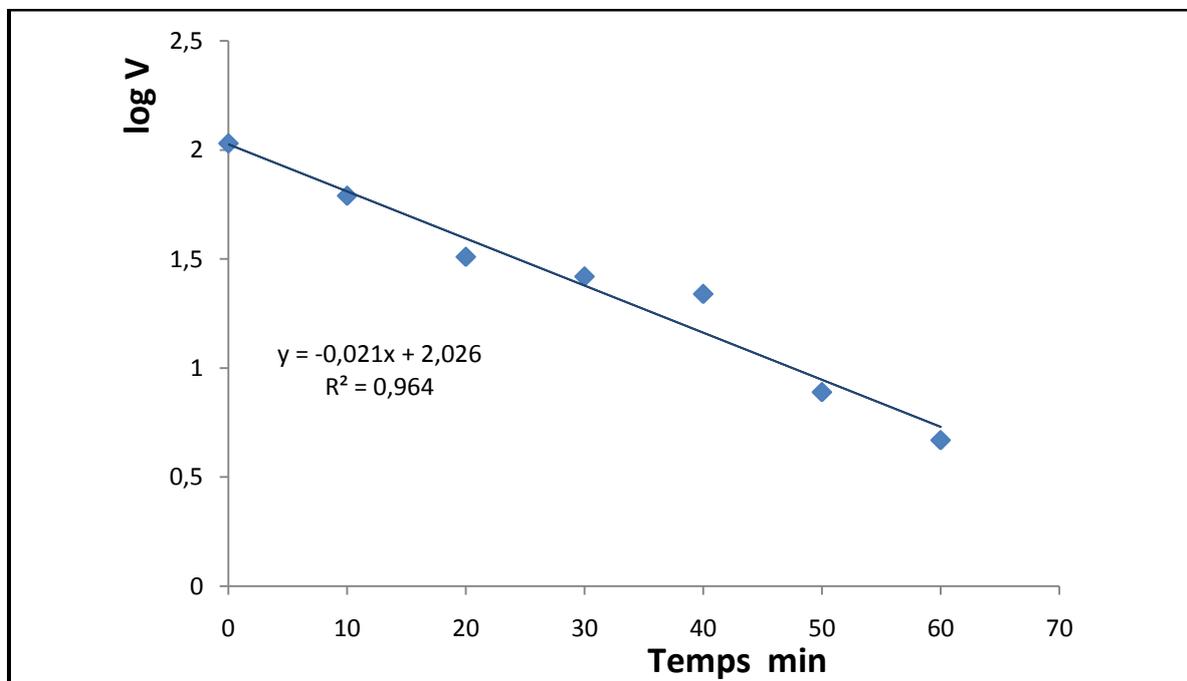


Figure 6 : Cinétique de la stabilité thermique

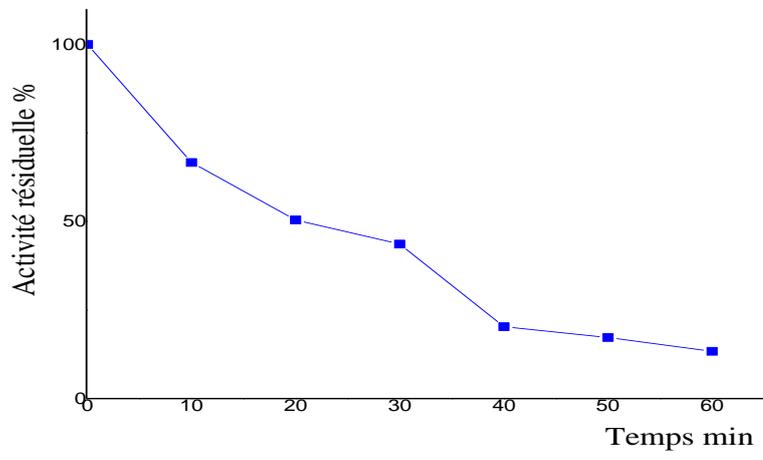


Figure3 : la stabilité thermique à 60°C

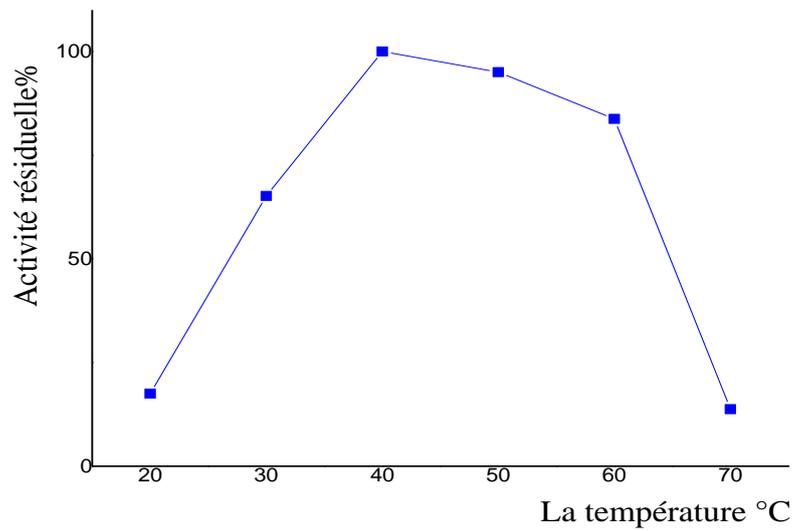


Figure4 : Effet de la température

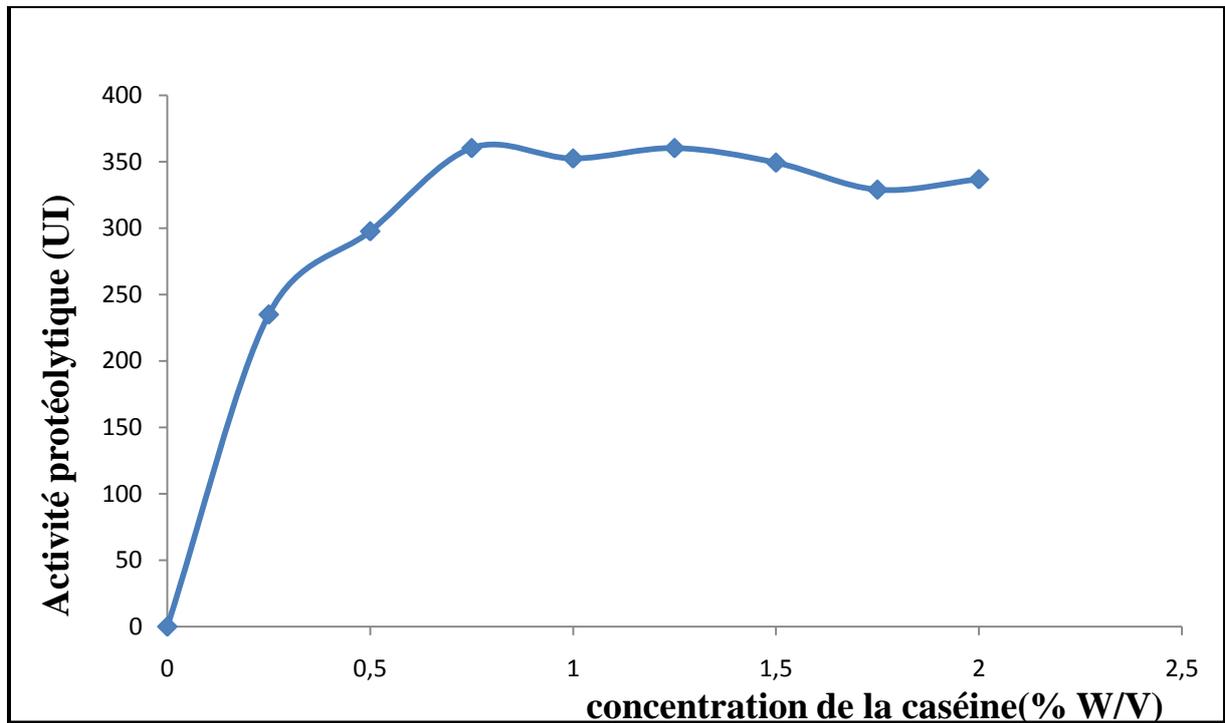


Figure 7 : Effet de la concentration de la caséine sur l'activité protéolytique

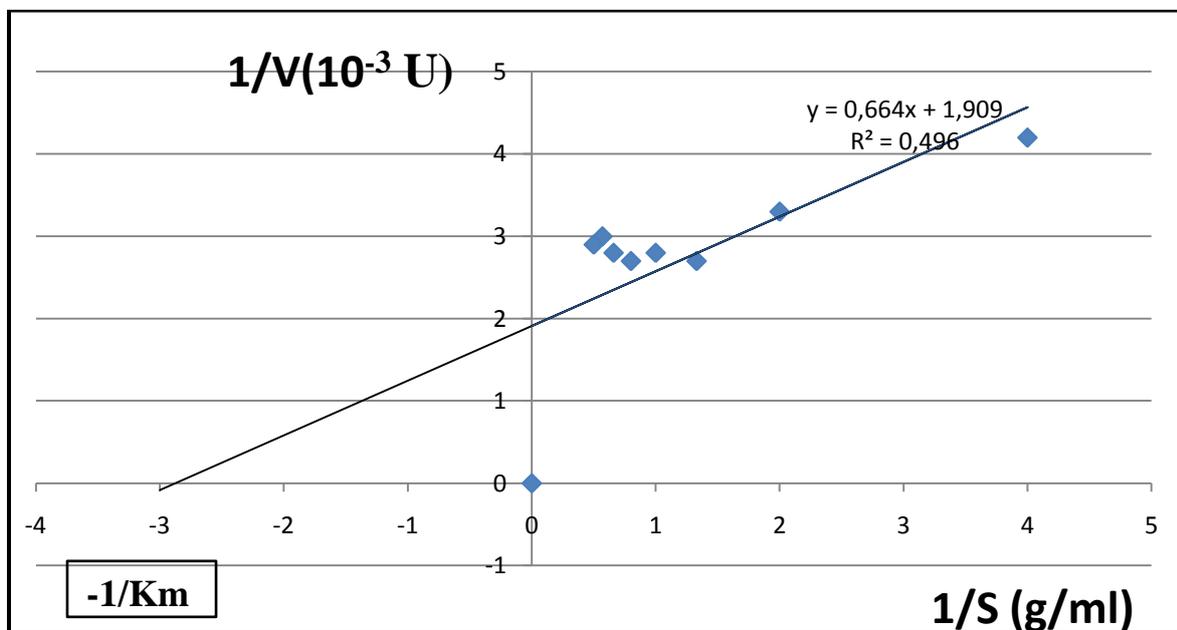


Figure 8 : la représentation de Lineweaver et Burk

Sushil Kumar et al., 2004 sur une protéase acide issue de *Rhizopus oryzae* donne une activité résiduelle de 38% au bout de 60 min à 60°C donc une perte de 62% d'activité.

Pour déterminer avec précision le temps de demi-vie (où la protéase perd 50% de son activité), la linéarisation de la courbe de la stabilité thermique est réalisée en traçant $\log v$ en fonction de temps sachant que :

$$\log v = -kt/2.3 + \log v_0$$

-V est la vitesse de la réaction au temps t(activité résiduelle).

-V₀ est la vitesse de la réaction au temps zéro (activité initial de l'enzyme non dénaturante).

-K est la constante de vitesse d'inactivation de la protéase.

Le temps de demi-vie égal à $\ln 2/k$. ce temps est calculé grâce à la représentation graphique **fig6** est égal à 20 minutes.

3.4. Effet de la concentration du substrat sur l'activité protéolytique

L'activité enzymatique est mesurée à différentes concentrations de la caséine. La **fig. 7** fait apparaître une courbe hyperbolique indiquant que la cinétique est de type Michaelienne. La représentation graphique selon Lineweaver et Burk (**fig.8**) a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis (K_m= 3,47g/l) et la vitesse maximale (V_m= 523.834).

conclusion

Les protéases sont parmi l'unes des plus importantes enzymes utilisées dans les différentes industries, afin de mieux connaître les propriétés de ces dernières, les chercheurs scientifiques ont réalisé beaucoup de travaux ; C'est se qui nous a encouragé a mettre au point ce mémoire réalisé sur les protéases de la plante médicinale Galactite tomentosa .

L'extrait enzymatique brut donne un excellent résultat de lavage avec le détergent ISIS, donc on peut la considères comme un candidat potentiel pour l'utilisation dans les détergents industriels. Les résultats obtenus montrent que les protéases présentes dans l'extrait peuvent agir comme un anticoagulant et aussi pour le délainage dans le domaine de la tannerie.

La purification partielle de la protéase précipitée à 30% permet de donner un rendement intéressant de 42.19% et un rendement de 50.32% après la chromatographie sur Sephadex G-100 avec un degré de purification de 15.47.

Afin de compléter notre travail une étude physico-chimique en plus d'une cinétique enzymatique sont réalisées. La protéase étudiée se caractérise par un pH optimale de 4 donc il s'agit bien d'une protéase acide avec une température optimale de 40°C et un temps de demi vie de 14 minute et 35 seconde.

L'étude de l'effet de la concentration du substrat a donné une cinétique Michaelienne, traduite par une courbe hyperbolique. La méthode de Lineweaver et Burk a permis de calculer la constante cinétique de Michaelis ($K_m=3,47g/l$) et la vitesse maximale $V_m=523.834UI$.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont très encourageants pour faire d'autres tests et d'autres applications:

- Améliorer la protéase

- Tests biologiques

Références bibliographiques

ABIDI F., LIMAM F. et MARZOUKI M. N. 2008. Production of alkaline protease by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Porc. Biochem.*, 43; 1202-1208.

AFTAB S., AHMED S., SAEED S. et RASOOL S. 2006. Screening, Isolation and characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. *Parkisan journal of biological Science*, 9 (11): 2122-2126.

APARNA M. T., MALA B. R., MOHINI S. G. & VASANTI V. D.1998. Molecular and Biotechnological Aspect of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology*. 62(3): 597-635.

ASSAMOI A. A., DESTAIN J. et THONART P. 2009. Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β - 1,4- xylanases de moisissures : le cas de *penicillium canescens*. *Biotechnol . Agron. Soc. Environ.*, 13(2) ; 281-294.

BENROUS K. 2006. Effet des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, tyrosine et lipase. Diplôme d'ingénieur d'état en biologie : Génie biologique. Lieu de soutenance : Univ. Amar Tlidji Laghouat.

BOUDIN B., BONNEFONT – ROUSSELOT D., KAMOUN P. & STERNBERG D. 2008. Méthodes d'extraction de fractionnement. In : *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Ed. Médecine sciences. Flammarion. Paris . P : 34-49 .

BRYCE S.F., LINDA M.S & PAUL P.B. 2011. Boceprevir : A protease inhibitor for the treatment of chronic Hepatitis C. *The Annls of Pharmacotherapy*. 45(9) : 1085-1093.

CHUTMANOP J., CHUICHULCHERM S., CHISTI Y. et SRINOPHAKUN P., 2008. Protease production by *aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 83; 1012-1018.

CINGÖZ A. 2009. Analyse d'une protéine ciblée par immunoaffinité et digestion sur microréacteur enzymatique couplés en ligne à une analyse par chromatographie liquide et spectrométrie de masse : Synthèse, caractérisation et miniaturisation des outils bioanalytiques. Thèse de doctorat : Chimie Analytique. Lieu de soutenance : Univ. Pierre et Marie Curie « Paris VI » . p : 295.

DAHOT. M. U. 2001. Purification and some properties of acid protease from *penicillium Ex pansuim* enzyme and fermentation *Biotechnology Research Laboratory, Biotechnology Section M. A. Ka2, Institute of chemistry, Univers of Sindh. Jamshoro. Pakistan.*

DESFORGES V., DEFRANCE-FAIVRE F., ZERIMECH F., BALDUYC K.M., MARTIN A., RAVERDY V., KERR-CONTE J., PATTOU F. & VANTYGHM M.C. 2008. Evolution des marqueurs oxydatifs et des inhibiteurs des protease après greffe d'ilots seuls dans une série de 14 patients diabétiques de type 1. *Diabètes et Métabolisme*. 34(3) : 31.

DEVI M.K., BANU A.R., GANANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V. ET PALANISWAMY M. 2008. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. IndianJ. Sci. Technol., 1(7); 1-6.

DEWEY, S, A. 1991. Weed thistles of the western United States. In: JAMES, I. F., J. O. EVANS, M. H. RALPHS, and R. D. CHILD, eds. Noxious Range Weeds. Westview Press, Boulder, Colorado. pp. 247-253.

DOMINGOS A., XUE Z.T., GURUPRASAD K., CLEMENTE A., BLUNDELL T. & PAIS M.S. 1998. An aspartic proteinase from flowers of centaure calcitrapa. Purification, characterization, molecular cloning and modeling of its three-dimensional structure. Advance in Experimental Meicine and Biology. 436 : 465-472.

DOUGLAS A. S., JAMES H. F. & TIMOTHY A. N. 2003. Chromatographie liquid à haute performance. In : Principe d'analyse instrumentale. 5^{ème} éd. De Boeck Université Bruxelles. P : 725-764.

DRAISON M. C. 2002. Isolement , caractérisation et cibles de nouveaux inhibiteurs de proteases pour la creation de plantes transgéniques résistantes aux pucerons. Le grade de docteur en sciences, Université Xi Orsay, Paris.

DROUIN M. 2005. Etude de production de protéases alcalines par *Bacillus licheniformis* en utilisant des boues d'épuration municipales comme substrat. Mémoire de Maitre és science (M . Sc.). Canada.

EL-HADJALI N., HMIDET N., GHORBEL-BELLAAJ O., FAKHFAKH-ZOUARI N., BOUGATEF A. ET NASRI M. 2011. Solvent-stable digestive alkaline proteinase from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: chaacteristics, application in the deproteinization of shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. Appl. Biotechnol: 1096-1110.

ELIZABETH F., JOHANNES S. 2011. Anatomy of subterranean organs of medicinally used cardueac and related species and its value for discrimination. Journal of scientea pharmaceutica. 79(1). P: 157-174.

FERID A ., JEAN M. C., THOMAS H.& MOHAMMED N. M. 2011. Purification and biochemical characterization of able alkaline protease Prot-2 from *Bptrytiscinerea*. Process Biochemistry. 46: 2301-2310.

FOGAARTHY W. M. et KELLY C.T. 1990. Microbial enzyme and biotechnology, 2^{ème} edition. Elsevier science publishinge, New-York, Etats- Unis, 472 pages.

GARCIA-GOMEZ M. J., HUERTA-OCHOA S., LOERA-CORRAL O. et PRADO-BRRAGAN L., A. 2009. Advantages of a proteolytic extract by *aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. Food Chem., 112; 604-608.

GRANDADAM M., NICAND E., KOECK J.K., CARON M.& TEYSSOU R. 2001. Etat de la résistances des souches de VIH-1 en Afrique: quelle place pour les réseaux de surveillance virologique?. *Med-Trop.* 61 :89-93.

GUPTA R., BEG Q. K. et LORENZ P. 2002. Bacterial alkaline proteases : molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, 59; 15-32.

HAJJI M., KANOUN S., NASRI M. et GHARSALLAH N. 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Porc. Biochem.*, 42: 791-797.

HEYWOOD V. H., HARBONE J. B.1977. An overture to the compositae. In : HEYWOOD V. H., HARBONE J. B & TURNER B.L: *The biology and chemistry of the compositae.* 1^{ère} éd. Academic press Inc., Londre, 1-17.

HOLE A. M., DRAPER A., JOLLIFFE G. & CULLINAN P. 2000. Occupational asthma caused by Bacillary amylase used in the detergent industry. *Occup Environ Med.* 57(12): 840-22.

HOPPER, J. F., J. A. YOUNG, and R. A. EVANS. 1970. Economic evaluation of Scotch thistle suppression. *Weed Science* 18: 583-586.

ISHIDA T. 2006. Low-barrier hydrogen bond hydrothesis in catalytic triad residue of serine proteases: correlation between structural rearrangement and chemical shifts in acylation process. *Biochemistry.* 45: 54136-20.

KABOUCHE Z. 2007. Introduction & Généralité. In : *Cours et Exercices de chromatographie.* Der-El-Houda éd. Algérie. P : 4-11.

KARP G. 2004. Techniques de biologie cellulaire et moléculaire. In : *biologie cellulaire et moléculaire.* 2^{ème} éd. De Boeck Université Bruxelles. P : 758-763.

KEY L., MOSELY M. H., ANDERSON R. G., O'CONNOR R.J., WILDY B.S. 1972. Production and isolation of microbial proteases. *Biotechnol. Bioeng. Symposium Number 3,* p. 63.

KUMAR C. G et TAKAGI H. 1999. Microbial alkaline proteases : from a bio industrial viewpoint. *Biotechnology Advances* 17: 561-594.

KUMAR D., SAVITRI., THAKUR N., VERMA R. et BHALLA T.C. 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res. J. Microbiol.*, 3(12); 661-672.

LAROUY L., BRUN-VEZINET F & DESCAMPS D. 2010. Sites de clivages de GAG et résistance du VIH aux inhibiteurs de la protéase. *Antibiotiques.* 12(2) : 100-106.

LOPEZL., K. 2008. Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur. L'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (Agro Paris Tech).

MADHURI S., GOVIND P. 2009. Some anticancer medicinal plants of foreign origin. *Current Science*. 96(6). P: 779-781.

MATOS S. S., NOVO C. & DOMINGOS A. 2006. Evaluation of the presence of aspartic protease from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 893-898.

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*. *Sci. Aliments*, 19 ; 663-675.

MEUNIER N. 1999. Evaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada.

MOHSEN F., DILEEP D. et DEEPTI D. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electron Journal of Biotechnology*, 197-203.

MORGANE C. 2009. Engineering of a monospecific protease for blood glucose diagnostics. Thèse pour obtenir le grade de Docteur. Université Louis Pasteur Strasbourg.

MUCINA L. 1989. Syntaxonomy of the *Onopordum acanthium* in temperate and continental Europe vegetation. 81: 107-115.

MUFTI A.U., & YEON G.Y. 2006. Purification and characterization of a serine protease from *Cucumis trigonus* Roxburgh. *Phytochemistry*.

NOUANI A., BEHAMICHE N., SLAMANI R., FAZOUANE F., BELBRAOUE T. S. & BELLAL M.M. 2009. Purification et caractérisation électrophorétique d'une protéase caogulante le lait de *Mucor pucillus* : Comparaison de méthodes. *European Journal of Scientific Research*. 35(4) : 512-521.

PELMONT J. 1995. *Enzymes : catalyseurs du monde vivant*. Presse Universitaire de Grenoble. Pp. 7 ; 621 ; 652-654.

PIPER, G. 1984. Scotch thistle- a continuing menace in the Pacific Northwest. *Pacific Northwest Weed Topics*. 84:1-2.

RAFFI R. 2003. Optimisation de l'efficacité des inhibiteurs de protéases par «Boosting». *Médecine et maladies infectieuses*. 33(2) : 111-116.

RAI S.K. ET MUKHERJEE A.K. 2010. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alziwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04 *Biochem. Eng.J.*, 48; 173-180.

RAO M. B., TANKSALE A. M., CHATGE M. S. et DESHPANDE V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62; 597-635.

RAWLINGS N.D. , MORTON F.R., BARRETT A.J. ET MEROPS. 2006. The peptidase database. *Nucleic Acids Res*; 34: D270-D272.

SANDHYA C., NAMPOOTHIRI K. M. et PANDEY A. 2005. Microbial proteases. *Methods Biotechnol.*, 17 ; 165-179.

SHELLENBERGER V., BRAUNE K., HOFMANN H. J. et JAKUBKE H. D. 1991. The specificity of chymotrypsin. *Eur. J. Biochem.* 199 : 623-636 .

SCRIBAN R. 1993. *Biotechnologie*. 4^{ème} éd. Tech et Doc. Lavoisier. Paris. P : 39 ; 42 ; 351-356.

SEN S., VENKATA D., DUTTA K. ET MANDAL B. 2011. Characterization of novel surfactant and organic solvent stable high-alkaline protease from new *Bacillus psidofirmus* SVB1. *Research journal of Microbiology* 6(11): 769-783.

SERGE B. 1989. *Instruments et Techniques de laboratoire : Diagnostic médico-chirurgical*. In : *Biochimie clinique*. 2^{ème} éd. Maloine. Paris.

SHABSOUG B. , KHALI P., ABUHARFEIL N. 2008. Enhancement of naturel killer cell activity in vitro Against Humamn Tumor Cells By some plants From Jordan. *Journal of*

SIDLER W. & ZUBER H. 1980. Isolation procedures for thermostable neutral proteinase produced by *Bacillus stearothermophilus* . *European Journal of Applied microbial and biotechnology*.

SIDRACH L., GARCIA-CARNOVAS F., TUDEIA J., RODRIGUES - LOPEZJN. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynaro Scolymus*) , enzymatic properties of cynarases A. *Phytochemm.* 66(1): 41-9.

SMRITI G., SARITA A. & NEERAJ W. 2010. Purification of protease from *pseudomonas thermaerum* GW1 isolated from poultry wast site. *Open Michrobiomogy Journal.* 4 : 67-74.

SUCHIL K., NEERU S.S., MUKHR R.S. & RANDHIR S. 2005. Extarcellular acid protease from *Rhizopus orysea*. *Process Biochemistru.* 40 : 1701-1705.

SUMANTHA A., LABROCHE C. & PANDET A. 2006. Microbiology and indistrial biotechnology of Food-Grade protease : A Prespective. *Food technology and biotechnology.* 44(2): 211-220.

VARIO C., CLAVER S., PRIO N. & NATALUCCI C.L. 2005. E xtraction and characterization of a coagulant preparation from *Silybum mariam* flower. Its action on bovin caseinate. *Journal of Dairy Research.* 72(3) : 335-343.

VOET D. VOET J.G. 2005. Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques. In : *Biochimie*. 2^{ème} éd. De Boeck Université Bruxelles . p : 131-541.

XIANG L., CHUNG-GINN L., ELLEN S. CASALE and JASON C. H. SHIH. 1992.
Purification and characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Bacillus Strain
Licheniformis. Appl. Environ. Microbiol., 58(10): 3271.

Résumés

ملخص

يعتبر الإنزيم البروتيني المدروس ذو أصل نباتي مستخرج من أزهار شوك الأفتنة البرية Galactite tomentosa « ويتم الحصول على المادة الخام بعد عملية طحن بواسطة الأزوت السائل . ان هذا الإنزيم في وجود المنظفات التجاري يظهر استقرارا ويعطي نتائج جيدة في الغسيل لهذا يعتبر مرشح للاستعمال في مجال التنظيف إنه كذلك يعتبر كمانع للتخثر يمكن استعماله في مجال الصيدلة و الدباغة الصناعية . استخلاص الإنزيم البروتيني الحامضي تم على مرحلتين : الاولى عن طريق الترسيب الجزيئي بسولفات الأمونيوم تتبعها مرحلة الميز و الثانية مرحلة الكروماتوغرافيا على sephadex G100 هذه الأخيرة تسمح أعطتنا جزءا واحدا ذو نشاط إنزيمي المردود من نشاط فعاليته بعد الترسيب و الميز وصل حتى 50,30% تقريبا و درجة نقاوة 5,49 الكروماتوغرافيا أعطت جزء نشط مع مردود يقدر ب 23,09 % و درجة نقاوة 15,47 أظهرت دراسة خصائص الإنزيم البروتيني المنقى جزئيا إنها إنزيم حامضي رقمه الهيدروجيني الأمثل هو 4 و درجة حرارته المثلى 40 ° م و له متوسط عمر يقدر ب 20 دقيقة عند الدرجة المؤوية 60 ° م و دراسة حركية هذا الإنزيم تعطي $K_m = 3,47 \text{ غ/ل}$ و $V_m = 525,834$ وحدة عالمية .

الكلمات المفتاحية : Galactite tomentosa, إنزيم بروتيني حامضي

Abstract

The original vegetal protease is considered from flowers of wild thistle of "Galactite tomentosa". The crude extract is obtained by grinding under liquid nitrogen, this protease also reacts as an anticoagulant and that can be used in pharmacy and dehairing enzyme in the field of industrial tannery. The enzyme is purified by two steps: fractional precipitation by the sulfated ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ followed by dialysis and molecular exclusion chromatography on sephadex G-100. This permits to separate one fraction with proteolytic activities, the yield of activity recovered after precipitation and dialysis reached near 50,32% with a degree of purification of 5,49. The chromatography gives an active fraction with a yield of 23,09% and a degree of purification 15.47. The characteristics of the partially purified protease showed optimal pH is 4 and its temperature is 40°C and has a half-life of 20 minutes at 60°C, the kinetic study of this protease gave a $K_m=3,47\text{g/l}$ and a $V_m=525.834$ UI.

Keywords: Protease, Galactite tomentosa, enzymatic activity, purification.

Présenté par : MERRAD NASSIMA

KERBACHE SANA

Thème : Les propriétés protéolytiques de Galactite tomentosa, Extraction, purification partielle et caractérisation

Nature de diplôme : Master

Domaine : Science de la vie

Mention : Biochimie

Option : Analyse Protéomique et Santé

Résumé

La protéase d'origine végétale extraite à partir des fleurs de Galactite tomentosa extraite par broyage dans l'azote liquide, cette protéase réagit comme un anticoagulant du sang et peut être utilisée pour le délainage des peaux dans le domaine de la tannerie et aussi dans les détergents. L'enzyme partiellement purifiée en deux étapes : la précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ suivie d'une dialyse et d'une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G-100. Cette dernière a permis de séparer une seule fraction active, Le rendement en activité récupérée après la précipitation et la dialyse est de 50,32 % avec un degré de purification de 5,49. La chromatographie donne une fraction active avec un rendement de 23,09% et un degré de purification de 15,47, les caractéristiques de la protéase partiellement purifiée montrent que le pH optimal est de 4 et sa température optimale est 40°C et elle possède un temps de demi-vie de 20 minutes à 60°C, l'étude cinétique de cette protéase a donné un $K_m=3,47\text{g/l}$ et un $V_m=525.834\text{UI}$.

Mots clés : Protéase, Galactite tomentosa, activité enzymatique, purification.

Devant le jury

Présidente : Mme .MERAIHI Z.

Pro .Univ1Constantine.

Rapporteur : Mme. BENKAHOUL M.

M.A. A. Univ1. Constantine.

Examineur : Mme. BOULMELTOUT M

Dr. Univ1. Constantine .