



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

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

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biochimie

Spécialité : Analyse Protéomique et santé

Intitulé

**Comparaison entre les propriétés des protéases extraites de fleurs de
Galactites tomentosa Moench et d'*Echinops ritro* L**

Préparé et soutenu par :

NAHOU AHMED

OULD CHEIKH OULD SAID MOHAMED

Le: 28/06/2016

Jury d'évaluation

Présidente : Mme BENKAHOUL M.

M.C.B- UFM Constantine

Encadreur : Mme MECHAKRA-MAZA A.

Professeur - UFM Constantine

Examinatrice : Mme BENHAMDI A.

M.C.B- UFM Constantine

Année universitaire: 2015-2016

Remerciements

Nous exprimons tout d'abord, nos profonds remerciements et louanges à DIEU Tout Puissant, qui nous a guidé sur le droit chemin et nous a donné le courage, la force et la volonté d'achever ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de biologie et environnement (bio-pole DE CHAABA ERSASS), et au laboratoire pédagogique d'enzymologie du département de biochimie et de biologie moléculaire et cellulaire.

Au terme de ce travail nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à

Madame le professeur **MECHAKRA-MAZA Aicha**, pour nous avoir donné l'occasion de rejoindre l'équipe du Laboratoire de Biologie et environnement, nous la remercions pour ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils au cours du stage.

Madame le Dr **BENKAHOUL M.**, pour son aide, ses précieuses remarques et ses suggestions au cours du travail pratique et pour avoir accepté de présider le jury.

Madame le Dr **BENHAMDI A.**, pour son aide et sa gentillesse infinie, nous la remercions aussi d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nos sincères remerciements vont, également, à tout le personnel du laboratoire de Biologie et Environnement, pour leur aide et surtout leur gentillesse. En particulier Mme **BOUCHERIT Z.**, à **kenza**, **Hayem**, **Ibtissem**, **Faiza** et Mme **Amel**.

Nous remercions rigoureusement Mme **Boukhelkhal L.**, Ingénieur au laboratoire pédagogique d'enzymologie pour son aide, et ses orientations.

Dédicace...

CE TRAVAIL MODEST EST DEDIE A :

Je dédie ce travail à mes chers parents, surtout ma chère mère. qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse. A mes chers sœurs Khadîdja et ismahen, et à mon cher frère Mohamed.

A tous mes amis surtout : ferdi aymen et son frère ramy

.....

A tous mes collègues de promotion.

A tous ceux que j'aime.

NAHOUI AHMED.

Dedication

I dedicate this humble work to all the members of my lovely family who supported me step by step during all my study's period may the greatest ALLAH bless and protect all of them.

It is also dedicated to my dear friends with whom I spent unforgettable moments may Allah bless them.

To all the persons that I love.

"All's well ends well"

Mohamed Cheikh Said

Liste des abréviations

AP: activité protéolytique.

AS : ammonium sulfate

AT : activité totale.

BSA: Bovine Serum Albumin.

EB : extrait brut.

E.C. : Enzyme Commission

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetate.

DPFP : diisopropylfluorophosphate

Ig: immunoglobuline

Gln : Glutamine

kDa : kilodalton

K_M : constante de michaelis

M : molaire

MM: masse molaire

N: normalité

PMSF: Fluorure de Phénylméthylsulfonyle

Pro : Proline

PT : Protéines totales.

R: rendement

rpm: round per minute.

T.C.A: Tri Chloroacetic Acid (Acide Trichloracétique)

U: unité

V_m : vitesse maximale

V.T : volume totale

W/v: ratio weight/volume (Poids/ volume).

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Mécanisme d'activation des protéases.....	03
Figure 2. Plante et fleurs de <i>Galactites tomentosa</i>	15
Figure 3. Plante et fleurs d' <i>Echinops ritro</i>	17
Figure 6. Dosage de l'AP des protéases de <i>G.tomentosa</i> en fonction du pH.....	25
Figure 7. Dosage de l'AP des protéases d' <i>E.ritro</i> en fonction du pH.....	26
Figure 8. Effet de la concentration du substrat sur la protéase acide de <i>G.tomentosa</i>	27
Figure 9. Cinétique de la protéase acide de <i>Galactites tomentosa</i> selon la représentation de Lineweaver-Burk.....	28
Figure 10. Effet de la concentration du substrat sur la protéase acide d' <i>Echinops ritro</i>	29
Figure 11. Cinétique de la protéase acide d' <i>Echinops ritro</i> selon la représentation de Lineweaver-Burk.....	29
Figure 12. Effet de la température sur l'activité protéolytique relative de la protéase acide extraite à partir des fleurs de <i>G.tomentosa</i>	30
Figure 13. Effet de la température sur l'activité protéolytique relative de la protéase acide extraite à partir des fleurs de d' <i>E.ritro</i>	31
Figure 14. Effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase acide extraite à partir des fleurs de <i>G. tomentosa</i>	32
Figure 15. Effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase acide extraite à partir des fleurs d' <i>E.ritro</i>	32
Figure 16. Digestion des protéines naturelles par l'extrait enzymatique de <i>Galactites</i> <i>tomentosa</i>	33
Figure 17. Digestion des protéines naturelles par l'extrait enzymatique d' <i>Echinops ritro</i> ..	33
Figure 18. Test de l'activité kératinase de deux extraits sur la peau de vache.....	34
Figure 19. Test de l'activité kératinase de deux extraits sur la peau de brebis.....	35
Figure 4. Courbe d'étalonnage de la Tyrosine.....	Annexe 1
Figure 5. Courbe d'étalonnage de la BSA.....	Annexe 2

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	04
Tableau 2 : Les grandes familles de protéases.....	06
Tableau 3 : Exemples de protéases d'origine végétale	11
Tableau 4 : Classification de <i>Galactites tomentosa</i>	15
Tableau 5 : Classification d' <i>Echinops ritro</i>	17
Tableau 6 : Résultats des dosages des activités protéolytiques des fleurs de <i>G. tomentosa</i> et <i>E. ritro</i> dans l'extrait brut et après précipitation par le sulfate d'ammonium.....	23
Tableau 7: comparaison entre les propriétés des protéases de <i>G. tomentosa</i> Moench et d' <i>E. ritro</i>	36

Sommaire

Liste des abréviations.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des tableaux	III
Introduction.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les Protéases.....	3
1.1.Généralités.....	3
1.2.Classification des protéases.....	3
1.2.1. Classification selon le mode d'attaque de la chaîne peptidique.....	4
1.2.2. Classification selon le pH d'activité.....	5
1.2.3. Classification selon les résidus impliqués dans la catalyse.....	5
1.2.4. Classification selon le système MEROPS.....	6
2. Applications technologiques des protéases.....	7
2.1.Industrie des détergents.....	7
2.2.Tannerie.....	7
2.3.Industries alimentaire.....	7
2.4.Industrie pharmaceutique et médicale.....	9
2.5.Biologie moléculaire et biotechnologie.....	9
2.6.Autres applications.....	10
3. Protéases végétales.....	10
4. Principales méthodes d'extraction des protéases végétales.....	12
4.1.Définition et principe de l'extraction.....	12
4.2.Définition et objectifs de la purification.....	12
4.3.Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium [(NH ₄) ₂ SO ₄].....	13
4.4.Dialyse	13
4.5.Centrifugation.....	13
4.6.Chromatographie d'exclusion.....	14
5. Les plantes utilisées dans ce travail.....	14
5.1. <i>Galactites tomentosa</i> Moench.....	14
5.1.1. Description de la plante adulte.....	14
5.1.2. Écologie et habitat.....	16
5.2. <i>Echinops ritro</i> L.....	16
5.2.1. Description.....	16
5.2.2. Habitat et répartition.....	18

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel biologique	19
2. Préparation des extraits bruts.....	19
3. Purification partielle des protéases.....	20
4. Méthodes de dosage des protéases.....	21
4.1.Méthode de dosage de l'activité protéolytique.....	21
4.2.Dosage des protéines selon la méthode de LOWRY (1951).....	21
5. Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	22
6. Etudes des caractéristiques des protéases acides des deux plantes.....	22
6.1.Détermination des paramètres cinétiques.....	22

6.2.Détermination de la température optimale.....	22
6.3.Détermination du pH optimum.....	22
7. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites.....	23
7.1.Activité anticoagulante.....	23
7.2.Activité kératinase.....	23

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium.....	24
2. Détermination du profil des activités protéolytiques en fonction du pH.....	24
2.1.Dosage de l'activité protéolytique en fonction du pH des protéases de <i>G. tomentosa</i>	25
2.2.Dosage de l'activité protéolytique en fonction du pH des protéases d' <i>E.ritro</i>	26
3. Résultats des propriétés physicochimiques des protéases purifiées.....	27
3.1.Mesure des paramètres cinétiques des protéases de <i>Galactites tomentosa</i>	27
3.2.Mesure des paramètres cinétiques des protéases d' <i>E.ritro</i>	28
3.3.Effet de la température sur l'activité protéolytique acide.....	30
3.4.Effet du pH sur l'activité protéolytique acide.....	31
4. Résultats des propriétés technologiques des protéases extraites.....	33
4.1.Test de l'activité anticoagulante du sang.....	33
4.2.Test de l'activité kératinase.....	34
5. Comparaison entre les propriétés des protéases extraites de <i>G. tomentosa</i> Moench et d'<i>E. ritro</i> L.....	36

Conclusion générale et perspectives.....	37
---	-----------

Références bibliographiques.....	38
---	-----------

Annexes

Résumés

Introduction

Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs de nature protéique synthétisées par toutes les cellules des organismes vivants et impliquées dans les réactions métaboliques. De par la spécificité de leur action et de la faible exigence en énergie des réactions catalysées, elles sont privilégiées en industrie car elles permettent de contourner les inconvénients des produits chimiques et améliorent les relations coûts-efficacité des procédés.

En 2015, le marché mondial des ventes d'enzymes industrielles a dépassé les 3 milliards de dollars ; les protéases représentaient environ 60 % des ventes. Cependant la production en enzymes en général et en protéases en particulier est loin de couvrir les besoins mondiaux. (CASTRO et al, 2015)

La recherche des protéases avec une spécificité distincte est un défi continu pour les applications industrielles variées. Bien que la plupart des protéases industrielles soient d'origine animale et microbienne, les protéases d'origines végétales ont reçu une attention particulière ces dernières années en raison de leur large spécificité, leur stabilité et leur durabilité à différents pH et températures (SCHALLER, 2004). La source végétale représente donc une source alternative répondant aux craintes des consommateurs liées à l'authenticité et l'interdiction religieuse de produits fabriqués à partir des certaines sources animales.

Les protéases végétales ont été longtemps employées dans les industries alimentaires et pharmaceutiques, comme la bromélaïne extraite des tiges et jus d'*Ananas erectifolius*, la papaïne de *Carica papaya* et la ficine de *Ficus glabrata* et de *Ficus laurifolia*, et beaucoup d'autres protéases extraites à partir des plantes qui ont une grande activité protéolytique. (LEE KL et al., 1997)

L'objectif de ce travail est l'étude des protéases extraites à partir de fleurs de deux plantes très répandues en Algérie, *Echinops ritro* L et *Galactites tomentosa* Moench, afin de les caractériser et connaître leurs propriétés.

Ce mémoire se divise en trois chapitres qui permettent de bien comprendre les objectifs des expériences ainsi que de bien montrer les résultats obtenus.

Une synthèse bibliographique est présentée au premier chapitre qui parlera des enzymes protéolytiques ensuite les matériels et méthodes utilisés dans ce travail exemple l'extraction

des protéases, leur caractérisation et les tests d'applications technologiques sont présentées dans le deuxième chapitre et en fin les résultats et discussions sont abordés en dernier chapitre.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

1. Les Protéases

1.1. Généralités

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes appartenant à la famille des hydrolases ; elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des molécules protéiques qui sont scindées en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés (FRAZIER, 1967). Ce sont des enzymes multifonctionnelles assurant beaucoup des fonctions physiologiques dans les animaux et les végétaux comprenant la germination, l'apoptose, les processus inflammatoires etc. (SCHALLER et al, 2004).

La plupart de protéases sont traduites sous formes d'enzymes inactives ou zymogènes (**figure1**) contenant des pro-domaines inhibiteurs, ces pro-domaines vont subir des modifications post-traductionnelles pour qu'elles soient actives (LAURA et al., 2014).

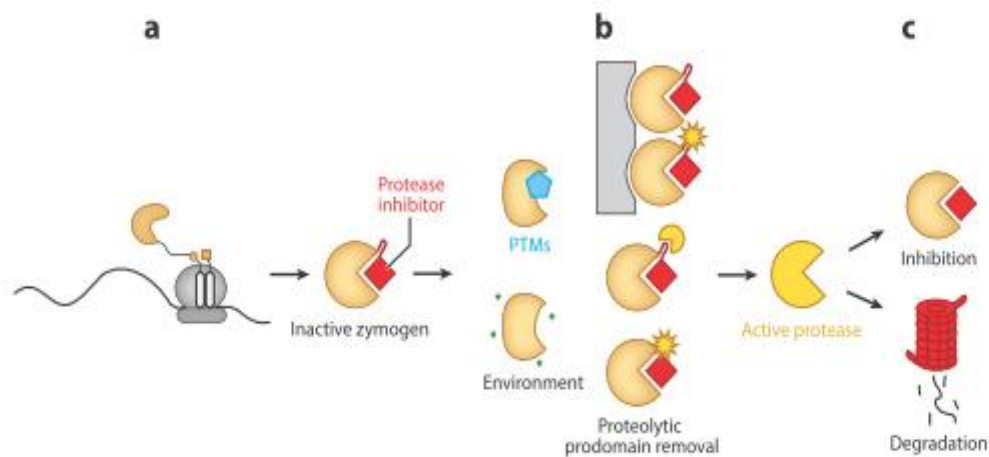


Figure 1 : Mécanisme d'activation des protéases (LAURA et al, 2014)

1.2. Classification des protéases

Les enzymes sont classées par la commission des enzymes (E.C.) de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (sigle anglais "*IUBMB*") en six groupes. Les protéases sont classées dans le 3^{ème} groupe, celui des hydrolases. Cependant, les protéases sont classées selon leur structure et de leur mécanisme d'action ; leur classification se base sur plusieurs critères tels que la longueur de la chaîne polypeptidique, le mode d'attaque de la

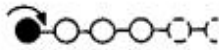

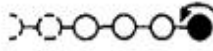
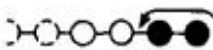

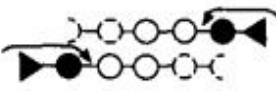
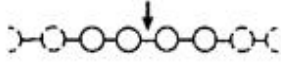
chaîne, le pH d'activité et la nature des résidus impliqués dans le site actif.

1.2.1. Classification selon le mode d'attaque de la chaîne peptidique

Les protéases sont classées selon leur mode d'attaque de la chaîne peptidique en endopeptidases et exopeptidases (SCRIBAN, 1999 ; MOODIE, 2001)

- ❖ **Les exopeptidases** : elles éliminent les acides aminés situés aux extrémités libres de la protéine et sont classées en :
 - Aminopeptidases : Coupent entre le premier acide aminé et le second acide aminé de la chaîne, libère donc l'acide aminé N-terminal.
 - Carboxypeptidases : Coupent entre l'avant dernier et le dernier acide aminé de la chaîne, libère donc l'acide aminé C-terminal.
- ❖ **Les endopeptidases (endoprotéases)**: elles coupent à l'intérieur de la chaîne peptidique.

Tableau 1 : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (ALAN et BARRETT, 1992)

Action	Group	EC subsection
	Exopeptidases Aminopeptidases	3.4.11
	Dipeptidyl-peptidases, tripeptidyl-peptidases	3.4.14
	Carboxypeptidases	3.4.16–18
	Peptidyl-dipeptidases	3.4.15
	Dipeptidases	3.4.13
	Omega peptidases	3.4.19
	Endopeptidases	3.4.21–24 and 99

1.2.2. Classification selon le pH d'activité

Les enzymes protéolytiques sont également distinguées selon la présence ou l'absence des groupements chargés (MARTINELLI et KINGHORN, 1994) en :

- ❖ Protéases acides
- ❖ Protéases neutres
- ❖ Protéases alcalines

1.2.3. Classification selon les résidus impliqués dans la catalyse

Les protéases peuvent se classer selon la nature des résidus formant leurs sites catalytiques (SUMANTHA et al., 2006). Les groupes les plus importants sont : les protéases à sérine, à aspartate, à cystéine, à glutamate et les métalloprotéases.

❖ *Séryl-protéases*

Ce groupe d'enzymes est active dans une gamme de pH comprise entre 7 et 11. Se sont donc des protéinases alcalines parmi ces protéases il y a, la **chymotrypsine**, l'**elastase**, et la **plasmine** à partir de la source animale, et la protéase à sérine à partir de la source microbienne. Ces enzymes ont en commun la présence des acides amines la sérine ou l'histidine dans leur site actif. Elles peuvent être inhibées par des molécules comme diisopropylfluorophosphate (DPFP) ou phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) (BELITZ et al., 2009).

❖ *Aspartyl-protéases*

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. 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 (RAO et al., 1998). La **pepsine** et la **chymosine** (rénine) appartiennent à cette famille (PELMONT, 1995).

❖ *Cystéyl-protéases*

Les représentants typiques de ce groupe d'enzymes sont la **papaïne** de *Carica papaya*, la **bromélaïne** d'*Ananas comosus* et la **ficine** de *Ficus latex*. Ces enzymes sont actives dans une large gamme de pH (entre 4,5-10). Le mécanisme d'activité de ces enzymes est similaire de celui des sérine-protéases.

Les sérine-protéases sont fortement sensibles aux agents oxydants, elles sont utilisées en présence d'un agent réducteur (cystéine) et un agent chélateur (EDTA) (BELITZ et al., 2009).

❖ *Les métalloprotéases*

Les métalloprotéases 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 métalloprotéases sont habituellement des protéases dites neutres, ayant un pH optimum se situant près de 7,0. Toutefois, certaines métalloprotéases sont des protéases alcalines, avec un pH optimum autour de 10 (RAO et al., 1998).

Tableau 2 : Les grandes familles de protéases (ARAMA, 2015)

N°	Familles	Exemples
1	Protéases à Sérine	Trypsine, Chymotrypsine, Thrombine, Cathepsine A, Subtilisine, Kallicréine.
2	Protéases à Cystéine	Caspases, Papaïne, Cathepsines B, C, F, H, K.
3	Protéases à Aspartate ou protéases acides	Pepsines, Cathepsines D, E, Rénines.
4	Métallo-protéases	Collagénases, Gélatinases, Thermolysine, Matrilysine.
5	Protéases à Thréonine ou Thréonine-asparaginases	Taspase 1, Complexe 20S du protéasome

1.2.4. Classification selon le système MEROPS

Le système MEROPS est un système hiérarchique accessible en ligne, dans lequel les peptidases sont individuellement reconnues sur la base de leur structure. Elles sont ensuite regroupées dans des familles autour d'un membre fondateur ou "exemple type".

Cette classification repose sur les principes de la phylogénie (l'homologie), étude des relations de parenté des êtres vivants. Une peptidase est ainsi assimilée à une famille quand l'enchaînement de ses acides aminés, montre une homologie de séquence par rapport à l'exemple type, ou à un autre membre existant de la famille (**MEROPS**).

2. Applications technologiques des Protéases

Les protéases jouent un rôle important dans de nombreux secteurs industriels, en particulier dans les détergents (GUPTA *et al.*, 2002), les industries alimentaires comme la boulangerie, la fromagerie, les transformations alimentaires...etc. (SULLIVAN et CALKINS, 2010). ainsi que dans le domaine pharmaceutique et médicale comme des traitements de quelques maladies exemple les désordres de la digestion, le cancer et dans les infections virales (WALSH, 2002; OTSUKI *et al.*, 2010).et plusieurs autres secteurs technologiques.

2.1. Industrie des détergents

Les protéases utilisées dans l'industrie de détergents représentent 35% du marché mondial des enzymes industrielles (CHERRY et FIDANTSEF, 2003). Elles servent également comme produits de nettoyage pour des usages industriels, pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. 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) (RAO *et al.*, 1998). 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).

2.2. Tannerie

Les sérlylprotéases 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*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation des produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients (RAO *et al.*, 1998; GUPTA *et al.*, 2002).

2.3. Industries alimentaires

Les protéases sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. entre autres dans la brasserie, les boissons, pour la préparation d'hydrolysats de protéines solubles et aromatisés (protéases de type papaine), en tant que complément alimentaire (LAVALLE *et al.*, 2000) et pour la production d'émulsifiants (PARDO *et al.*, 2000).

❖ Fromagerie

L'application majeure des protéases dans l'industrie alimentaire est dans la fabrication de fromages (RAO et *al.*, 1998).

La présure a été l'enzyme utilisée à cette fin depuis longtemps. Cependant, les fluctuations du prix de caillette et leur pénurie épisodique fait qu'elle est de moins en moins utilisée et tend à être remplacée par des protéases microbiennes (AVIRON et *al.*, 1982). D'autres protéases d'origine végétale comme la papaïne, la bromélaïne, la ficine et les cardosines sont actuellement utilisées dans l'industrie fromagère (UHLIG, 1998).

❖ Boulangerie

Les endo et les exoprotéinases d'*A. oryzae* sont utilisées pour modifier le gluten de blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte ; un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (AVIRON et *al.*, 1982 ; AGUILAR et *al.*, 2008).

Des protéases bactériennes sont également souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (RAO et *al.*, 1998).

La bromélaïne a également été utilisée pour obtenir de la farine de frome hypoallergénique, en raison de sa capacité à briser l'épitope IgE du gluténines du blé Gln-Gln-Gln-Pro-Pro . (TANABE et *al.*, 1996).

❖ Préparation de produits à base de soja

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja ainsi que d'autres produits à base de soja. Le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "*alcalase*" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles utilisés comme additifs protéïniques dans les jus et boissons fruitées et dans la formulation des 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 thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de L'aspartam (un édulcorant à basse calorie) à partir de l'acide L-aspartique et de la L-Phénylalanine méthyle ester. Il est produit industriellement par Toya Soda (Japon) (RAO et *al.*, 1998; LEISOLA et *al.*, 2001).

❖ Transformation des aliments

La douceur et la tendresse de la viande sont les facteurs les plus importants qui affectent la satisfaction des consommateurs et de la perception du goût (Miller et *al.*, 2001). D'autres protéases ont une grande capacité à améliorer la tendresse dans la viande et donne une dégradation équilibrée des deux protéines myofibrillaires et de la collagène (SULLIVAN et CALKINS, 2010).

Des cysteyle-protéases d'origine végétale, comme la papaïne brute ou la bromélaïne sont utilisées dans le domaine de brasserie ,ainsi que la ficine (PRIEST et STEWART, 2006). Alors que une autre utilisation des protéases d'origine végétale c'est la génération des hydrolysats protéiques de poissons (ASPMO et *al.*, 2005).

2.4. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement des agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*A. oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion ; des collagénases sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des plaies et des ulcères dermiques (RAO et *al.*, 1998) ; la « Brinase » (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et la fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (SUMANTHA et *al.*, 2006).

Des protéases végétales ont été utilisées pour traiter les nématodes gastro-intestinaux (MUELLER et MECHLER, 2005). D'autre sont appliquées cliniquement pour l'identification des anticorps (ROOKARD et *al.*, 2009).

Des mélanges d'enzymes protéolytiques contenant la trypsine, la chymotrypsine, la papaïne et la bromélaïne sont utilisés dans le traitement des cancers du sein, colorectal et le cancer du plasmacytome (BEUTH 2008; SALAS et *al.*, 2008).

La bromélaïne extraite de tige de l'ananas (*Ananas comosus Merr*) est employée dans les industries alimentaires et pharmaceutiques pour traiter le cancer, les désordres de la digestion, contre les maladies virales, dans les processus inflammatoires, pour empêcher les œdèmes, l'agrégation plaquettaire et les métastases en raison de sa capacité à modifier les structures de surface cellulaire par clivage du peptide.

2.5. Biologie moléculaire et biotechnologie

Les protéases sont également largement appliquées dans plusieurs secteurs de l'industrie et de la biotechnologie, ainsi que dans de nombreuses applications de recherche comme la synthèse

des peptides, digestion des protéines non désirées lors de la purification des acides nucléiques, séquençage des peptides et la digestion protéolytique des protéines en Proteomique (JANOS et al., 2013).

Récemment, la protéase de *Cucumis melo* a été utilisée pour l'extraction d'ADN à partir de rognures d'ongles d'une manière efficace Les rognures d'ongles sont utilisées lorsque les circonstances ne permettent pas d'obtenir des échantillons de sang ; elles peuvent être une autre source d'ADN génomique pouvant être stocké facilement (YOSHIDA-YAMAMOTO et al. 2010).

2.6. Autres applications

Les protéases sont considérées aussi comme moyen efficace pour le traitement des rejets riches en protéines (DALEV, 1994). La protéase neutre de *B. subtilis* peut être également utilisée pour le décreusage de la soie naturelle. Les protéases sont employées aussi avec des mélanges des enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Aviron-VIOLET et al., 1982).

Des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles (Ichida et al., 2001), une autre utilisation des protéases neutres est la récupération d'argents à partir des films photographiques par hydrolyse de la gélatine (SUMANTHA et al., 2006).

3. Protéases végétales

Les protéases peuvent être isolées à partir des animaux, des végétaux ou des microorganismes. Les protéases d'origine animale les plus connues sont la chymotrypsine, la trypsine pancréatique, l'élastase, la pepsine, la rénine. (SCRIBAN, 1999). Les protéases peuvent être produites aussi par les moisissures, les levures et les bactéries. Les enzymes fongiques représentent 40% du marché mondial des enzymes industrielles plusieurs genres fongiques sont utilisés pour la production des protéases tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, et *Rhizopus*, (UL-HAQ et al., 2003), et des levures tels que *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces*, et *Saccharomyces* (BOIRON, 1996).

Bien que la plupart des protéases soient d'origine animale et microbienne, les protéases végétales ont reçu une grande importance en raison de leur large spécificité, stabilité et durabilité à divers pH et températures (UHLIG, 1998). Papaine, bromélaïne, kératinase et ficine sont certaines des protéases végétales les plus connues. La papaine est (active entre pH

5 et 9) est extraite du latex des fruits de la *papaye Carica*. La bromélaïne est préparée à partir des tiges et du jus d'ananas (*Ananas comosus Merr*) (SALAS et al., 2008), la ficine issue de *Ficus glabrata* (MOODIE, 2001). La kératinase, une autre protéase qui dégrade les cheveux et les laines elle est produite par quelques groupes de plantes (RAO et al., 1998). Des exemples de protéases végétales sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Exemples de protéases d'origine végétale

Nom de protéase	Sources	Type protéases	AA dans le site catalytique	Références
Cardosine	<i>Cynara cardunculus</i>	Acide Aspartique	2 aspartate	Silva et al. 2003
Cynarase	<i>Cynara scolymus</i>	Acide Aspartique	2 aspartate	Sidrach et al. 2005
Procirsine	<i>Cirsium vulgare</i>	Acide Aspartique	2 aspartate	Lufrano et al. 2012
Cardonsin like	<i>Cynara humilis</i>	Acide Aspartique	2 aspartate	Esteves et al. 2003
Ficine	<i>Ficus racemosa</i>	Cystéine	Cystéine	Devaraj et al. 2008
Actinidine	<i>Actinidia chinensis</i>	Cystéine	Cystéine	Katsaros et al. 2010
Neriifoline	<i>Euphorbia neriifolia</i>	Serine	Serine	Yadav et al. 2011
Religosine	<i>Ficus religiosa</i>	Serine	Serine	Kumari et al. 2010
Lettucine	<i>Lactuca sativa</i>	Non spécifiées	Serine	Lo Piero et al. 2002

4. Principales méthodes d'extraction des protéases végétales

Pour l'isolement d'une enzyme, deux grandes étapes constituent le processus d'obtention de la biomolécule : l'extraction et la purification (LAURENT, 1982).

4.1. Définition et principe de l'extraction

Le mot extraction est formé de deux mots d'origine latine : « ex » et « traction » qui signifie tiré à l'extérieur. On peut dire que le mot extraction désigne l'action de séparer une substance quelconque du composé dont elle fait partie (BRISSET, 2005). Les méthodes d'extraction correspondent au transfert sélectif d'un soluté contenu dans le milieu initial vers un second milieu dans le quel il est soluble en vue de son isolement (BRISSET, 2005).

L'extraction consiste en la libération des enzymes des cellules ou constituants cellulaires, nécessitant donc un éclatement de la paroi ou de la membrane cellulaire, par des procédés mécaniques, physiques ou chimiques (LAURENT, 1982).

Bien qu'il n'y ait aucune règle précise et rapide pour choisir le tissu et/ou l'organisme pour l'isolement d'une enzyme, il est toujours préférable de choisir une source enrichie en cette enzyme particulière, d'autres éléments sont à prendre en considération (KUMAR et GARG, 2006).

L'extraction des protéases se fait par des méthodes physiques ainsi que des méthodes chimiques qui permettent la libération des différents composants de la cellule. Le broyage est souvent la méthode la plus utilisée. Le broyage sous azote liquide permet de libérer la plupart des protéases intra ou extracellulaire sans les dénaturer. Suite à un refroidissement brusque et à la concentration du soluté intra et extracellulaire, la formation de cristaux intra et extracellulaires entraîne des cassures dans la cellule (LAURENT, 1982). C'est le cas de l'extraction des différentes protéases d'origine végétale à partir de *Cynara Scolymus*, de *Cynara cardunculus* (LORENTE *et al.*, 2004).

4.2. Définition et objectifs de la purification

La purification est un ensemble d'opérations visant à enlever toutes les impuretés d'un extrait brut contenant l'enzyme d'intérêt. En principe, n'importe quelle méthode destinée au fractionnement de protéines peut être employée pour la purification d'enzymes (ILLANES, 2008).

La purification d'une protéine donnée passe par l'étude de différents critères la caractérisant, et permettant de la séparer des autres molécules (taille, forme, charge...) (CEZARD, 2009).

Alors, la purification des enzymes a comme objectifs essentiels d'avoir : (HAINQUE *et al.*, 2008 ; CEZARD, 2009):

- Un maximum du rendement de l'enzyme ;
- Un maximum de pureté possible ;
- Un maximum de son activité catalytique.

4.3. Précipitation différentielle au sulfate d'ammonium [(NH₄)₂SO₄]

La précipitation différentielle est une technique plus douce qui préserve en générale la structure, et donc la fonction des protéines (peu dénaturante, elle n'altère pas non plus l'activité des éventuelles enzymes (CEZARD, 2009).

L'addition du sulfate d'ammonium à une solution protéique provoque une déshydratation et précipitation des protéines, induisant ainsi le phénomène de relargage (l'avantage du relargage est que les protéines conservent leur conformation native et peuvent être dissoutes sans dénaturation) (ABDELLAOUI, 2007).

Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéases de *Synergistes sp* (KUMAR *et al.*, 2008), *Mucor pusillus* (NOUANI *et al.*, 2009), *Aspergillus niger* (KALPANA *et al.*, 2008).

Les ions sulfates et ammonium sont petits et neutralisent efficacement les charges des protéines. Cette méthode devra être suivie d'un lavage pour éliminer le sel résiduel (en général par dialyse, gel de filtration) (CEZARD, 2009).

4.4. Dialyse

La dialyse permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane semi-perméable appelée membrane de dialyse. Les membranes de dialyse utilisées se présentent sous forme de cylindres allongés qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contiennent le liquide à dialyser. Ce cylindre prend alors 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 (HAINQUE *et al.*, 2008).

4.5. Centrifugation

Dans cette méthode, les molécules de protéine sont soumises aux forces (centrifuges) de la gravité (les molécules de protéine sont des macromolécules) (NITIN *et al.*, 2007). En effet, si

la particule a une densité plus élevée que le fluide dans lequel elle est immergée, elle tend à migrer en bas, suivant la direction de force de pesanteur (MIKKELSEN et CORTON, 2004).

Ce déplacement des particules dans le sens de la force centrifuge est dénommé sédimentations ; lorsque les particules en suspension dans leurs solvant sont ainsi placées dans le rotor d'une centrifugeuse, la mise en œuvre de la centrifugation génère une accélération qui pousse les particules vers l'extérieur du rotor, donc vers le fond du tube de centrifugation (HAINQUE et *al.*, 2008).

4.6. Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est un gel ou un réseau macromoléculaire exerçant un véritable effet de tamis vis-à-vis de grosses molécules, celles-ci migrant plus vite que les molécules de plus faible poids moléculaire qui elles peuvent diffuser librement dans la phase stationnaire alors que les premières ne le peuvent pas (GWENOLA et BURGOT, 2011).

5. Les plantes utilisées dans ce travail

Les plantes étudiées dans ce travail sont *Galactites tomentosa* Moench et *Echinops ritro* L.

5.1. *Galactites tomentosa* Moench

Galactites tomentosa Moench, appelé couramment le chardon laiteux, Galactites cotonneux ou autres noms c'est une espèce de plantes herbacées de la famille des Asteraceae d'origine méditerranéenne, c'est une plante proche des chardons et des cirses. Le nom scientifique du genre évoque en grec le lait, allusion à la couleur laiteuse des tiges et surtout aux nervures blanchâtres des feuilles des Galactites. (LONGO et DANIELA, 2008). Le tableau 4 donne la classification de la plante *G.tomentosa Moench*

5.1.1. Description de la plante adulte

- ✚ Hauteur : 20 à 80 cm
- ✚ Tige dressées fortement ramifiées tomenteuses
- ✚ Feuilles vertes irrégulièrement tachées de blanc sur la face supérieure, un peu velues au-dessus et blanches tomenteuses (cotonneuses) en-dessous, feuilles étroites
- ✚ Fleurs tubulées purpurines en capitules assez grands. Fleurs extérieures, grandes, rayonnantes de teinte pourpre clair. Fleurs centrales hermaphrodites. Bractées s'achevant en épines. Réceptacle garni de longs poils lisses
- ✚ Fruits : akènes

La classification ainsi que les images de la plante entière et la fleur de *Galactites tomentosa* Moench est représentés dans le **tableau 4**.

Tableau 4 : Classification de *Galactites tomentosa*.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Galactites</i>
Espèce:	<i>G. tomentosa</i> Moench



Photo personnelle, 2016

HECTONICHUS, 2007

Figure 2 : plante *entière* et fleur de *G. tomentosa*

5.1.2. Écologie et habitat

C'est une plante annuelle surtout présente dans l'ouest du bassin méditerranéen mais aussi, moins fréquente, le long des côtes atlantiques. Elle apprécie les terrains sablonneux et secs, avec une légère préférence pour les sols acides. C'est un adventice des plantations d'oliviers ou des vignes. Sa floraison a lieu aux mois d'avril à août.

5.2. *Echinops ritro*

Echinops ritro appelé couramment azurite ou oursin bleu, قنفذي الأزرق (*Echinops*) est une plante vivace appartenant au genre *Echinops* et à la famille des *astéracées*.

5.2.1. Description

- ✚ Feuilles fermes, vertes et glabres ou aranéuses en dessus, très blanches-tomenteuses en dessous, pennatifides ou pennatipartites à lobes fortement épineux
- ✚ Poils basilaires de l'involucre égalant environ le quart de la longueur des folioles intérieures de ce dernier, celles-ci ciliées sur les bords, glabres du reste.
- ✚ Akène à soies dépassant la cupule formée de poils soudés seulement à la base, transportés et disséminés par le vent.
- ✚ Capitules épineux de 3 à 3,12 cm de diamètre.
- ✚ La floraison a lieu entre juillet et septembre. Il apparaît de nombreuses inflorescences sphériques bleu-violet disposées en panicule. Comme pour toutes les plantes du genre *Echinops*, ces inflorescences portent de nombreux capitules ayant chacun une seule fleur tubulée à cinq lobes. Bien que la pollinisation se fasse généralement grâce aux insectes (plante entomogame), une autofécondation est possible.

Tableau 5: Classification d'*Echinops ritro*.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Echinops</i>
Nom binominal	<i>Echinops ritro</i>



Photo personnelle, 2016

<http://www.tela-botanica.org/bdtfx> nn-
description**Figure 3 :** plante entière et la fleur d'*E.ritro*.

5.2.2. Habitat et répartition

Assez courante dans l'Europe méridionale et plus généralement sur le pourtour méditerranéen, elle affectionne les friches et prairies sèches, rocheuses, le plus souvent sur le sol calcaire <http://www.tela-botanica.org/bdtfx>.

Chapitre II
Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

Le travail a porté sur deux plantes, *Echinops ritro* L. et *Galactites tomentosa* Moench.

La récolte a été réalisée au niveau de CHAAB ERSSAS (Constantine, Algérie) aux mois d'Avril et de Mai 2016.

2. Préparation des extraits bruts

Après avoir récolté les fleurs des deux plantes, les pétales sont récupérées séparément, séchées par le CaCl_2 pendant quelques jours, puis broyées sous l'azote liquide à l'aide d'un mortier. La poudre obtenue est divisée en trois lots, le premier pour l'extraction au NaCl, le deuxième pour l'extraction dans du tampon citrate/ phosphate et le troisième pour l'extraction dans du tampon Tris- HCL.

❖ Extraction dans le tampon citrate-phosphate

La poudre obtenue à partir des deux plantes est solubilisée dans du tampon citrate- phosphate (0,02M) a pH 5,5 selon un rapport de 1/7 (w/v) ; Les mélanges sont homogénéisés par une agitation modérée pendant quelques minutes en présence de Triton X100 à 1% (v/v), incubés pendant 24h à 4°C puis filtrés sur des compresses de gaze et enfin centrifugés (centrifugeuse Sigma 2-16KL) à une vitesse de 10 000 rpm pendant 20 min. Les surnageants récupérés constituent les extraits bruts 1 (EB1). Ces extraits serviront à la purification partielle et à la caractérisation.

❖ Extraction dans le NaCl

La deuxième fraction de la poudre est solubilisée dans une solution de NaCl à 0,9% selon un rapport de 1/7 (w/v) selon le même protocole qu'avec le tampon citrate/phosphate. Les surnageants récupérés constituent les extraits bruts 2 (EB2). Ces extraits serviront à établir le profil des pH.

❖ Extraction dans le Tris-HCl

La troisième fraction de la poudre est solubilisée dans du tampon Tris-HCl (50 mM) a pH 8 selon un rapport de (1/7), selon le même protocole précédant. Les surnageants récupérés

constituent les extraits bruts 3 (EB3). ces extraits serviront à tester les propriétés technologiques des protéases.

3. Purification partielle des protéases

Les protéases de deux plantes sont purifiées en deux étapes, la première correspond à précipitation par le sulfate d'ammonium à 40% et la deuxième étape consiste à une dialyse des fractions précipitées.

❖ Précipitation par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Une quantité de sulfate d'ammonium est ajoutée à l'extrait de chacune des deux plantes de façon à avoir une saturation de 40%. Le mélange est agité modérément dans un bain de glace pendant 1 heure, puis centrifugé à 10000 rpm (centrifugeuse Sigma 2-16KL) pendant 30 minutes.

Les culots sont récupérés dans 5 ml de tampon citrate-phosphate (0,02M) à pH 5,5 pour EB1.

❖ Dialyse

Les fractions obtenues après la précipitation sont dialysées dans des sacs de cellophane (bag 260 C.T de 2 cm de diamètre) découpées en boudins, contre un grand volume de tampon citrate /phosphate

🧩 Préparation des membranes de dialyse

Les membranes de cellophane sont placées d'abord dans une solution mélange éthanol-eau (v/v) pendant 1 heure, ensuite dans une solution de bicarbonate de sodium 10 mM pendant 1 heure, puis dans une autre solution d'EDTA pendant 1 heure et enfin dans de l'eau distillée pendant 2 heures. Ces membranes peuvent être conservées pendant 2 à 3 jours à 4 °C en présence d'un antimicrobien, l'azide de sodium.

🧩 Mode opératoire

Les fractions obtenues après la précipitation sulfate d'ammonium 40% de deux plantes sont dialysées dans les membranes préalablement préparées contre un grand volume du tampon citrate phosphate (0,02 M, pH 5,5) à 4°C pendant 24 h sous agitation.

Les protéines totales et l'activité protéolytique sont dosées après chaque étape.

3. Méthodes de dosage des protéases

Le dosage des protéases est effectué après chaque étapes, ils existent deux types de dosages : le dosage de l'activité protéolytique et le dosage des protéines totales.

3.1. Méthode de dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est dosée selon la méthode décrite par AUBERGER et *al* (1995) et modifiée par MECHAKRA et *al*. (1999) (Voir annexe1).

Le principe de la réaction est le suivant. Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et des polypeptides pour les transformer en fragments protéiques plus courts (polypeptides, peptides simples et acides aminés libres). Le TCA permet la précipitation des fractions insolubles. La filtration permet de récupérer les fractions solubles, dont des groupements de tyrosine. La présence de tyrosine dans le filtrat est traduite en activité protéolytique par un dosage colorimétrique selon la méthode d'Anson, (1938), à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu. Celui-ci réagit avec ces groupements et avec le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml (Voir annexe 1).

Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par ml d'une solution d'enzyme avec comme substrat, soit la caséine, soit l'hémoglobine. Chaque dosage est effectué en double.

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

Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY et *al* (1965) dont le principe de base est fondé sur la résultante de deux réactions. Dans le premier temps, la présence de sulfate de cuivre en milieu alcalin entraîne la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique avec l'apparition d'une coloration violette proportionnelle à la quantité d'acides aminés présents dans le milieu (réaction de Biuret). La deuxième réaction résulte de la réduction de tyrosine et tryptophane présents dans les protéines par le constituant actif du réactif de Folin-Ciocalteu l'acide phosphomolybdo-tungstique pour donner naissance à un complexe bleu (Voir protocole en annexe 2).

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de BSA (Sigma Aldrich) avec des concentrations comprises entre 0 et 1000 µg/ml (voir annexe 2).

4. Effet du pH sur l'activité protéolytique

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

L'hémoglobine est dénaturée selon la méthode d'ANSON (1938) et modifiée par VAIRO CAVALLI *et al.* (2005). 20 ml de la solution d'hémoglobine à 2,5% est mélangé avec 2,5ml d'HCl 0.6 M, puis agité pendant 30 min puis filtré. Le pH est ajusté à 4 par une solution de NaOH 0,5M. (BRUTTI *et al.*, 2012).

5. Etudes des caractéristiques des protéases acides des deux plantes

Les fractions partiellement purifiées ont été étudiées afin de déterminer quelques caractéristiques des protéases acides d'*Echinops ritro* et *Galactites tomentosa* : détermination des paramètres cinétiques, du pH optimum et de la température optimale.

5.1. Détermination des paramètres cinétiques

Les constantes cinétiques des protéases étudiées (V_m et K_M) sont déterminées par la mesure des activités aux optima de pH et de température en fonction de concentrations croissantes de caséine soluble de 0 à 1,75 % avec un intervalle de variation de 0,25%. Deux courbes sont tracées, la première est celle de Michaelis, elle permet de déterminer le type de cinétique (michaelienne ou allostérique) et la deuxième est la représentation de Lineweaver-Burk qui permet de calculer les paramètres cinétiques K_M et V_m .

5.2. Détermination de la température optimale

La température optimale des protéases étudiées est déterminée en traçant les courbes de l'activité protéolytique en fonction de températures variant de 20°C à 70°C avec un incrément de 10°C. Pour chaque température, les enzymes sont incubées pendant 1 heure à pH optimal.

5.3. Détermination du pH optimum

Le pH optimal de la protéase acide de chacune de deux plantes étudiées est déterminé par la méthode de Dixon. L'activité est mesurée en fonction de pH variant entre 2,5 et 7 (avec un intervalle de 0,5 unités) en présence de l'hémoglobine dénaturée selon la méthode de VAIRO CAVALLI *et al.* (2005). Le dosage est réalisé dans les conditions décrites plus haut.

6. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites

L'évaluation des propriétés technologiques de protéases extraites à partir de fleurs de deux plantes : *G. tomentosa* et *E. ritro* sont déterminées pour l'activité anticoagulante et l'activité kératinase.

6.1. Activité anticoagulante

Les extraits bruts de deux plantes sont testés pour les propriétés anticoagulantes sur du sang coagulé. Chaque extrait enzymatique (2 ml) est mélangé à 1ml de tampon citrate phosphate pH 6,8 et 3 ml de substrat. Après 12 d'incubation à température ambiante, le résultat de l'hydrolyse est évalué par un examen visuel (SEN et al., 2011).

6.2. Activité kératinase

Deux pièces de peau de vache et de brebis (5 x 5 cm) sont incubées séparément dans 20 ml des extraits de chaque plante extraites dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 et à 45° C pendant 3 h et 18 h. Les peaux sont vérifiées par rapport à l'enlèvement des poils par un examen visuel (HADDAR et al., 2011).

Chapitre III
Résultats et Discussions

1. Résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium

Les résultats des activités protéolytiques des extraits de fleurs de *Galactites tomentosa* Moench et *Echinops rito* L avant et après précipitation par l'AS à 40% sont présentés dans tableau 6. On observe une légère augmentation du taux de purification pour les deux plantes et un rendement de compris entre 25 et 26. La précipitation fractionnée des protéases de *G. tomentosa* réalisée par BENKAHOUL et al. (2015) a montré une activité maximale à 30% de saturation d'A.S. D'autre part, l'étude réalisée par PHANUPHONG et al. (2010) sur l'extraction et la séparation des protéases de papaye a montré que l'activité protéolytique est inversement proportionnelle avec la saturation de sulfate d'ammonium

Tableau 6 : Résultats des dosages des activités protéolytiques des fleurs de *G. tomentosa* et *E. rito* dans l'extrait brut et après précipitation par le sulfate d'ammonium.

Plante	Fraction	V.T (ml)	A.T (U)	PT (mg)	AS (U/mg)	Taux de purification	Rendement (%)
<i>G. tomentosa</i> Moench	Extrait brut	30	6500	98.09	66.26	1	100
	Précipité à 40% AS	3	1750	24.56	71.2	1.07	26
<i>E. rito</i> L.	Extrait brut	30	4538	65	69.81	1	100
	Précipité à 40% AS	7	1153	10	113	1.62	25

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

Les différentes formes de protéases contenues dans les fleurs des plantes *Galactites tomentosa* et *Echinops rito* sont caractérisées par la mesure de l'activité enzymatique des extraits bruts (dans du NaCl à 0.9%) en fonction du pH dans l'intervalle de 3 jusqu'à 9 en présence de deux substrats différents ; l'hémoglobine dénaturée dans l'intervalle de pH 3 à 6,5 et la caséine dans l'intervalle de pH 4,5 à 9.

2.1. Dosage de l'activité protéolytique en fonction du pH des protéases de

G. tomentosa

Les résultats de l'activité protéolytique des protéases de *G. tomentosa* en fonction du pH sont présentés dans la **figure 6**. Ils montrent l'existence de deux pics majeurs d'activité, l'un à pH 4 avec une valeur de 1701 U. et l'autre à pH 8,3 avec une valeur de 1750 U. Cela indique qu'il existe au moins deux formes différentes de protéases dans les fleurs de *G. tomentosa*.

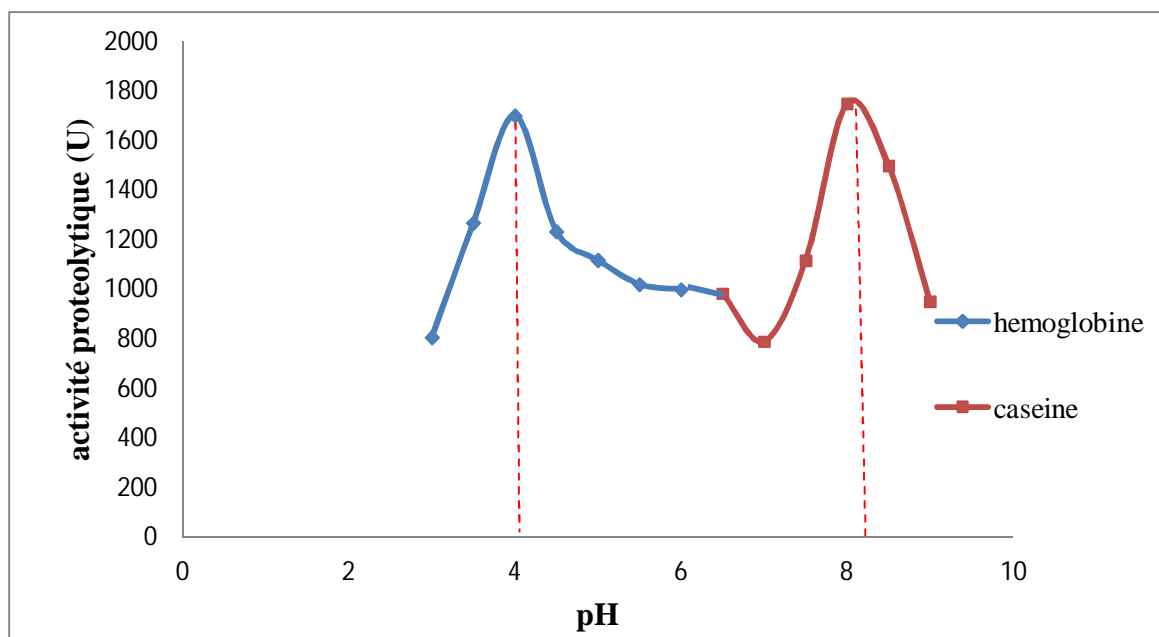


Figure 6: Dosage de l'AP des protéases de *G.tomentosa* en fonction du pH

Des activités protéolytiques acides proches de 4, ont également été obtenues par plusieurs auteurs aussi bien pour les plantes que pour les moisissures. C'est le cas de VAIRO CAVALLI et al (2005) pour la protéase de *Silybum marianum* avec une valeur de 3,8 et de BENLOUNISSI et al. (2012) pour les moisissures *Aspergillus tubengensis* (pH 4,3) et *Aspergillus awamori* (pH 4,5).

Des activités protéolytiques alcalines proches de 8,3 ont été noté par CHEN et al (2003) pour la protéase de *C. Cardunculus* (pH 6), par CHAZARRA et al (2007) pour la protéase de *Cynara scolymus* (pH 7) et par EL-SAYED et al (2013) pour la protéase extraite à partir de *Brassica napus*.

2.2. Dosage de l'activité protéolytique en fonction du pH des protéases d'*E.ritro*

Les résultats de l'activité protéolytique des protéases d'*E.ritro*. en fonction du pH sont présentés dans la **figure 7**. Ils montrent l'existence de deux pics d'activité, l'un à pH 7,5 et l'autre à pH 3. Ce dernier représente l'activité majeure. Cela indique qu'il existe au moins deux formes différentes de protéases dans les fleurs d'*E.ritro*.

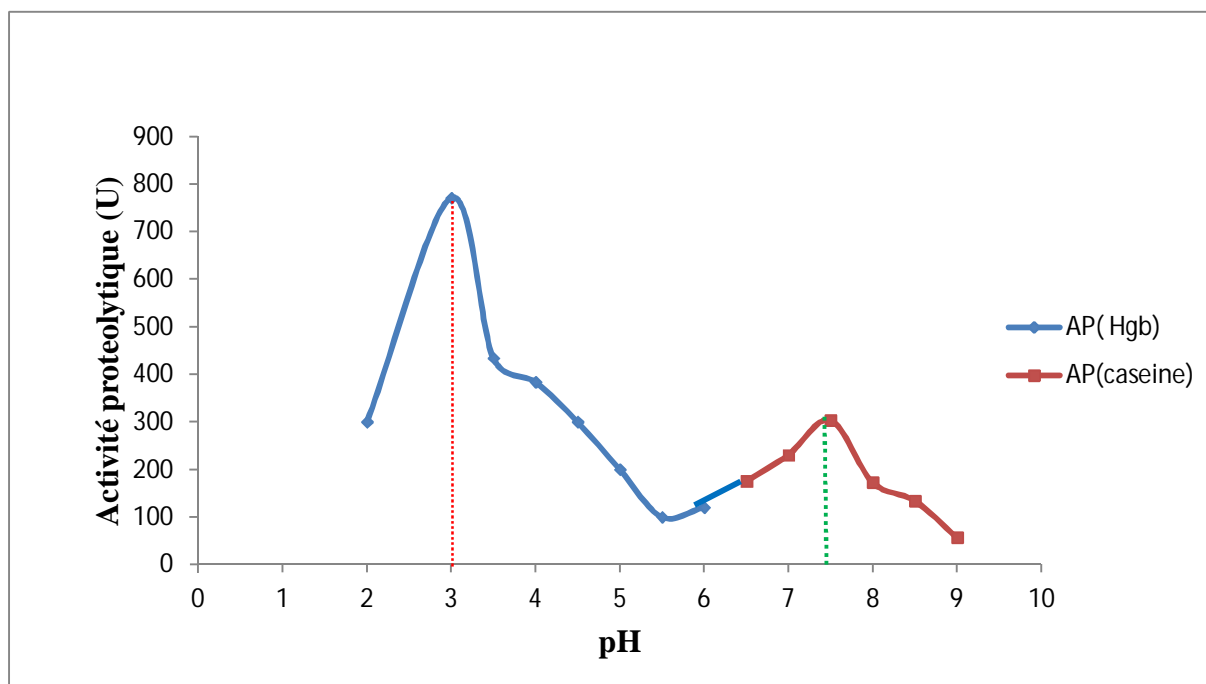


Figure 7 : Dosage de l'AP des protéases d'*E.ritro* en fonction du pH.

Des activités protéolytiques acides proches de 3, ont également été obtenues par plusieurs auteurs aussi bien pour les plantes que pour les moisissures. C'est le cas de VISHWANATHA *et al* (2009) pour la protéase d'*A.oryzae* MTCC 5341 (pH 3,2), par VAIRO CAVALLI *et al* (2005) pour la protéase de *Silybum marianum* (3,8).

Des activités protéolytiques neutres proches de 7,5, ont également été obtenues par plusieurs auteurs pour la protéase neutre produite par plusieurs moisissures, En effet, les protéases neutres d'*A. oryzae* présentent des pH optimums de 7 (SEKINE, 1972 ; BENKAHOUL, 2002; SUMANTHA *et al.*, 2005) ; un pH entre 6,0 et 7,0 (BATTAGLINO *et al.*, 1991), et pH 7,2 (BOUKHALFA, 2003).

3. Résultats des propriétés physicochimiques des protéases purifiées

Les propriétés physicochimiques (paramètres cinétiques, pH optimum et température optimale) sont déterminées pour les extraits de deux plantes.

3.1. Mesure des paramètres cinétiques des protéases de *Galactites tomentosa*.

La mesure de l'activité de la protéase acide de *G. tomentosa* en fonction des concentrations de caséine comprises entre 0,25% et 2% a permis de tracer la courbe cinétique selon Michaelis (**Figure 8**). Celle-ci montre une forme hyperbolique, la protéase présente donc une cinétique Michaelienne, ce qui indique une structure monomérique de l'enzyme.

La représentation de Lineweaver-Burk (**figure 9**) a permis de calculer les paramètres cinétiques (K_M et V_m) de la protéase. Les valeurs obtenues sont 3,33 g/L pour K_M et 434 U. pour V_{max} . Ces valeurs confirment les résultats obtenus par BENKAHOUL *et al* en 2013 lors de l'étude des protéases de la même plante.

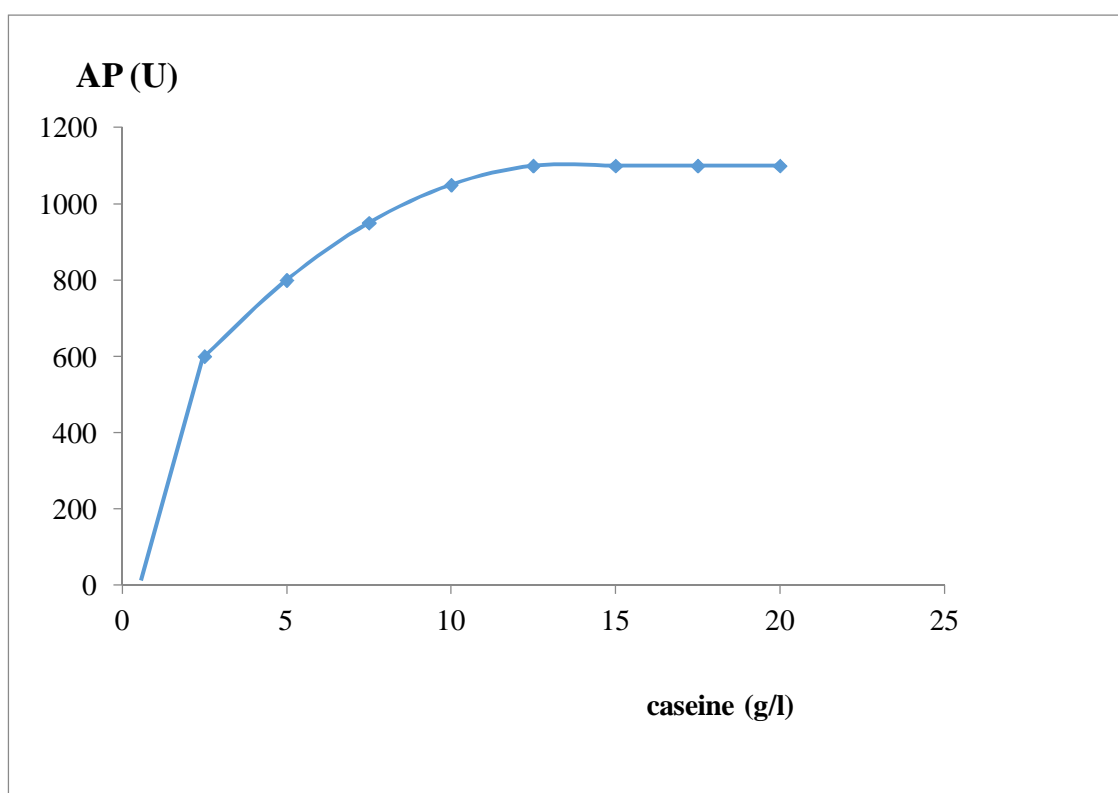


Figure 8 : Effet de la concentration du substrat sur la protéase acide de *Galactites tomentosa*

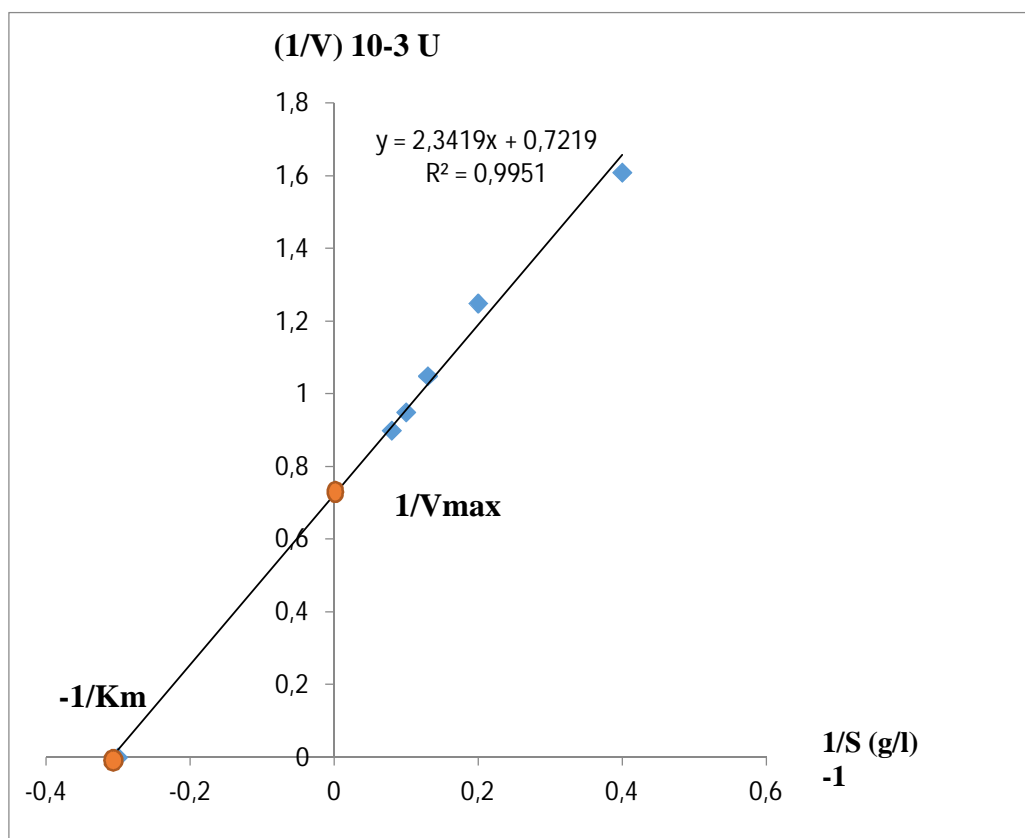


Figure 9: Cinétique de la protéase acide de *G. tomentosa* selon la représentation de Lineweaver-Burk.

3.2. Mesure des paramètres cinétiques des protéases d'*E.ritro*

La mesure de l'activité de la protéase acide de *E.ritro* en fonction des concentrations de caséine comprises entre 0,25% et 2% a permis de tracer la courbe cinétique selon Michaelis (Figure 10). Celle-ci montre une forme hyperbolique, la protéase présente donc une cinétique Michaelienne, ce qui indique une structure monomérique de l'enzyme.

La représentation de Lineweaver-Burk (figure 11) a permis de calculer les paramètres cinétiques (K_M et V_m) de la protéase. Les valeurs obtenues sont 4,25 g/L pour K_M et 352 U. pour V_{max} .

Ces résultats se concordent avec des résultats obtenus par BENCHIHEUB (2015) pour des protéases extraites à partir de *S. hispanicus* plante de la même famille qu'*Echinops ritro*.

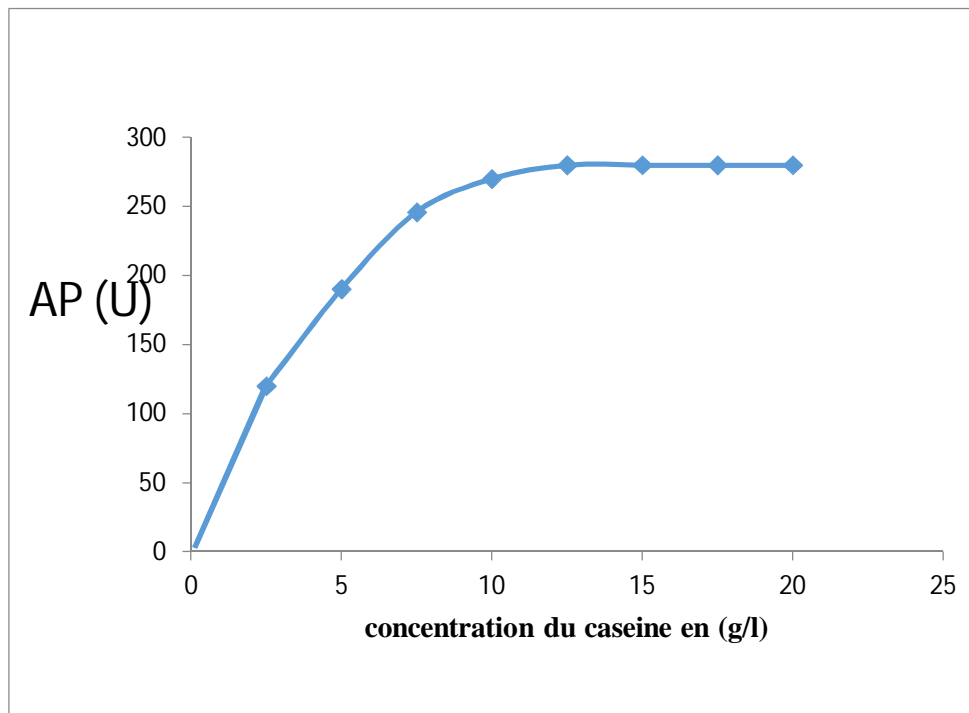


Figure 10: Effet de la concentration du substrat sur la protéase acide d' *Echinops ritro*

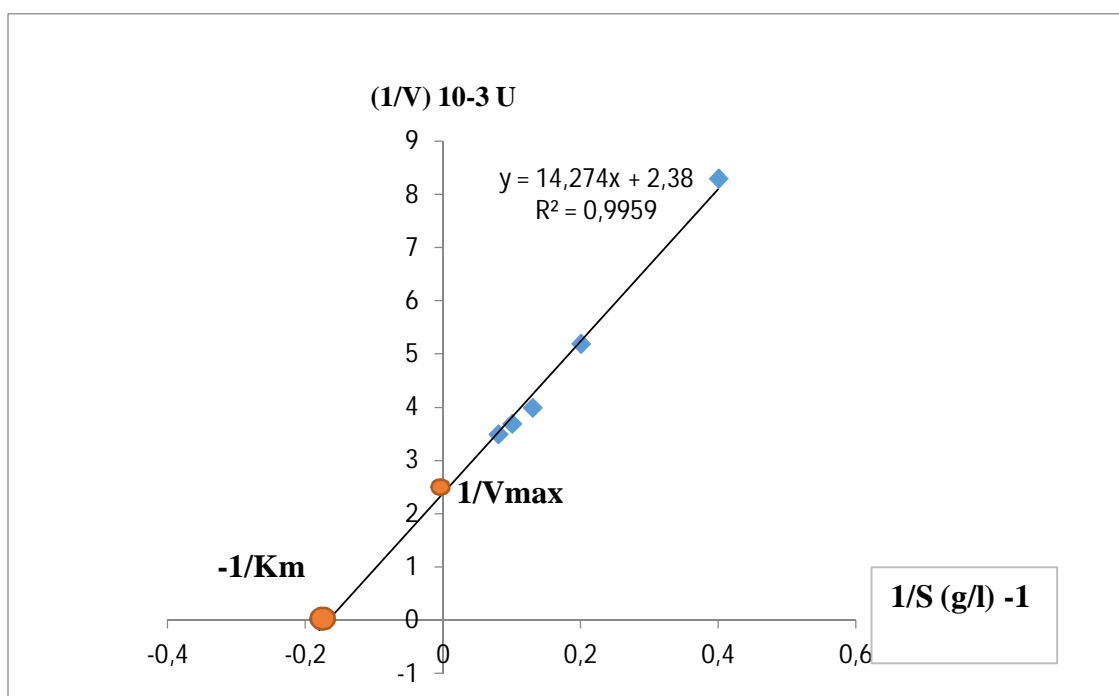


Figure 11: Cinétique de la protéase acide d' *Echinops ritro* selon la représentation de Lineweaver-Burk.

3.3. Effet de la température sur l'activité protéolytique

L'effet de la température sur l'activité de la protéase acide de deux plantes *G. tomentosa* et *E. ritro* a été déterminé par le dosage de l'activité protéolytique à des températures de 20 °C jusqu'à 70°C avec un incrément de 10. Les résultats montrent que les protéases sont actives dans une large gamme de température avec une activité maximale de 43°C aussi bien pour l'enzyme produite par *G. tomentosa* (Figure 12) que pour celle produite par *E. ritro* (Figure 13). Au-delà de cette température, l'activité protéolytique diminue ; ce qui indique une dénaturation de l'enzyme comme rapporté par SCRIBAN (1993).

Ce résultat est proche de celui rapporté par plusieurs auteurs comme par MOREIRA et al (2001) avec une T° optimale 40°C pour *Streptomyces clavuligerus* NRRL 644; et par VAZQUEZ et al (2004) pour les métalloprotéases des souches de *Pseudomonas sp.* qui possèdent des activités maximales à 40°C ; et par LIM et al. (1999) avec un intervalle de température compris entre 45°C- 55° C pour *Mucor racemosus*...etc.

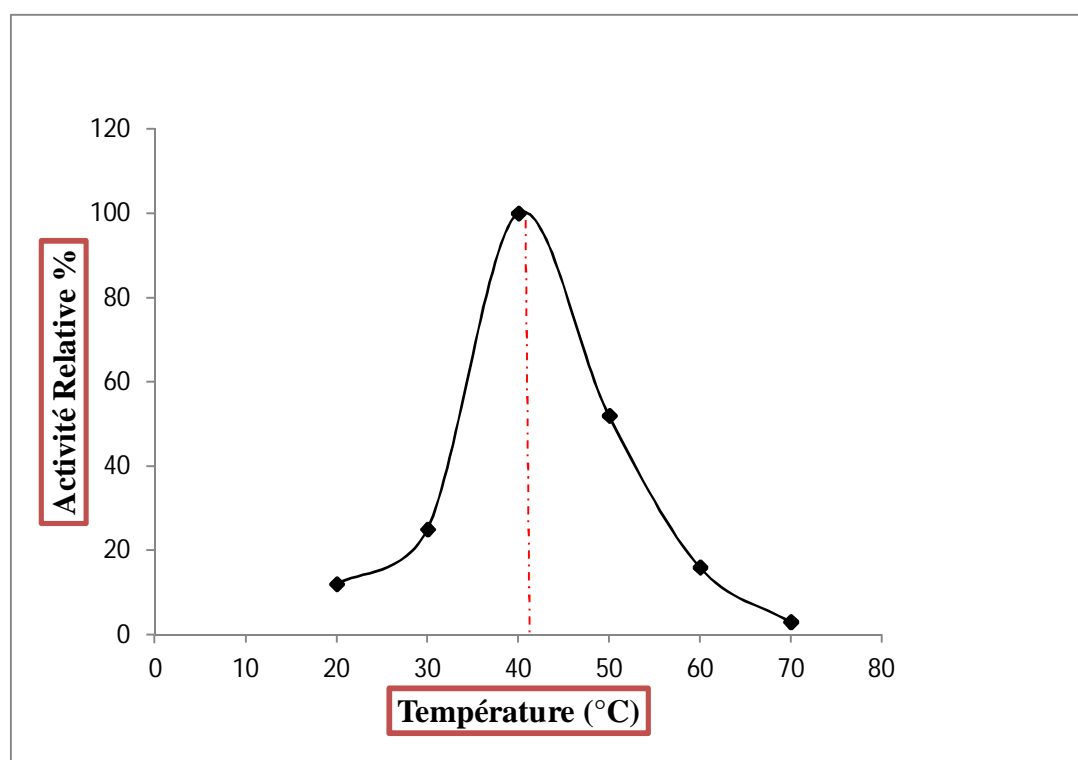


Figure 12: Effet de la température sur l'activité protéolytique relative de la protéase acide extraite à partir des fleurs de *G. tomentosa*.

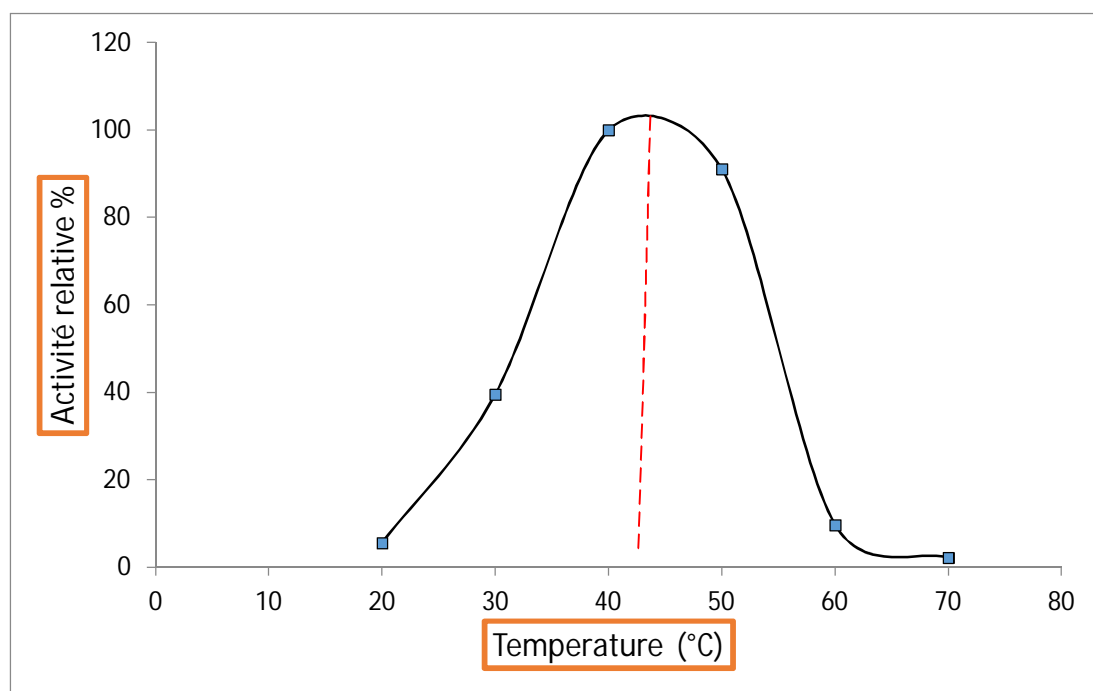


Figure 13: Effet de la température sur l'activité protéolytique relative de la protéase acide extraite à partir des fleurs de *E.ritro*

3.4. Effet du pH sur l'activité protéolytique acide

L'évolution de l'activité protéolytique de la protéase acide partiellement purifiée en fonction du pH est présentée dans la **figure 14** pour *G. tomentosa* et la **figure 15** pour *E. ritro*. D'après ces figures, on note un optimum de l'activité protéolytique à pH 4 comme pour la protéase de *Silybum marianum* (VAIRO CAVALLI et al., 2005) et pour la protéase des fleurs de *Centaurea calcitrapa* (DOMINGOS et al., 1998).

Ce pH est par contre supérieur à celui rapporté par VISHWANATHA et al (2009) pour la protéase d'*A.oryzae* MTCC 5341 (pH 3,2) et inférieur à celui rapporté par BENCHIHEUB et al (2014) pour la protéase extraite des fleurs de *Scolymus maculatus* (pH 5), par LLORENTE et al (2004) pour *Cynara scolymus* (pH 5), et par CHEN et al (2003) pour la protéase de *C. Cardunculus* (pH 6).

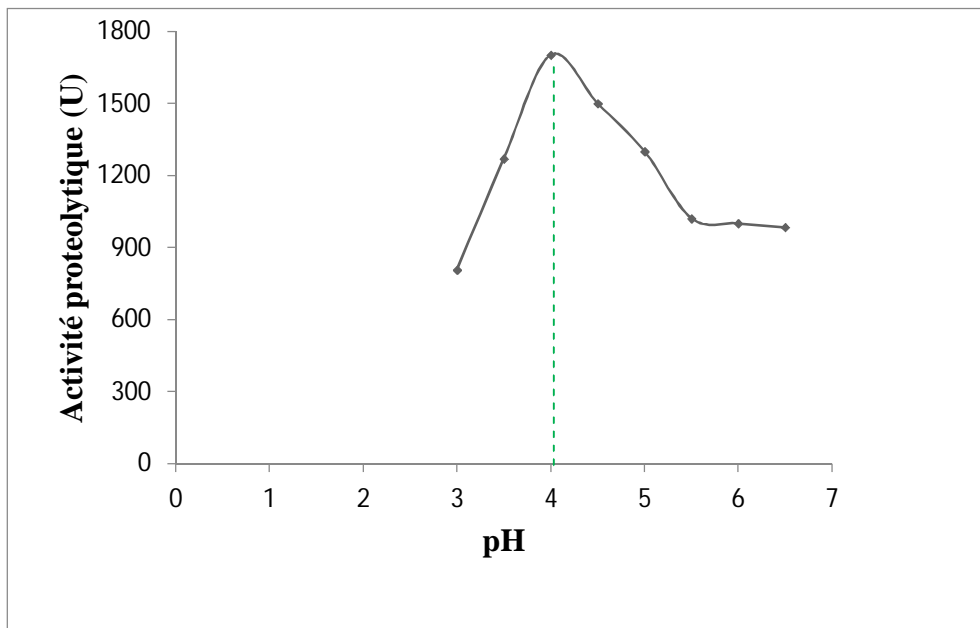


Figure 14: Effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase acide extraite à partir des fleurs de *G. tomentosa*.

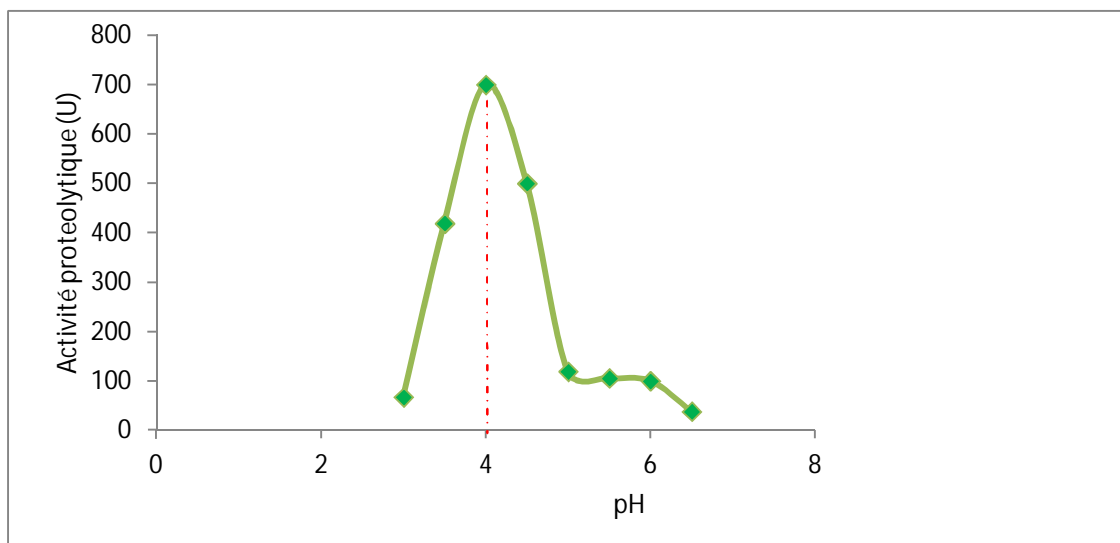


Figure 15: Effet du pH sur l'activité protéolytique de la protéase acide extraite à partir des fleurs d'*E. ritro*

4. Résultats des propriétés technologiques des protéases extraites

4.1. Test de l'activité anticoagulante du sang

La digestion des protéines naturelles (albumine et hémoglobine) permet d'évaluer l'activité pharmaceutique des extraits protéolytiques à pH 6,8.

L'incubation des extraits enzymatiques des fleurs de deux plantes pendant 12 h avec du sang coagulé entraîne un éclaircissement de la couleur du mélange, indiquant une hydrolyse du sang qui s'accroît au cours du temps (**Figures 16 et 17**). Ces protéases réagissent donc comme un anticoagulant comme l'ont montré ABIDI et al (2008) et SEN et al (2011) pour les protéases de *Botrytis cinerea* et *Bacillus psidofirmus* SVB1.

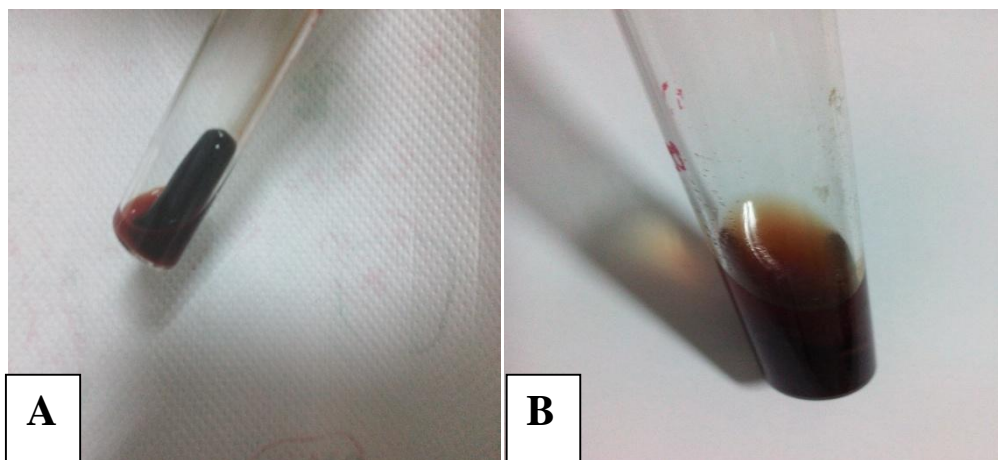


Figure16: Digestion des protéines naturelles par l'extrait enzymatique de *G. tomentosa*.
A : Sang coagulé sans l'extrait enzymatique ; B : Sang coagulé + l'extrait enzymatique

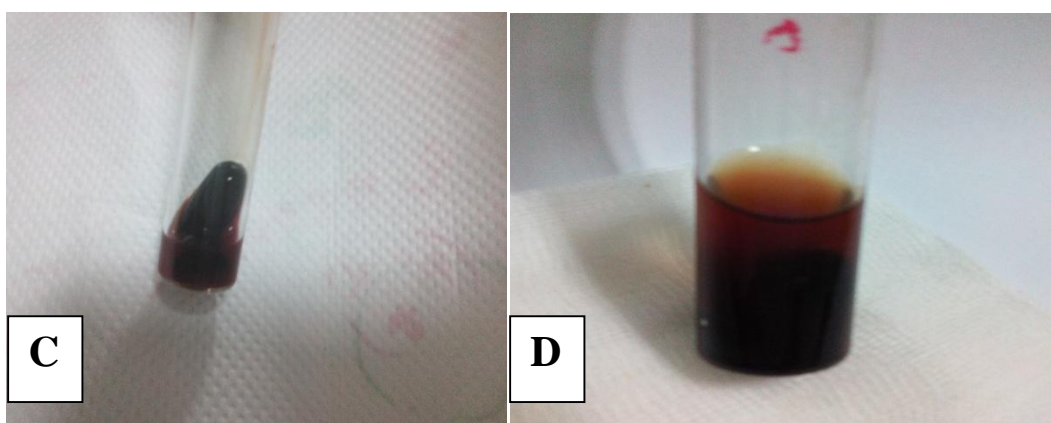


Figure17: Digestion des protéines naturelles par l'extrait enzymatique d'*E. ritro*
C : culot de sang sans extrait enzymatique .D : culot du sang avec extrait enzymatique

4.2. Test de l'activité kératinase

L'action des extraits enzymatiques sur des pièces de peau de brebis et de vache est présentée dans les **figures 18** et **19**, Après 3 h d'incubation à 45°C, on observe une épilation partielle de la peau de vache dans le cas des deux extraits enzymatiques. Pour la peau de brebis; on observe peu d'épilation, mais après 12 h d'incubation une épilation totale est obtenue. Ces activités indiquent que ces enzymes possèdent une activité kératinasique. Cette activité est obtenue avec les protéases alcalines.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par RAO et al (1998) et par GUPTA et al (2002) pour des protéases produites par *B. licheniformis*, *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens*.

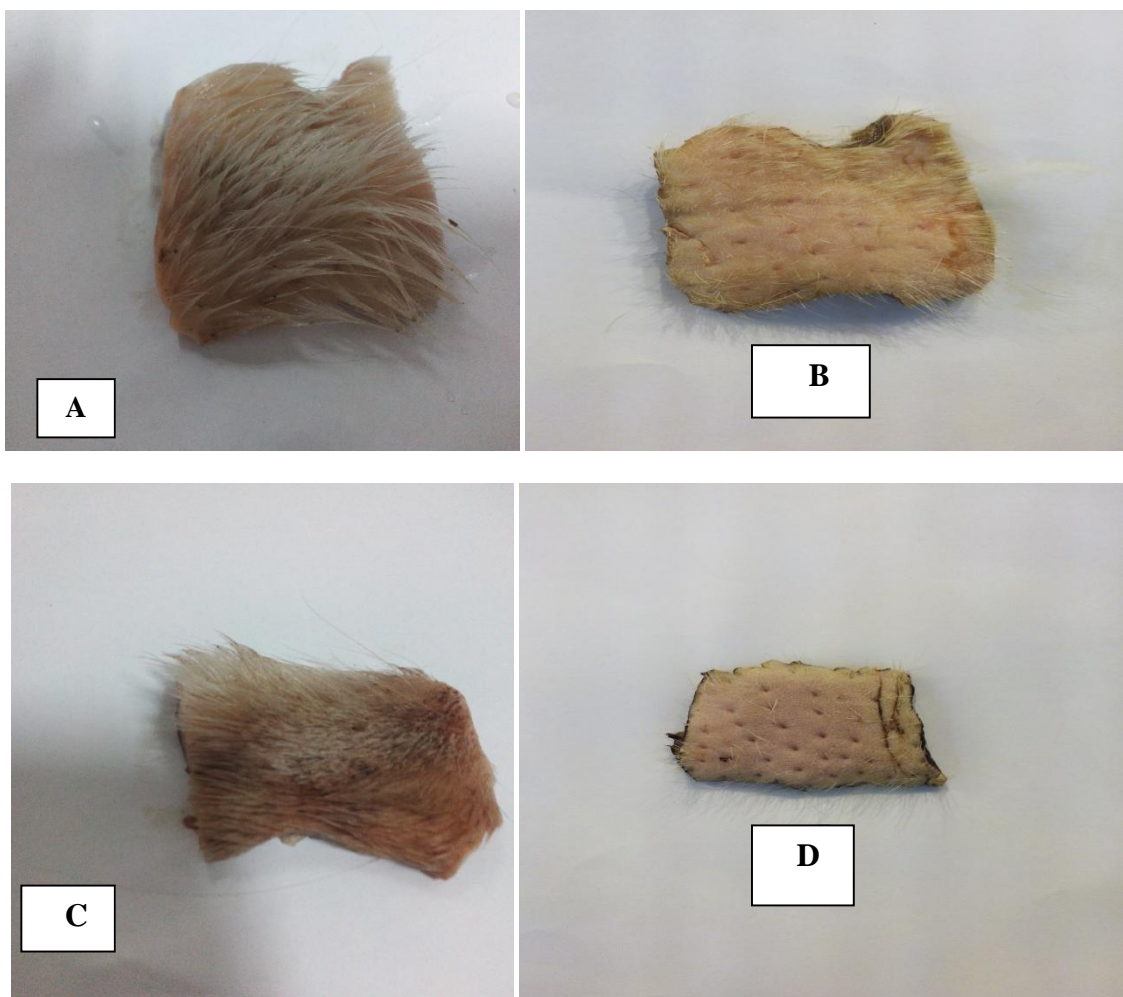


Figure 18 : Test de l'activité kératinase de deux extraits sur la peau de vache

- A : la peau de vache avant le traitement par l'extrait enzymatique de fleurs de *G.tomentosa*
- B : peau de vache après le traitement par l'extrait enzymatique de *G.tomentosa*
- C : peau de vache avant le traitement par l'extrait enzymatique d'*E.ritro*
- D : peau de vache après le traitement par l'extrait enzymatique d'*E.ritro*



Figure 19 : Test de l'activité kératinase de deux extraits sur la peau de brebis
A : la peau de brebis avant le traitement par l'extrait enzymatique de fleurs de *G.tomentosa*
B : peau de brebis après le traitement par l'extrait enzymatique de *G.tomentosa*
C : peau de brebis avant le traitement par l'extrait enzymatique d'*E.ritro*
D : peau de brebis après le traitement par l'extrait enzymatique d'*E.ritro*

L'étude des propriétés technologiques des deux protéases a par ailleurs, montré de bonnes activités anticoagulante et kératinase. Ce qui montre leur efficacité par rapport à l'hydrolyse de molécules protéiques naturelles et leur intérêt dans des applications diverses.

5. Comparaison entre les propriétés des protéases extraites de *G. tomentosa* Moench et d'*E. ritro* L.

La comparaison des propriétés physicochimiques (les différentes formes des protéases, le pH optimum et la température optimale), cinétiques (constante michaelienne K_m et vitesse maximale V_m) et technologiques est présentée dans le **tableau 7**

Tableau 7: comparaison entre les propriétés des protéases de *G. tomentosa* Moench et d'*E.ritro*.

Propriétés	<i>G. tomentosa</i>	<i>E.ritro</i>
Rendements en activité		
Activité totale de l'extrait brut	6500 U	4538 U
AT après précipitation par AS 40%	1750 U	1153 U
Nombre de formes dans l'extrait brut selon le pH	2	2
pH des formes obtenues	Protéase acide (pH 4) Protéase alcaline (pH 8,3)	Protéase acide (pH 3) Protéase neutre (pH 7,5)
pH optimum de la protéase acide parfaitement purifiée	pH 4	pH 4
T optimale de la protéase acide parfaitement purifiée	43°C	43°C
Propriétés cinétiques		
- Type de cinétique	cinétique Michaelienne	cinétique Michaelienne
- K_m	3,33 g/L	4.25g/L
- V_m	434 U.	352 U.
Propriétés technologiques des EB3		
Activité anticoagulante	+	+
Activité kératinase	+	+

D'après les résultats résumés dans le tableau, obtenus, on constate une très grande similarité des propriétés des protéases contenues dans les fleurs des plantes *G. tomentosa* Moench et *E. ritro* L. aussi bien pour les propriétés physico-chimiques et cinétiques que pour les propriétés technologiques malgré leur différence phénotypique. Les deux plantes constituent une bonne source de protéases susceptibles d'avoir des applications industrielles ou pharmaceutiques.

Conclusion
Et
Perspectives

Conclusion et perspectives

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des enzymes multifonctionnelles qui assurent plusieurs fonctions biologiques chez les organismes vivants. Elles occupent une place particulière dans le marché mondial des enzymes où elles ont une importance commerciale particulière dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et technologiques et beaucoup d'autres applications variées.

Les protéases végétales suscitent une attention particulière en raison de leur spécificité distincte et leur large activité dans différentes gammes de pH et de températures.

L'objectif de ce travail est la caractérisation et l'étude des propriétés technologiques des protéases extraites de plantes endémiques, envahissantes des surfaces incultes, donc disponibles à moindre coût. Ce travail permet également la valorisation des espèces végétales locales partir des fleurs de deux plantes. Dans ce cas *Galactites tomentosa Moench* et *Echinops ritro L.*

L'extraction a montré la richesse de ces deux plantes en activités protéolytiques indiquant un intérêt possible dans diverses applications. Les dosages des activités protéolytiques montrent la présence de deux types activités, l'une acide et l'autre alcaline, pour les deux plantes ; les pics d'activités correspondent à pH 3 et 4 et à pH 7,5 et 8,3 pour *G. tomentosa* et *E. ritro* successivement.

L'étude cinétique a montrée une cinétique Michaelienne et une structure monomérique de protéases acides de deux plantes. Elle a permis aussi de calculer les constantes michaeliennes (K_M) et les vitesses maximales (V_m) des deux plantes *G. tomentosa* et d'*E. ritro*. ainsi que le pH optimal et la température optimale. Les deux plantes possèdent des propriétés très proches malgré les différences morphologiques et leur place dans la classification.

L'étude des propriétés technologiques des deux protéases a par ailleurs, montré de bonnes activités anticoagulante et kératinase. Ce qui montre leur efficacité par rapport à l'hydrolyse de molécules protéiques naturelles et leur intérêt dans des applications diverses.

En perspectives, ce travail doit être développé afin de mieux connaître les propriétés physicochimiques, le mode d'action et les applications dans d'autres domaines et secteurs technologiques de ces protéases.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

- Abdellaoui, R. (2007). Obtention et caractérisation d'une enzyme coagulant le lait d'*Aspergillus Niger* Isole du Sol de la Région de Boumerdes. Université M'hamed BOUGARA de BOUMERDES. (p:36).
- Abidi, F., Limam, F., & Nejib, M. M. (2008). Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, 43(11), 1202–1208.
- Aguilar C.N., Gutiérrez-Sánchez G., Rado-Barragán P.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernandez J.L., Contreras-Esquivel J.C., 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal. Biochem. Biotechnol.*, 4(4); 354-366
- Alais, C. (1975). *Sciences du lait. Principes et techniques laitières* (Masson). Paris.
- Alves, T., Rocha, I., Maria, G., Aoyama, H., Garrard, I., & Tambourgi, E. B. (2014). Extraction and Preliminary Characterization of Bromelain from Curaua (*Ananas erectifolius* L . B . SMITH) Purple and White. *Chemical Engineering Transactions*, 37, 769–774.
- Anson M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, 22; 79–89.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J., & Eijsink, V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40(5), 1957–1966.
- Auberger B., Lenoir J. & Bergere J. L. (1995). Caractérisation de l'activité carboxypeptidasique de *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. 15 : 273-28
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., B. F. (1982). Les enzymes : *Production et utilisation industrielles*. Bordas, Paris.
- Azarkan, M., Matagne, A., Wattiez, R., Bolle, L., Vandenameele, J., & Baeyens-Volant, D. (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry*, 72(14-15), 1718–1731.
- Babu, B. R., Rastogi, N. K., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 47(1), 83–89.
- Battaglino, R. A., Huergo, M., Pilosof, A. M. R., & Bartholomai, G. B. (1991). Culture Requirements for the Production of Protease by *Aspergillus-Oryzae* in Solid-State Fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(3), 292–296.
- Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P. (2009). *Food Chemistry* . Berlin: Springer, 94-99.

Benchiheub, M. (2015). Etude des protéases de quelques plantes endémiques . Purification , propriétés , mécanisme d ' action et applications technologiques . Thèse de doctorat 3ème cycle .Université Constantine 1

Benkahoul M., 2002. Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur déchets d'oranges. Optimisation du milieu de cultures, purification partielle et étude des propriétés physico-chimiques de l'enzyme. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine

Benlounissi, A. (2012). Isolement de moisissures productrices de protéases coagulantes. Production et purification des enzymes et étude de leur effet sur la coagulation. Thèse de Doctorat en science. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine

Beuth, J. (2008). Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction *Integ Cancer Ther*, 7(4), 311–316.

Boiron, P. (1996). *Organisation et biologie des champignons*. Paris.

Boukhalfa ,H.(2003). Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Faculté des sciences. Université Mentouri Constantine.

Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Natalucci, C. L. (2012). Onopordum acanthium L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 172–179.

BRISSET, J. (2005). analytique en solution principes et applications (Lavoisier). Paris.

Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Natalucci, C. L. (2012). Onopordum acanthium L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 172–179.

BURGOT, G. j. (2011). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. 3ème Ed. Paris.

CEZARD, F. (2009). Biotechnologies en 26 fiches (pp. - 118– 120– 131). Dunod. Paris.

Chaiwut, P., Pintathong, P., & Rawdkuen, S. (2010). Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from *papaya peels*. *Process Biochemistry*, 45(7), 1172–1175.

Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17(12), 1393–1400.

Chen, S., Zhao, J., Agboola, S. (2003). Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon *Cynara cardunculus* L. *Journal of Agriculture And. Food Chemistry*, (51), 3127–3134.

- Cherry, J. R., & Fidantsef, A. L. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: An update. *Current Opinion in Biotechnology*.
- Dalev, P. G. (1994). Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresource Technology*, 48(3), 265–26
- Devaraj, K. B., Gowda, L. R., & Prakash, V. (2008). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.). *Phytochemistry*, 69(3), 647–55.
- Domingos A., Cardoso P., Xue Z-T., Clemente A., Brodelius P. and Pais MS. 2000. Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267:6824–31.
- EL-SAYED S. T., ELMAZAR M, M., ALAZZOUNY R, A. (2013). Purification and Characterization of a Novel Milk-Clotting Enzyme from *Brassica napus* Seeds. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7, 482–493.
- Esteves C, Lucey J.A, Hyslop D B, Pires emv. (2003). Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosin. *Int Dairy J* 13:877 – 885.
- Fibriana, F., Fibriana, F., & Upaichit, A. (2015). Proteases from Latex of *Euphorbia* spp. and Its Application on Milk Clot Formation. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 7(2).
- Gupta, R., Beg, Q., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Haddar, A., Hmidet, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Fakhfakh-Zouari, N., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M. (2011). Alkaline proteases produced by *Bacillus licheniformis* RP1 grown on shrimp wastes: Application in chitin extraction, chicken feather-degradation and as a dehairing agent. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(4), 669–678.
- HAINQUE, B. (2008). Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Gorenjski Tisk. Paris.
- Ichida J M., Krizov A L., Lefebvre CA., Keener HM., EL well D L. and Burt JR E.H. 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 199-208
- Illanes, A. (2008). *Enzyme production*. In *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications* (pp. 57–106).
- Kalpana Devi , M., Rasheedhabanu A., Gnanaprabhal G.R., Pradeep B.V. & Palaniswamy, M. (2008). Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Sciences and Technology*, 7(1-7).

- Katsaros, G. I., Tavantzis, G., & Taoukis, P. S. (2010). Production of novel dairy products using actinidin and high pressure as enzyme activity regulator. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 47–51.
- Kumar G, A. Nagesh, N. Prabhakart T,G. Sekran , G. (2008). Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing protein aceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, 99: 2364-2372
- Kumar, A . Garg, N. (2006). Enzymology: enzyme purification. Devi Ahilya University Khandwa. . Campus Indore-452017 ,12-Jan-2006 (Revised 09-Jul-2006)
- Kumar, S., Sharma, N. S., Saharan, M. R., & Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40(5), 1701–1705.
- La Valle J, Krinsky D, H. E. (2000). Natural therapeutics pocket guide (Hudson). Ohio
- LAURENT, J. (1982). *Les enzymes production et utilisations industrielles*. Gauthier-Villars. France.
- Leisola, M., Jokela, J., Pastinen, O., Turunen, O., & Schoemaker, H. E. (2009). Industrial use of enzymes. *Physiology and Maintenance, II*, 161–184.
- Lim S.I., Yoo J.Y. (1999). Purification of fungal protease produced by *Mucor racemosus* f. *racemosus* PDA 103 from Korean traditional meju. *Korean Journal. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 446-451.
- Llorente, B. E., Brutti, C. B., & Caffini, N. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8182–8189.
- Longo, D. (2008). “Galactites tomentosus Moench - Scarlina”. *Acta Plantarum* (in Italian) Retrieved 11 February 2015.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal . Biol. Chem.*, 193(1); 265–275.
- Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Veríssimo, P., Vairo-Cavalli, S., Faro, C. (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry*, 81, 7–18.
- Mechakra A., Auberger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999). Optimisation d’un milieu de culture pour la production d’enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*. 19 (6) : 663-675.
- Mikkelsen, S. R., & Corton, E. (2004). *Bioanalytical chemistry. Bioanalytical chemistry*.
- Molimard, P., Vassal, L., Bouvier, I., & Spinnler, H. E. (1995). Suivi de croissance de *Penicillium camemberti* et *Geotrichum candidum* en culture pure et en association au cours de l’affinage de fromages expérimentaux pâte molle de type camembert. *Le Lait*, 75(1), 3–16.

- Moodie P.(2001).Traditional baking enzymes-proteases. Enzyme Development Corporation, 212: 736-1580.
- Moreira K. A. Cavalcanti M. T. Simoes Duarte H. Tambourgi E. B. Magalhaes E.H. Silva V. L. Figueiredo-Porto A.L. & Lima-Filho J. L. (2001). Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. *Brazilian Journal of Microbiology* vol.32 no.3 São Paulo.
- Mótyán, J. A., Tóth, F., & Tózsér, J. (2013). Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules*, 3, 923–942.
- MUELLER M. S. & MECHLER E. (2005). *plants in tropical countries. Traditional use—Experience-facts* (Thieme). Stuttgart.
- NITIN., et al. (2007). *biochemistry. S.Chand et Company LTD*. Ramnagar, New delhi.
- Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S. (2009). Characterization of the purified extracts from artichke flowers (*Cynara scolymus*) and from fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food Technology*, 7(1), 20– 29.
- Pardo, M. F., López, L. M. I., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3795–3800.
- Patomo Dominique Arama. (2015). Conception et synthèse de nouveaux inhibiteurs de la kallicreine 7. Thèse de doctorat 3ème cycle, université de Montpellier.france.
- Priest F ,G. Stewart G, G. (2006). *Handbook of Brewing (2nd ed.)*. New York.
- Puente, X. S., Sánchez, L. M., Gutiérrez-Fernández, A., Velasco, G., & López-Otín, C. (2005). A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 2), 331–334.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 597–635.
- Rookard, L. E., Edmondson, O., & Greenwell, P. (2009). ABO reverse grouping: Effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. *British Journal of Biomedical Science*, 66(2), 93–97.
- Salas, C. E., Gomes, M. T. R., Hernandez, M., & Lopes, M. T. P. (2008). Plant cysteine proteinases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*.
- Sandro, P. (1982). Flora d'Italia (in Italian). In 3 (p. 164).
- Sanman, L. E., & Bogyo, M. (2014). Activity-Based Profiling of Proteases. *Annual Review of Biochemistry*, 83(1), 249–273

- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: The regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183–197.
- Scriban R. (1993). *Biotechnologie*. 4e édition. Tech. et Doc (pp. 39;42,351–356). Lavoisier. Paris
- Sekine H. (1972). Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae*. Some enzymatic properties. In *Agric. Biol. Chem* (pp. 207–216).
- 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.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., & Neptuno Rodríguez-López, J. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*.
- Singh, A., Ghosh, V. K., & Ghosh, P. (1994). Production of Thermostable Acid Protease by *Aspergillus Niger*. *Letters in Applied Microbiology*, 18(3), 177–180.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., & Yongsawatdigul, J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochemistry*, 43(2), 185–192.
- Sullivan, G. A., & Calkins, C. R. (2011). Ranking beef muscles for Warner-Bratzler shear force and trained sensory panel ratings from published literature. *Journal of Food Quality*, 34(3), 195–203.
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. *Food Technology and Biotechnology*.
- Tanabe, S., Arai, S., & Watanabe, M. (1996). Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(8), 1269–72.
- Timotijevic, G. S., Radovic, S. R., & Maksimovic, V. R. (2003). Characterization of an aspartic proteinase activity in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2100–2104.
- Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications* (Willey & S). New York.
- Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *The Journal of Dairy Research*, 72(3), 271–275.
- Vazquez, S. C., Coria, S. H., & Mac Cormack, W. P. (2004). Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains. *Microbiological Research*, 159(2), 157–166.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402–407.

Walsh, G. (2002). Biochemistry and Biotechnology. In J. W. and Sons (Ed.) (West Sussex, p. 420). England.

Yoshida-Yamamoto, S., Nishimura, S., Okuno, T., Rakuman, M., & Takii, Y. (2010). Efficient DNA extraction from nail clippings using the protease solution from *Cucumis melo*. *Molecular Biotechnology*, 46(1), 41–48.

Sites

<http://merops.sanger.ac.uk/about/classification.shtml>

<http://www.tela-botanica.org/bdtfx>

Annexes

ANNEXE 1

1. Protocole de dosage de l'activité enzymatique

Solution nécessaires

- Solution de caséine 2.5% dissoute dans citrate de sodium 0.02M.
- Tampon phosphate/citrate 0.05 M pH 5.5.
- Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.
- Solution de Na₂ CO₃ 2% (w/v) dans du NaOH 0.1N.
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 1/2.

Le dosage de l'activité protéolytique est réalisé en deux étapes :

- La 1ère étape étant la réaction enzymatique ; dont le mélange réactionnel est constitué de :
 - ✓ 1ml de l'extrait brut.
 - ✓ 1.5ml du tampon phosphate/citrate 0.05M, pH 5.5.
 - ✓ 2.5ml de la solution de la caséine à 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.

Après incubation 1 h au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA (4%). Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938).

- La 2ème étape : Dosage colorimétrique de l'activité enzymatique

Le dosage colorimétrique est réalisé par mélange de :

- ✓ 0,5 ml de Filtrat
- ✓ 2,5 ml Na₂CO₃.

Le mélange est agité et laissé stabiliser à température ambiante pendant 10 min. les composés azotés non protéiques sont dosés par ajout de 0,25 ml du folin à 50%. (SUMANTHA et *al.*, 2006; PARANTHAMAN et *al.*, 2009).

Après l'incubation à température ambiante pendant 30 min la lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm au spectrophotomètre.

2. La courbe d'étalonnage de la tyrosine

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de la tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100µg/ml selon le tableau suivant :

Dilution	0	1/5	2/5	3/5	4/5	1
Concentration en tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (µl)	0	100	200	300	400	500
Eau distillée (µl)	500	400	300	200	100	0
Na ₂ CO ₃ (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Le mélange est agité et laissé stabiliser pendant 10 min

Folin dilué à ½ (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

La solution est mélangée énergiquement et laissée à l'ombre pendant 30 min. L'absorbance lue à 750nm permet de tracer la courbe (figure 04).

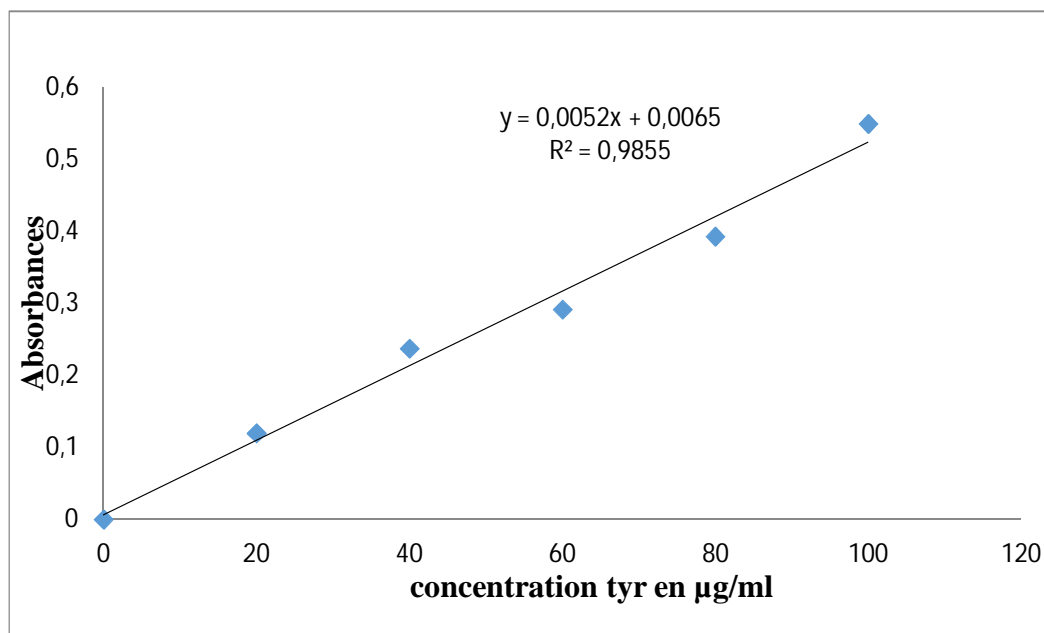


Figure 04 : Courbe d'étalonnage de la Tyrosine.

ANNEXE 2

1. Protocole de dosage des protéines**🚦 Solutions nécessaires**

- Solution A : Na₂CO₃ à 2% dans du NaOH (0,1N).
- Solution B : CuSO₄, 5H₂O à 1% dans l'eau distillée.
- Solution C : Tartrate double de sodium et de potassium à 2% dans de l'eau distillée.
- Solution M : 100 ml de solution A + 1 ml solution B + 1 ml solution C.
- Réactif de folin-Ciocalteu dilué au ½ dans de l'eau distillée.

🚦 Mode opératoire

La réaction enzymatique est préparée par le mélange de :

- ✓ 1 ml d'extrait enzymatique
- ✓ 5 ml de la solution M.

Après agitation et incubation à température ambiante pendant 10 min, 0,5ml de Folin-Ciocalteu dilué à ½ est ajouté.

La solution est agitée de nouveau puis incubée pendant 30 min à l'ombre à température ambiante. La lecture de l'absorbance a lieu à 750 nm au spectrophotomètre.

2. La courbe d'étalonnage de la BSA

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de la tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100µg/ml selon le tableau suivant :

Dilution	0	1/10	2/10	3/10	4/10	½
Concentration en BSA (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de BSA (µl)	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée (µl)	1000	800	600	400	200	0
Solution M (ml)	5	5	5	5	5	5

Le mélange est agité et laissé stabiliser pendant 10 min.

Folin dilué à ½ (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
----------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

La solution est mélangée énergiquement et laissée à l'ombre pendant 30 min, l'absorbance est lue à 750nm permet de tracer la courbe (figure 05)

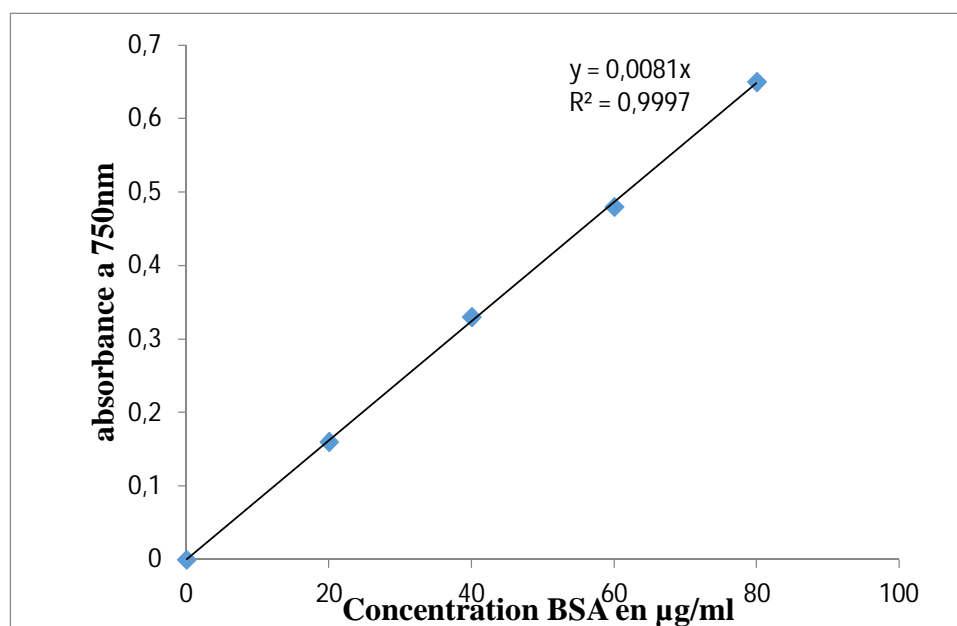


Figure 05 : Courbe d'étalonnage de la BSA (0,1 mg/ml).

Résumés

ABSTRACT

The purpose of this work was the extraction, the partial purification and the study of characteristics of proteases extracted from flowers of two local plants: *Echinops ritro* L. and *Galactites tomentosa* Moench.

The total protease activity of both crude extracts indicate the wealth of the two plants with proteases with 6500 U for *G. tomentosa* and 4500 U for *E. ritro*.

The profiles of proteolytic activities extracted from plants in the NaCl depending on pH showed the existence of two main forms. *G. tomentosa* has a maximum activity at pH 4 and pH 8.3 and *E. ritro* has a maximum activity at pH 3, and the other at pH 7.5.

The study of acid proteases present in the extract prepared in citrate-phosphate buffer allowed the obtaining of an optimal pH of 4 for both plants with an optimum temperature of 43 ° C.

The kinetic study gave Michaelis form for both proteases. The Lineweaver-Burk gave a K_M 3.33g / L and a V_m of 434 U for acid proteases of *G. tomentosa*; with a K_M of 4.25g / L and a V_m of 325 U for acid protease of *E. ritro*.

Proteases tests showed a good anticoagulant activity, and a very effective keratinase activity.

Key words: protéases, *Galactites tomentosa*, *Echinops ritro*, characterization, properties.

ملخص

ان الغرض من هذا العمل يتمثل في الاستخلاص والتنقية الجزئية ودراسة خصائص إنزيمات البروتياز المستخرجة من زهرتين محليتين هما القنفذي أزرق *Echinops ritro* . و *Galactites tomentosa* النشاط البروتيني الكلي للبروتياز المتواجدة في المستخلص الخام تشير إلى ثراء و غنى هاتين النباتين بالبروتياز بنسبة 6500 وحدة لدى *Galactites tomentosa* مقابل 4500 وحدة لدى *E.ritro*. وتشير نتائج قياسات النشاط للبروتياز المستخلصة في محلول كلوريد الصوديوم بدلالة درجة الحموضة وجود شكلين رئيسيين. فيما يخص *G.tomentosa* لديها أقصى نشاط في كل من درجة الحموضة pH 4 ودرجة الحموضة pH 8,3 اما بالنسبة للقنفذي أزرق *E.ritro* فلديها أقصى نشاط في درجة الحموضة pH 3، والآخر في درجة الحموضة pH 7.5 كما سمحت دراسة البروتياز الحمضية المتواجدة في مستخلصات أعدت في المحلول المنظم سيترات-فوسفات في الحصول على درجة الحموضة المثلى pH 4 مع درجة الحرارة المثلى 43 درجة مئوية. أعطت دراسة المعايير الحركية شكل ميخائيلي Michaelis لكنا البروتياز المستخلصة من النباتين. فيما أعطى تمثيل Lineweaver-Burk النتائج التالية: 3.33 غ/ل $V_m = 434$ U , و $K_M =$ لدى *G.tomentosa* مع 4.25 غ/ل $K_M =$ بالنسبة ل *E.ritro* $V_m = 325$ U

من ناحية أخرى ، تمتلك هذه البروتياز القدرة على العمل كمانع للتخثر . كذلك النشاط كيراتيناز . التي يمكن استخدامها صيدلانيا الأنزيمية أو في مجال الدباغة الصناعي.

الكلمات المفتاحية

البروتياز , *Galactites tomentosa*, *Echinops ritro*, الخصائص.

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : NAHOUI AHMED
O.CHEIKH O. SAID MOHMED

Comparaison entre les propriétés des protéases extraites de fleurs de *Galactites tomentosa* Moench et d'*Echinops ritro* L.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie
Option Analyse Protéomique et Santé

Résumé : Ce travail a pour but l'extraction, la caractérisation et la comparaison des propriétés des protéases extraites à partir des fleurs de deux plantes locales : *Galactites tomentosa* Moench et *Echinops ritro* L. L'activité totale des protéases de l'extrait brut des deux plantes indiquent leur richesse en protéases avec des valeurs de 6500 U pour *G. tomentosa* et de 4500 U pour *E. ritro*. Les profils des activités protéolytiques des extraits des deux plantes dans le NaCl en fonction du pH ont montré l'existence de deux formes majeures. *G. tomentosa* possède une activité maximale à pH 4 et une autre à pH 8,3. *E. ritro* possède une activité maximale à pH 3 et l'autre à pH 7,5. L'étude des protéases acides présentes dans l'extrait préparé dans du tampon citrate-phosphate a permis d'obtenir un pH optimal de 4 pour les deux plantes avec une température optimale de 43 °C. L'étude cinétique a donné une forme Michaelienne et une structure monomérique pour les deux protéases. La représentation de Lineweaver-Burk a donné une K_M de 3.33g/L et une V_m de 434 U pour la protéase acide des fleurs de *G. tomentosa* ; une K_M de 4.25g/L et une V_m de 325 U pour la protéase acide extraite à partir des fleurs de *E. ritro*. Les tests des deux protéases ont montrés une bonne activité anticoagulante, et une activité kératinase très efficace.

Mots clés : protéases, *Galactites tomentosa*, *Echinops ritro*, propriétés, caractérisation.

Laboratoire de recherche : Biologie et Environnement (Constantine, Algérie)
Laboratoire pédagogique d'Enzymologie du département de Biochimie et de Biologie moléculaire et cellulaire

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Mme BENKAHOUL M.	M.C.B.- UFM Constantine
Rapporteur :	Mme MECHAKRA-MAZA A.	Professeur - UFM Constantine
Examineur :	Mme BENHAMDI A.	M.C.B- UFM Constantine

Date de soutenance : 28/06/2016