

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie- Biologie Moléculaire et Cellulaire**



N° d'Ordre :

N° de Série :

**Thèse**

Préparée pour l'obtention du **Diplôme de Doctorat 3ème cycle LMD**

**En Biotechnologie, Biologie et Environnement**

**Option : Biotechnologie et Biochimie**

**Par**

**BENCHIHEUB Meriem**

**Etude des protéases de quelques plantes endémiques.  
Purification, propriétés, mécanisme d'action et  
applications technologiques.**

**Soutenue : Le 19/01/2015**

**Devant le Jury**

Président : Mr. KHELIFI D.

Professeur, Université Constantine 1

Directrice de thèse : Mme. MECHAKRA A.

Professeur, Université Constantine 1

Examineurs : Mr. JAOUANI A.

M.C.A., Université El Manar Tunis

Mr. ZIDOUNE M.N.

Professeur, Université Constantine 1

Mr. NOUANI. A

M.C.A., Université Boumerdès

**Année Universitaire 2014-2015**

## **Remerciement**

Au terme de ce travail, je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à Madame MECHAKRA-MAZA Aicha, ma directrice de thèse, pour m'avoir donné l'occasion d'intégrer l'équipe du Laboratoire de Biologie et environnement ; Université Constantine 1 qu'elle dirige, en me proposant ce thème et en assurant son encadrement. Je lui serai reconnaissante pour ses orientations, sa patience, sa confiance et ses conseils, tout au long de ce parcours scientifique.

J'exprime mes respectueux dévouements à Mr. KHELILFI Douadi, professeur à l'université Constantine 1, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider la commission d'examen de cette thèse et de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

J'exprime également mes remerciements et toute ma reconnaissance au professeur Abdellatif BOUDABOUS directeur du laboratoire de Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA), Faculté des Sciences de Tunis, Université Tunis El Manar pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je le remercie pour tout ce qu'il nous a offert.

Que Monsieur JAOUANI Atef, maitre de conférences à l'université Université El Manar Tunis trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté de participer au jugement de cette thèse. Je lui serai aussi très reconnaissante pour ses orientations, sa confiance et ses conseils, durant mon stage.

Je voudrais exprimer également mes sincères remerciements à Mr.ZIDOUNE M.N. Professeur à l'INATAA, université Constantine 1, qui me fait l'honneur d'accepter d'examiner mon travail.

C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment Mr. NOUANI A. Maitre de conférences à l'université Boumerdès, d'avoir accepté de juger ce modeste travail, qu'il trouve ici ma très profonde gratitude.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'encontre de toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Ainsi qu'à toute l'équipe du LMBA, Tunis.

## **Dédicaces**

Cette thèse est dédiée à :

Je dédie ce travail à mes chers parents, 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 ;

- Mon cher époux ;
- Mes frères, sœurs, nièce et neveu;
- Tous mes amies.

## Abréviations utilisées

**AP:** aspartylprotéase

**AS :** ammonium sulfate

**BSA:** Bovine Serum Albumin.

**CN:** caséine

**CP:** cystéylprotéase

**Da:** Dalton.

**E.C. :** Enzyme Commission

**EDTA:** Ethylene Diamine Tetra Acetate.

**MCA : Milk Clotting** Activityt

**MM :** masse molaire

**P :** protéase.

**rpm:** round per minute.

**RP:** reversed-phase

**SDS:** Sodium Dodecyl Sulfate

**SP:** sérylprotéase

**TCA:** TriChloroacetic Acid.

**U:**  $\mu\text{g.h}^{-1}.\text{ml}^{-1}$

**UHT :** Ultra Haute Température

**UP:** Unité Présure

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	4
<b>Figure 2 :</b>	<i>Scolymus hispanicus</i> .....	14
<b>Figure 3 :</b>	<i>Scolymus maculatus</i> .....	15
<b>Figure 4 :</b>	Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine.....	16
<b>Figure 5 :</b>	Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine.....	17
<b>Figure 6 :</b>	Mécanisme réactionnel des métalloprotéases.....	18
<b>Figure 7 :</b>	Mécanisme réactionnel des protéases acides.....	19
<b>Figure 8 :</b>	Distribution des ventes des enzymes.....	20
<b>Figure 9 :</b>	Profil d'élution de la protéase acide de <i>Scolymus maculatus</i> sur le Sephadex G-100 de la fraction précipitée par l'AS à 30%.....	42
<b>Figure 10 :</b>	Profil d'élution de la protéase acide de <i>Scolymus hispanicus</i> sur le Sephadex G-100 de la fraction précipitée par l'AS à 30% .....	43
<b>Figure 11 :</b>	Profil d'élution de la protéase acide de <i>Scolymus maculatus</i> sur une colonne de type Q HiTrap de 5 ml.....	44
<b>Figure 12 :</b>	Profil d'élution de la protéase acide de <i>Scolymus hispanicus</i> sur une colonne de type Q HiTrap de 5 ml.....	45
<b>Figure 13 :</b>	Profil électrophorétique de l'enzyme de <i>Scolymus maculatus</i> .....	47
<b>Figure 14 :</b>	Profil électrophorétique de l'enzyme de <i>Scolymus hispanicus</i> .....	48
<b>Figure 15 :</b>	Effet de la concentration du substrat sur la protéase extraite de <i>S.hispanicus</i> .....	50
<b>Figure 16 :</b>	Effet de la concentration du substrat sur la protéase extraite de <i>S. maculatus</i> .....	51
<b>Figure 17 :</b>	Cinétique de la protéase de <i>Scolymus maculatus</i> selon la représentation de Lineweaver et Burk.....	52
<b>Figure 18 :</b>	Cinétique de la protéase de <i>Scolymus hispanicus</i> selon la représentation de Lineweaver et Burk.....	52
<b>Figure 19 :</b>	Effet du pH sur l'activité la protéase de <i>Scolymus maculatus</i> .....	54
<b>Figure 20 :</b>	Effet du pH sur l'activité la protéase de <i>Scolymus hispanicus</i> .....	54
<b>Figure 21 :</b>	Effet de la température sur la protéase acide de <i>Scolymus maculatus</i> .....	56
<b>Figure 22 :</b>	Effet de la température sur la protéase acide de <i>Scolymus hispanicus</i> .....	56
<b>Figure 23 :</b>	Stabilité thermique de la protéase issue de <i>Scolymus maculatus</i> à différentes	

	températures (50°C ,60°C, 70°C et 80°C).....	58
<b>Figure 24 :</b>	Stabilité thermique de la protéase issue de <i>Scolymus hispanicus</i> à différentes températures (50°C ,60°C, 70°C et 80°C).....	58
<b>Figure 25 :</b>	Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de <i>S. maculatus</i> à : A : 60°C, B: 70°C et C : 80°C.....	60
<b>Figure 26 :</b>	Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de <i>Scolymus hispanicus</i> à : A : 60°C, B: 70°C et C : 80°C.....	61
<b>Figure 27 :</b>	Effet de la concentration du calcium sur l'activité protéolytique de la protéase de <i>Scolymus maculatus</i> .....	63
<b>Figure 28 :</b>	Effet de la concentration du calcium sur l'activité protéolytique de la protéase de <i>Scolymus hispanicus</i> .....	63
<b>Figure 29 :</b>	Effet de quelques ions métalliques sur l'activité protéolytique.....	64
<b>Figure 30 :</b>	<i>S. maculatus</i> ; aspect du caillé après coagulation.....	68
<b>Figure 31 :</b>	<i>S. hispanicus</i> ; aspect du caillé après coagulation.....	68
<b>Figure 32 :</b>	Présure commerciale ; aspect du caillé après coagulation.....	68
<b>Figure 33 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase à partir de <i>S. maculatus</i> en fonction du pH .....	69
<b>Figure 34 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase à partir de <i>S. hispanicus</i> en fonction du pH.....	69
<b>Figure 35 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de <i>S. maculatus</i> en fonction de la température.....	71
<b>Figure 36 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de <i>S. hispanicus</i> en fonction de la température.....	72
<b>Figure 37 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de <i>S. maculatus</i> en fonction de la concentration du calcium.....	72
<b>Figure 38 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase <i>S. hispanicus</i> en fonction de la concentration du calcium.....	74
<b>Figure 39 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase <i>S. maculatus</i> en fonction de la concentration du sodium.....	76
<b>Figure 40 :</b>	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase <i>S. hispanicus</i> en fonction de la concentration du sodium.....	76
<b>Figure 41 :</b>	Analyse électrophorétique de la dégradation des , et caséine .....	78
<b>Figure 42 :</b>	Dégradation de la $\kappa$ caséine.....	78

<b>Figure 43 :</b>	Profil d'élution des différentes caséines $\alpha$ , $\beta$ et $\kappa$ -caséine par RP-HPLC.....	80
<b>Figure 44 :</b>	Profil d'élution des hydrolysats des caséines $\alpha$ , $\beta$ et $\kappa$ -caséine par RP-HPLC traitées par la présure commerciale.....	81
<b>Figure 45 :</b>	Profil d'élution des hydrolysats des différentes caséines $\alpha$ , $\beta$ et $\kappa$ -caséine par RP-HPLC traitées par la protéase de <i>S. maculatus</i> .....	82
<b>Figure 46 :</b>	Profil d'élution des hydrolysats des différentes caséines $\alpha$ , $\beta$ et $\kappa$ -caséine par RP-HPLC traitées par la protéase de <i>S. hispanicus</i> .....	83
<b>Figure 47 :</b>	Test de lavage par la protéase de <i>S. maculatus</i> .....	85
<b>Figure 48 :</b>	Test de lavage par la protéase de <i>S. hispanicus</i> .....	86
<b>Figure 49 :</b>	Digestion des protéines naturelles.....	87
<b>Figure 50 :</b>	Test de délainage sur une peau de vache.....	88
<b>Figure 51 :</b>	Test de délainage sur une peau de brebis.....	88

## LISTE DES TABELAUX

<b>Tableau 1 :</b>	Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques.....	5
<b>Tableau 2 :</b>	Rôle des différentes classes de protéases végétales.....	8
<b>Tableau 3 :</b>	Exemples de protéases d'origine végétale.....	12
<b>Tableau 4 :</b>	Activité protéolytique chez quelques plantes à différents pH.....	37
<b>Tableau 5 :</b>	Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties de <i>S. maculatus</i> et <i>S. hispanicus</i> .....	38
<b>Tableau 6 :</b>	Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties des fleurs de <i>S. maculatus</i> et <i>S. hispanicus</i> .....	39
<b>Tableau 7 :</b>	Comparaison entre l'activité protéolytique pour les pétales frais et séchés.....	39
<b>Tableau 8 :</b>	Comparaison entre le broyage par un mortier avec et sans congélation par l'azote liquide.....	40
<b>Tableau 9 :</b>	Mesure de l'activité des protéases acides de <i>S. maculatus</i> et <i>S. hispanicus</i> en absence et en présence du Triton X100.....	40
<b>Tableau 10 :</b>	Résultats de la précipitation fractionnée par sulfate d'ammoniums.....	41
<b>Tableau 11 :</b>	Résultats des différentes étapes de purification de la protéase extraite de <i>Scolymus maculatus</i> .....	47
<b>Tableau 12 :</b>	Résultats des différentes étapes de purification de la protéase extraite de <i>Scolymus hispanicus</i> .....	48
<b>Tableau 13 :</b>	Affinité des deux protéases aux différents substrats.....	53
<b>Tableau 14 :</b>	Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité protéolytique.....	63
<b>Tableau 15 :</b>	Comparaison entre le temps de coagulation du lait de vache frais et UHT .....	67
<b>Tableau 16 :</b>	Temps de coagulation, activité coagulante et force de coagulation des protéases de <i>S. maculatus</i> et <i>S. hispanicus</i> sur le lait de vache UHT.....	68



## SOMMAIRE

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Enzymes protéolytiques</b> .....	<b>3</b>
1.1. Définition.....	3
1.2. Classification.....	3
1.2.1. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique.....	3
1.2.2. Selon le pH d'activité.....	4
1.2.3. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif .....	4
1.3. Propriétés physico-chimiques des protéases.....	4
<b>2. Les protéases d'origine végétale</b> .....	<b>5</b>
2.1. Généralités.....	5
2.2. Rôle physiologique des protéases chez les plantes.....	7
2.3. Principales protéases d'origine végétales.....	9
2.4. Les Astéracées.....	12
2.4.1. Généralités.....	12
2.4.2. Les scolymes.....	13
2.4.2.1. <i>Scolymus hispanicus</i> .....	13
2.4.2.2. <i>Scolymus maculatus</i> .....	15
<b>3. Mécanisme d'action des protéases</b> .....	<b>16</b>
3.1. Sérylprotéases.....	16
3.2. Cystéylprotéases.....	17
3.3. Métalloprotéases.....	17
3.4. Aspartyl protéases.....	18
<b>4. Applications technologiques des protéases</b> .....	<b>19</b>
4.1. Marché mondial des protéases.....	19
4.2. Industrie alimentaire.....	20
4.2.1. Préparation du fromage.....	20
4.2.2. Boulangerie.....	21

4.2.3. Produits à base de soja.....	21
4.2.4. Transformation alimentaire.....	21
4.2.5. Synthèse de l'aspartame.....	22
4.3. Industrie pharmaceutique et médicale.....	22
4.4. Industrie des détergents .....	23
4.5. Tannerie.....	23
4.6. Traitement des eaux usées industrielles.....	23
4.7. Autres applications.....	24
<b>5. Techniques de purification et de caractérisation des protéases.....</b>	<b>24</b>
5.1. Méthodes d'extraction.....	24
5.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	25
5.3. Chromatographie échangeuse d'ions .....	26
5.4. Chromatographie d'affinité.....	26
5.5. Chromatographie liquide à haute performance HPLC.....	26
5.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE).....	27
<b>Chapitre 2 : Matériel et méthodes</b>	
1. Matériel biologique.....	28
2. Préparation de l'extrait brut.....	28
3. Etapes de purification des protéases.....	28
3.1. Précipitation par sulfate d'ammonium.....	28
3.2. La dialyse.....	29
3.3. Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100.....	29
3.4. Chromatographie échangeuse d'ions .....	29
3.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE) .....	29
4. Méthodes de dosage.....	30
4.1. Dosage de l'activité protéolytique.....	30
4.2. Dosage des protéines selon la méthode le LOWRY (1951).....	30
5. Etude des caractéristiques de la protéase acide des deux plantes.....	31
5.1. Détermination des paramètres cinétiques.....	31
5.2. Affinité des protéases vis-à-vis de différents substrats .....	31

5.3. Détermination du pH optimum.....	31
5.4. Détermination de la température optimale.....	31
5.5. Stabilité thermique.....	32
5.6. Action de quelques effecteurs.....	32
6. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites.....	33
6.1. Test de coagulation.....	33
6.1.1. Mesure de l'activité coagulante.....	33
6.1.2. Comparaison de la coagulation des deux protéases avec celle de la présure commerciale.....	33
6.1.3. Effet du pH sur l'activité coagulante.....	34
6.1.4. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	34
6.1.5. Effet des ions de calcium et de sodium sur l'activité coagulante.....	34
6.1.6. Action des protéases sur les caséines.....	34
6.1.6.1 Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse.....	34
6.1.6.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC.....	35
6.2. Test de lavage.....	36
6.3. Digestion des protéines naturelles.....	36
6.4. Test de tannerie.....	36

### **Chapitre 3 : Résultats de l'extraction et la purification des deux protéases**

1. Recherche de l'activité protéolytique chez quelques plantes.....	37
2. Localisation de l'activité protéolytique chez <i>S. hispanicus</i> et <i>S. maculatus</i> .....	37
2.1. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des plantes.....	37
2.2. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des fleurs.....	38
3. Optimisation de l'extraction.....	40
4. Purification de la protéase extraite à partir de <i>Scolymus maculatus</i> et <i>Scolymus hispanicus</i> .....	41
4.1. Résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium.....	41
4.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	42
4.3. Chromatographie échangeuse d'ions.....	44
4.4. Electrophorèse.....	47

## **Chapitre 4 : Résultats des propriétés physicochimiques des deux protéases**

1. Mesure des paramètres cinétiques.....	50
2. Affinité des protéases aux quelques substrats.....	53
3. Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	53
4. Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	55
3. La stabilité thermique.....	57
6. Effet des effecteurs.....	61
7. Effet du calcium sur l'activité protéolytique.....	62
8. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique.....	64

## **Chapitre 5 : Résultats des propriétés technologiques des protéases extraites**

<b>1. Application de protéases acides dans la coagulation du lait.....</b>	<b>66</b>
1.1 Mesure de l'activité coagulante .....	66
1.2. Comparaison de l'action des protéases acides avec la présure .....	67
1.3. Influence de pH sur le temps de floculation du lait.....	69
1.4. Influence de la température sur le temps de floculation du lait.....	71
1.5. Influence de la concentration de CaCl <sub>2</sub> sur le temps de floculation du lait.....	73
1.6. Influence de la concentration de NaCl sur le temps de floculation du lait.....	75
1.7. Action des protéases sur les caséines.....	77
1.7.1. Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse.....	77
1.7.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC.....	80
<b>2. Autres applications.....</b>	<b>85</b>
2 1. Test de lavage.....	85
2.2. Digestion des protéines naturelles.....	86
2.3. Test de tannerie.....	87

<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>89</b>
---	-----------

<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>91</b>
---	-----------

### **Annexes**

#### **Production scientifique**

#### **Résumés**

## Introduction

Les protéases sont des enzymes capables d'hydrolyser les liaisons peptidiques des protéines en fragments plus courts, peptides et acides aminés. Elles constituent un groupe complexe d'enzymes qui diffèrent entre elles par leurs propriétés telles que la spécificité de substrat, le site actif et le mécanisme catalytique, l'optimum de pH et de température et la stabilité. Elles sont ubiquitaires ; elles sont présentes aussi bien chez les plantes que chez les animaux et les microorganismes.

Les protéases sont le groupe d'enzymes industrielles les plus importantes en tonnage et en part de marché. Elles occupent la première place dans le marché mondial des enzymes, particulièrement par le rôle important qu'elles jouent dans la biotechnologie. En effet, leur action de protéolyse entraîne des changements des propriétés chimiques, physiques, biologiques et immunologiques des protéines. Ces activités hydrolytiques peuvent être mesurées sur des substrats synthétiques, ce qui constitue un moyen simple de connaître la spécificité de clivage de ces enzymes et d'obtenir des informations importantes pour des applications biotechnologiques.

Les enzymes protéolytiques extraites des plantes sont très attractives car elles peuvent être actives dans un large intervalle de température et du pH (Uhlig, 1998). Les protéases végétales sont impliquées dans de nombreux aspects de la physiologie et du développement des plantes (Van der Hoorn, 2008). Certaines ont été identifiées et étudiées à partir de plusieurs familles de plantes telles que les *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, les *Asclepiadaceae*, les *Apocynaceae* et les *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008).

Les extraits de plantes ayant une activité protéolytique élevée servaient dans la médecine traditionnelle depuis longtemps (Otsuki *et al.*, 2010), de même que dans certains procédés industriels où certaines protéases végétales sont utilisées bien avant que soient connues leur nature et leurs propriétés. Certains de ces enzymes sont actuellement utilisées dans l'industrie alimentaire et le domaine de la brasserie et des boissons (Gozalez-Rabade *et al.*, 2011). Des kératinases se sont substituées à des produits chimiques toxiques pour l'épilation et le confitage des peaux dans l'industrie du cuir (Foroughi *et al.*, 2006). Le rôle des activités pharmacologiques des protéases des plantes a également été souligné chez les mammifères dans la cicatrisation des plaies, l'immunomodulation, les conditions digestives et des altérations néoplasiques (Salas *et al.*, 2008).

Dans l'industrie fromagère, plusieurs plantes de la famille des Asteraceae ont été utilisées pour extraire des aspartylprotéases et les utiliser comme agent coagulant. Plusieurs fromages traditionnels sont produits en Portugal et en Espagne en utilisant des extraits de fleurs de plantes comme *Cynara cardunculus* (Silva *et al.*, 2002), et *Silybum marianum* (Vairo Cavalli *et al.*, 2005). En Algérie, plusieurs préparations traditionnelles de fromages régionales tels *Aghoughlou*, *Djben* et *Kemaria* sont réalisées en utilisant des plantes, particulièrement des fleurs de chardons et de figuier (Androuët, 2002).

Dans cet objectif, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles sources de protéases à partir de quelques plantes endémiques d'une large surface du sol algérien. Pour cela, nous avons réalisé une étude en trois parties :

1. Extraction et purification des protéases à partir des deux scolymes.
2. Etude des caractéristiques physicochimiques et cinétiques des protéases préalablement séparées.
3. Etude des propriétés technologiques des protéases extraites par l'évaluation des activités coagulante du lait, détergente, anticoagulante et en tannerie.

Chapitre 1  
Synthèse  
bibliographique

## **Chapitre 1 : Synthèse bibliographique**

### **1. Enzymes protéolytiques**

#### **1.1. Définition**

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases. Elles catalysent le clivage des liaisons peptidiques des protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Barrett, 1994). Ces enzymes sont produites aussi bien par les animaux que les végétaux et les microorganismes ; leur synthèse s'effectue extracellulairement comme intracellulairement (Palma *et al.*, 2002).

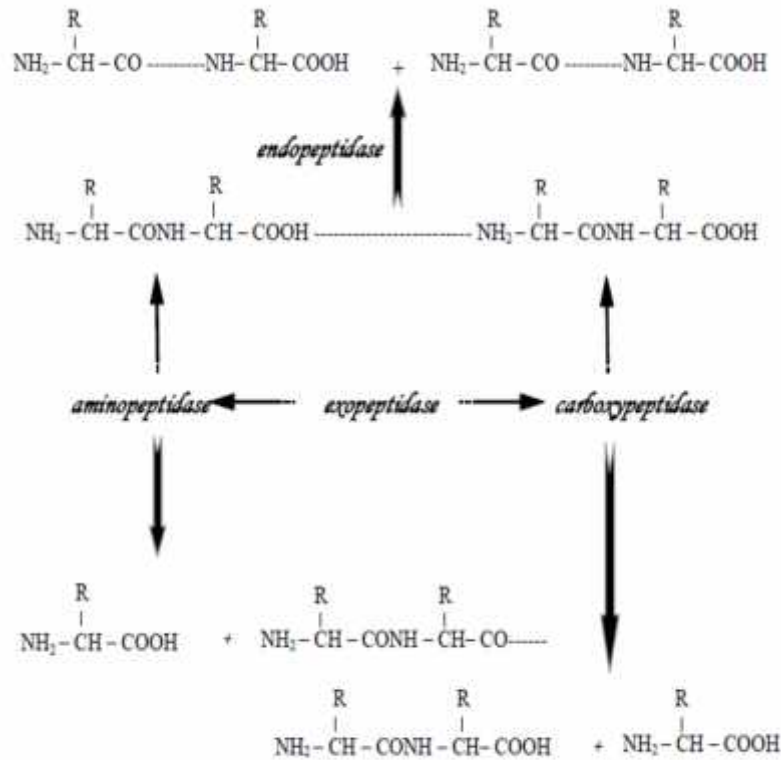
#### **1.2. Classification et nomenclature**

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

##### **1.2.1. Selon le mode d'attaque de la chaîne polypeptidique**

En fonction de leur mode d'attaque, les peptidases sont subdivisés en deux classes ; les endopeptidases qui agissent à l'intérieur de la chaîne peptidique et les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique (Penasse, 1974). Ces dernières sont elles mêmes subdivisées en deux sous-classes : les aminopeptidases et les carboxypeptidases. La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases.





**Figure 1** : Mode d'attaque de la chaîne polypeptidique (Scriban, 1999).

### 1.2.2. Selon le pH d'activité

Les enzymes protéolytiques sont classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines.

### 1.2.3. Selon la nature de résidu impliqué dans le site actif

En se basant sur les séquences primaires et la spécificité des acides aminés de leur site actif, et selon la classification de référence, disponible dans la base de données électronique MEROPS, il existe sept familles des endopeptidases : Aspartyl, Cystéyl, Métallo, Séryl, Glutamyl, Asparagyl, et Thréonylprotéases.

## 1.3. Propriétés physico-chimiques des protéases

L'activité protéolytique dépend de la structure de la molécule enzymatique (monomérique ou oligomérique), de la nature du site actif (sérylprotéase, aspartylprotéases, cystéylprotéase et métalloprotéases) et des conditions de la réaction (pH, température et effecteurs) (Penasse, 1974) (voir tableau 1).

**Tableau 1** : Propriétés analytiques de quelques enzymes protéolytiques (Deymié et al., 1981).

Classe	Exemple	Origine	pH Optimal	T ° Optimale	Inhibiteur
Serylprotéases	Chymotrypsine	Pancréas	8.0 - 8.5	35°C	nombreux aa PPN ou OP TSF inhibiteurs naturels PMSF nombreux aa
	trypsine	//	7.5 – 8.0	45°C	
	subtilisine	<i>B. subtilis</i>	7.4	60°C	
		<i>B. licheniformis</i>	10	56°C	
		<i>B. amyloliquefaciens</i>	10	60°C	
	P. extracellulaire	<i>Fusarium culmorum</i>	8.3 – 9.6	50°C	
Cystéylprotéase	Endopeptidase	<i>Trichoderma viride</i>	7.0 – 8.0	40°C	Hg EDTA oxydants  agents chélateurs  // et EDTA
	papaïne	<i>Carica papaya</i>	8.0 – 8.5	35°C	
	ficine	<i>Ficus glabrata</i>	4.0 – 6.0	35°C	
	protéase neutre	<i>Geotrichum candidum</i>	7.0	42°C	
	aminopeptidase	<i>Lb. helveticus</i>	7.0	37°C	
	streptopain	<i>Streptococcus sp</i>	7.2		
cathepsine K	cellules animales	6.5	37°C		
Aspartylprotéases	pepsine A	estomac	1.5 – 2.5	40°C	alcools pepstatine des époxydes (EPNP et le DAN)
	chymosine	estomac de veau	4.0 – 4.5	40 – 42°C	
	cathepsine D	cellules animales	2.5 – 3.5	37°C	
	P. extracellulaire	<i>Trichoderma harzianum</i>	4.5	40°C	
Métalloprotéases	//	<i>Aspergillus niger</i>	4.6	50°C	certains aa  certains aa agents chélateurs
	carboxypeptidase A	intestin grêle des vertébrés	7.5	37°C	
	carboxypeptidase B	//	8.0	37°C	
	P. bactérienne	<i>Micrococcus caseolyticus</i>	7.4	50°C	
	Collagénase	cellules animales	7.4	38°C	

## 2. Les protéases d'origine végétale

### 2.1. Généralités

Les protéases ont été identifiées et étudiées chez plusieurs familles végétales, particulièrement chez les *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae* et *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008).

Le groupe des protéases le plus répandu se retrouve dans les fruits des broméliacées (Pardo *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2000). C'est le cas de la bromélaïne et de l'ananaïne (Lee *et al.*, 1997) extraites de tige de l'ananas (*Ananas comosus*), de la ficine issue du figuier (*Ficus*

*glabrata*) (Alais, 1975 ; Scriban, 1993 ; Moodie, 2001) et de la papaine (*Carica papaya*) (Mitchel *et al.*, 1970 ; Dubey *et al.*, 2007). Ces plantes sont riches en cystéylprotéases.

Les cystéylprotéases peuvent se retrouver également dans d'autres parties des plantes, en particulier dans les racines comme chez le pois (Vincent et Brewin, 2000) et la patate douce (*Ipomoea batatas*) (Huang *et al.*, 2005) , les rhizomes comme chez le gingembre (Kim *et al.*, 2007) et les feuilles comme chez *Phaseolus* (Popovic *et al.*, 1998).

Par ailleurs, les aspartylprotéases ont été extraite à partir des fleurs de plusieurs chardons; *Cynara scolymus*, (Verissimo *et al.*, 1998; Chazarra *et al.*, 2007), *Silybum marianum* (Vairo Cavalli *et al.*, 2005), *Cynara cardunculus*, *Centaurea calcitrapa*, *Onopordum turcicum* and *Onopordum acanthium* (Domingos *et al.*, 2000, Raposo and Domingos, 2008; Tamer, 1993; Brutti *et al.*, 2012).

Elles ont été également détectées dans les graines des espèces du pin (Salmia, 1981) ainsi que chez les angiospermes, les monocotylédones comme le riz, le blé et le maïs (Asakura *et al.*, 1997; Radłowski *et al.*, 1996), les dicotylédones comme le tournesol, *Arabidopsis*, *Brassica*, les épinards, la pomme de terre, le tabac, la tomate et les plantes carnivores comme *Nepenthes* (Park *et al.*, 2001; D'Hondt *et al.*, 1997; Guevara *et al.*, 2001; Rodrigo *et al.*, 1991).

Les sérylprotéases ont été extraites des graines d'orge (*Hordeum vulgare*), de soja (*Glycine max*) et de riz (*Oryza sativa*), ainsi qu'à partir du latex d'*Euphorbia supina*, *Wrightia tinctoria*, du pissenlit (*Taraxacum officinale*), du « milkbush » africain (*Synadenium grantii*), du jacquier (*Artocarpus heterophyllus*). Elles sont également présentes dans les fleurs, les tiges, les feuilles et les racines d'*Arabidopsis thaliana*; ainsi que dans les racines de stockage du maïs (*Zea mays*); les pousses de bambou (*Pleioblastus hindsii*); les feuilles de tabac (*nicotiana tabacum*), de la laitue (*Lactuca sativa*), du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) et de la tomate (*Lycopersicon esculentum*) et des fruits de melon (*Cucumis melo*), de *Cucurbita ficifolia*, de l'Oranger des Osages (*Maclura pomifera*) et de la courge jaune (*Tricosanthes kirilowii*) (Antao et Malcata, 2005).

Les métalloprotéases sont constitutivement présentes dans toutes les espèces végétales, certaines plantes de la famille des solanacées (*Solanaceae*) ont des protéases surexprimés dans les organes reproducteurs dans plusieurs conditions de stress, y compris le stress

osmotique, des blessures et une infection pathogène (Chao *et al.*, 1999; Pautot *et al.*, 2001). Les métalloprotéases ont également été localisées dans des feuilles de soja (Graham *et al.*, 1991).

## **2.2. Rôle physiologique des protéases chez les plantes**

Les protéases sont impliquées dans tous les aspects du cycle de vie des plantes allant du stockage des protéines de réserve pendant la germination des graines à l'initiation de la mort cellulaire et programmes de sénescence (Schaller, 2004). Elles jouent un rôle essentiel dans plusieurs processus liés au métabolisme protéique (renouvellement, dégradation des protéines mal repliées, sénescence et la voie ubiquitine / protéasome) (Beers *et al.*, 2000). Les protéases sont également responsables des modifications post-traductionnelles par protéolyse limitée à des sites très spécifiques (Schaller, 2004) et sont impliquées dans une grande diversité de processus cellulaires, y compris photoinhibition dans le chloroplaste, les mécanismes de défense, la mort cellulaire programmée et la photomorphogenèse dans le développement des plantes (Estelle, 2001) (voir tableau 2).

**Tableau 2** : Rôle des différentes classes de protéases végétales

<b>Classes de protéases</b>	<b>Rôle</b>	<b>Références</b>
Aspartyl	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dégradation de protéines végétales en réponse aux agents pathogènes</li> <li>- Au cours des processus de développement</li> <li>- Mécanismes de traitement des protéines de stockage</li> <li>- Digestion des insectes dans les plantes carnivores</li> <li>- Réponses au stress et la sénescence</li> </ul>	Rodrigo <i>et al.</i> , 1991; Asakura <i>et al.</i> , 1997 Hiraiwa <i>et al.</i> , 1997 Takahashi <i>et al.</i> , 2009.  de Carvalho <i>et al.</i> , 2001
Cystéyl	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Participent à la fois aux processus anaboliques et cataboliques et sont impliquées dans la maturation des protéines, la dégradation et la reconstruction des protéines en réponse à différents stimuli externes. Ainsi qu'une fonction d'entretien pour éliminer les protéines mal repliées.</li> <li>- Protéolyse au cours de la sénescence.</li> <li>- En vertu de la sécheresse.</li> <li>- Accumulation de protéines de réserve des graines dans le stockage et la mobilisation des protéines.</li> </ul>	Grudkowska et Zagdanska, 2004.
Séryl	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Réaction d'hypersensibilité, infection de cellules végétales</li> <li>- La pathogenèse dans chez les plantes infectées par un virus.</li> <li>- La germination.</li> <li>- Dégradation des protéines.</li> <li>- La mort cellulaire programmée</li> </ul>	Laplaze <i>et al.</i> , 2000.  Beers <i>et al.</i> , 2000.
Métallo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La régulation de la demi-vie de la protéine dans les plantes.</li> <li>- Surexprimées dans de cas du stress osmotique, des blessures et des infections</li> </ul>	Schaller <i>et al.</i> , 1995

### 2.3. Principales protéases d'origine végétales

Parmi les protéases végétales les plus connues, on peut citer les cardosines, les cynarases, les bromélaïnes, la papaine, la ficine et la cucumisine.

- **Les cardosines (EC 3.4.23.X)**

Les cardosines sont les aspartylprotéases végétales les plus utilisées dans l'industrie laitière. Elles sont extraites de *Cynara cardunculus*. Ce sont des protéases hétérodimères présentes uniquement dans la partie violette de la fleur et ont des masses moléculaires d'environ 45- 48 kDa (Heimgartner *et al.*, 1990).

La cardosine A (Veríssimo *et al.*, 1996), la plus abondante des cardosines, s'accumule dans les vacuoles de stockage de protéine de l'épiderme des papilles stigmatiques et dans les vacuoles des cellules épidermiques dans le stylet (Ramalho-Santos *et al.*, 1997). Elle est constituée de deux sous-unités de MM de 31 et 15 kDa et porte un motif Arg Gly-Asp (RGD) est connu pour sa fonction dans les récepteurs de surface cellulaire par la liaison des protéines extracellulaires.

La cardosine B s'accumule dans la paroi cellulaire et de la matrice extracellulaire du tissu de transmission (Vieira *et al.* 2001), son activité protéolytique est de loin plus élevée que celle de la cardosine A (Faro *et al.*, 1995) et la MM de ses sous unités est de 34 et 14 kDa (Veríssimo *et al.*, 1996). Plus récemment, des cardosines nommés E, F, G et H, similaires à la cardosine A, ont été isolées, purifiées et caractérisées à partir de pistils de *C. cardunculus* (Sarmiento *et al.*, 2009).

- **Les cynarases**

Les cynarases sont également des aspartylprotéases. Elles existent sous trois formes 1, 2, et 3 chez *C. cardunculus* (Heimgartner *et al.*, 1990) et A, B et C chez *C. scolymus* (Llorente *et al.*, 1997). La protéase la plus étudiée c'est la cynarase A. C'est une glycoprotéine de 42 KDa, elle possède un pH optimal de 5,0 et une température optimale de 70°C. Cette enzyme est utilisée comme agent coagulant le lait (Sidrach *et al.*, 2005).

- **La ficine (EC 3.4.2 2.3)**

La ficine ou ficain est une cystéylprotéase isolée à partir du latex séché de *Ficus glabrata*. Elle est également présente dans d'autres espèces de *Ficus*, comme *Ficus carica* et *Ficus Elastica*. Une figue verte pesant 10-15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Uhlig, 1998). La plage optimale de pH est de 5,0 à 8,0 et la température optimale est de 45 à 55 ° C (Polaina et Mac Cabe, 2007). Actuellement, seulement trois fragments de ficine ont été étudiés (un fragment autour du site catalytique Cys, un fragment catalytique autour de His, et le fragment N-terminal). La séquence d'acides aminés déterminée pour les résidus du site actif ressemble de près à la séquence correspondante dans la papaïne (Devaraj *et al.*, 2008). Cette protéase est utilisée dans l'industrie alimentaire améliorer la tendresse dans la viande (Sullivan et Calkins, 2010).

- **Les bromélaïnes (EC. 3.4.22.31-33)**

Les bromélaïne sont des cystéylprotéases extraites des tiges et fruits immatures d'ananas (*Ananas comosus*). Elles existent sous plusieurs formes, la fraction majeure, présente dans les fruits de l'ananas est nommée "bromélaïne de fruits" (EC.3.4.22.33) de MM de 23KDa. Les autres fractions sont, la " bromélaïne de tige " ou ananase (EC. 3.4.22.32) de MM de 23,8 KDa, l'ananaïne (EC 3.4.22.31) et la comosaïne (Napper *et al.*, 1994)

Le pH optimum pour l'activité de bromélaïne de fruits est 6,0 à 8,5 pour la plupart de ses substrats, la température et plage optimale est de 50 à 60 ° C. Elle a une activité protéolytique plus élevée par rapport à la bromélaïne de la tige (Polaina et Mac Cabe, 2007).

Cette protéase est utilisée dans plusieurs domaines entre autre le domaine alimentaire (Sullivan and Calkins 2010) et le domaine thérapeutique (Mueller et Mechler, 2005).

- **La papaïne (EC. 3.4.22.2)**

La papaïne est une cystéylprotéases extraite de latex de *Carica papaya* (5-8%). Elle a été cristallisée pour la première fois par Drenth *et al.* (1968). Elle est souvent utilisée comme modèle dans les études de structure pour d'autres CP. Outre son activité de protéase, la papaïne présente également les activités amidase, estérase, transamidase, transesterase, et thiolesterase (Barbas et Wong, 1987). Le pH optimum de la papaïne (5,0 à 7,0) varie en fonction de la nature du substrat, il est de 7,0 lorsque la caséine est utilisée comme substrat.

Cette enzyme est extrêmement stable par rapport à d'autres protéases ; une activité effective est démontrée dans un intervalle de température de 10-90 ° C (Whitehurst et Van Oort, 2010). Elle est utilisée dans le domaine médical (Otsuki *et al.*, 2010) ainsi que le domaine alimentaire (Sullivan et Calkins, 2010).

- **La cucumisine (EC 3.4.21.25)**

La cucumisine de sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*) est une sérylprotéase de type subtilisine-like. C'est une protéase extracellulaire qui est exprimée à haut niveaux dans le fruit (comprend plus de 10% du total de la teneur en protéines dans le fruit) et s'accumule dans le jus. Elle a été la première protéase végétale, de type subtilisine, à être caractérisée. La séquence d'acides aminés Gly-Thr-Ser-Met autour du résidu serine est identique à celle de la subtilisine, une SP microbienne. Son pH optimum est de l'ordre de 10 et sa température optimale est de 70°C (Kaneda Tominaga *et al.*, 1975). Elle possède une activité kératinolytique (Yoshida- Yamamoto *et al.*, 2010).

- **Autre protéases végétales**

Il existe d'autres protéases d'origine végétale moins utilisées



**Tableau 3:** Exemples de protéases d'origine végétale

Nom de la plante	Nom de la protéase	Masse molaire (KDa)	Références
<i>Carica papaya</i>	Chymopapain (EC 3.4.22.6)	27	Jacquet <i>et al.</i> , 1989.
	Caricain(EC3.4.2 2.30)	23	Dubois <i>et al.</i> , 1988
	Glycyl endopeptidase (EC 3.4.22.25)	23,313	Ritonja <i>et al.</i> , 1989a ; Lynn and Yaguchi, 1979.
<i>Maclura pomifera</i>	Macluralisin	65	Rudenskaya <i>et al.</i> , 1995
<i>Taraxacum officinale</i>	Taraxilisin	67	Rudenskaya <i>et al.</i> ,1998
<i>Wrightia tinctorica</i>	Wrightin	57	Tomar <i>et al.</i> , 2008
<i>Euphorbia milii</i>	Eumiliin	30	Fonseca <i>et al.</i> , 2010
<i>Lactuca sativa</i>	Lettucine	40	Lo Piero <i>et al.</i> , 2002
<i>Glycine max</i>	FtsH	///	Lindahl <i>et al.</i> , 2000.

## 2.4. Les Astéracées

### 2.4.1. Généralités

Avec plus de 21 000 espèces, cette famille est la plus importante de tout le règne végétal et sans doute la plus évoluée des familles de dicotylédones. Cette famille connaît son plus fort développement dans les régions tempérées, subtropicales et tropicales, particulièrement les régions boisées (Heywood *et al.*, 1977). La plupart des espèces sont surtout des plantes herbacées vivaces ou annuelles. La famille des Astéracées appartient à l'ordre des astérales (Cronquist, 1981 ; APG III, 2009), et comprend près de 13 000 espèces réparties en 1 500 genres parmi lesquels les scolymes (voir classification).

Règne	<i>Plantae</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i> – Dicotyledons
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Scolymus</i> L.
Espèce	<i>Scolymus hispanicus</i> L. <i>Scolymus maculatus</i> L.

### 2.4.2. Les scolymes

Le genre *Scolymus* (les scolymes) regroupe quelques plantes épineuses méditerranéennes appartenant à la famille des Astéracées (ou Composées). Tout aussi piquants que les chardons, les scolymes se distinguent notamment d'eux par leurs fleurs ligulées (et non tubulées) et par le fait que les capitules poussent à l'aisselle des feuilles, et non à l'extrémité de la tige.

#### 2.4.2.1. *Scolymus hispanicus*

- **Description**

C'est une plante bisannuelle, pouvant atteindre de 30 à 80 cm de haut. La racine principale du type pivotant est assez développée. Les feuilles très épineuses, à fortes nervures blanches, sont divisées en lobes terminés chacun par une forte épine. Les tiges portent des ailes épineuses en prolongement des feuilles. Les capitules de fleurs jaunes apparaissent à l'aisselle des feuilles de juillet à septembre-octobre. Ils sont entourés de trois bractées assez semblables aux feuilles. L'involucre lui-même est composé de bractées étroites terminées en pointe. Les fruits, des akènes, sont prolongés par quatre soies (Kerguélen, 1993).

*Scolymus hispanicus* se trouve au bord des chemins et sur les dunes littorales. Nitrophile, il est également caractéristique des aires de parcage ou de stabulation du bétail.

Nom commun : chardon d'Espagne, cardon d'Espagne, épine jaune, cardousse.



**Figure 2:** *Scolymus hispanicus* (3).

- **Distribution**

Cette espèce est originaire principalement des bords de la Méditerranée : Afrique du Nord, du Maroc à l'Égypte, Europe méridionale du Portugal à la Grèce, Europe orientale (Roumanie, Ukraine), Asie occidentale, de Chypre et la Turquie jusqu'à l'Iran. En France, on la trouve surtout dans la région méditerranéenne et un peu dans le Sud-Ouest. Elle s'est naturalisée dans de nombreux pays, y compris en Amérique. En Algérie, comme dans d'autres pays, elle est considérée comme une plante envahissante.

- **Propriétés**

*Scolymus hispanicus* a été utilisée pour ces propriétés dans différentes applications pharmaceutiques et alimentaires.

- Un effet antispasmodique et spasmogénique de l'extrait de *Scolymus hispanicus* ont été prouvés, ainsi qu'un effet antioxydant dû à la présence de l'acétate taraxasteryl ; le principal triterpénoïde de l'extrait éthanolique de l'écorce de racine (Rubio *et al.*, 1995).

- *S. hispanicus* a été reconnu comme ayant des propriétés diurétiques, anti-sudorifique et litholytique. Les Grecs le savaient et il est mentionné par Théophraste. Pline fait référence à elle et considère que c'est un anti-transpirant (Duke, 1983).

- Les fleurs de *S. hispanicus* ont été utilisées depuis longtemps comme substitut du safran. Plusieurs parties de cette plante ont une saveur assez délicate. Les jeunes feuilles basales sont consommées comme légume en salade, cuites, dans les soupes, les ragoûts, les omelettes, etc. Font Quer (1990) a mentionné que cette plante est appréciée dans presque toutes les provinces de l'Espagne au cours du printemps (Duke, 1983).

#### 2.4.2.2. *Scolymus maculatus*

- **Description**

Plante annuelle à tige de 3-9 dm dressée, glabre, relevée d'ailes continues, larges, dentées, épineuses et cartilagineuses. Ces feuilles sont fortement épineuses, à nervures blanches et entourées d'une bordure blanche, épaisse, cartilagineuse, les caulinaires décurrentes avec des capitules en corymbe étalé, agglomérés, enveloppés de bractées coriaces, régulièrement pectinée, épineuses. L'involucre à folioles lancéolées terminées en pointe épineuse. Elle possède des fleurs jaunes apparaissent entre juillet et août. Les fruits, des akènes couronnés d'un petit anneau dépourvu de soies. *Scolymus maculatus* se trouve dans les terrains vagues ou les champs, sur sol sablonneux (Kerguélen, 1993).

Non commun : Scolyme taché ou Scolyme maculé.



**Figure 3:** *Scolymus maculatus* (4).

- **Distribution**

*S. maculatus* et *S. hispanicus* sont assez similaires et ont le même habitat : Littoral méditerranéen du Portugal à l'archipel, Afrique septentrionale.

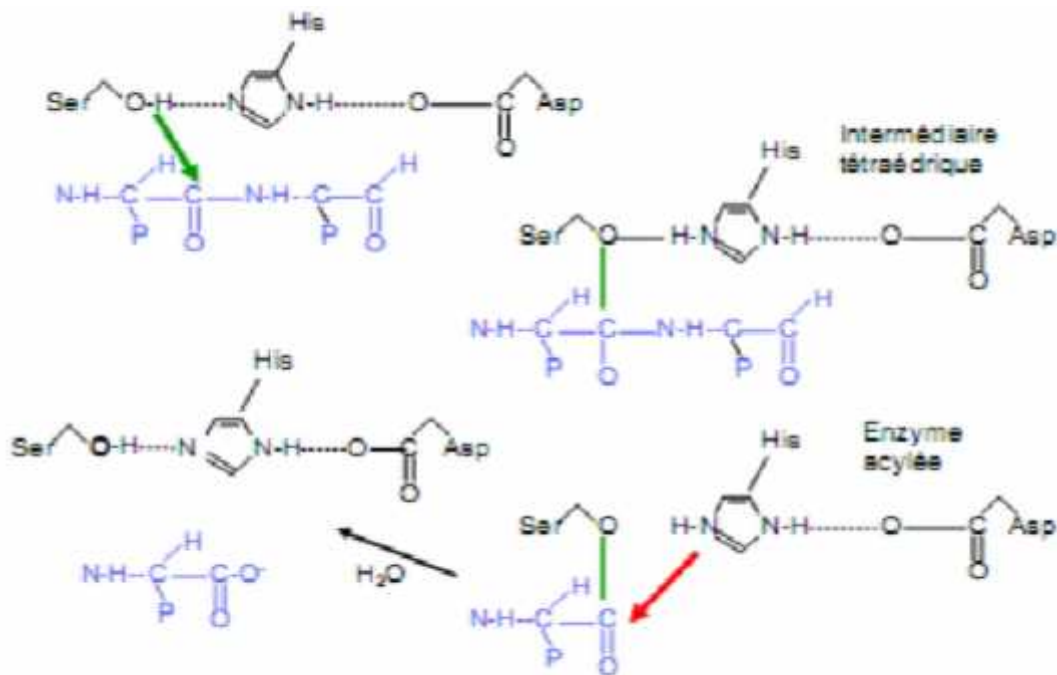
- **Utilisations**

Plusieurs parties de cette plante ont une saveur assez délicate. Les feuilles sont consommées comme légume en salade, cuites, dans les soupes, les ragoûts, les omelettes, etc. Font Quer (1990).

### 3. Mécanisme d'action des protéases

#### 3.1. Sérylprotéases

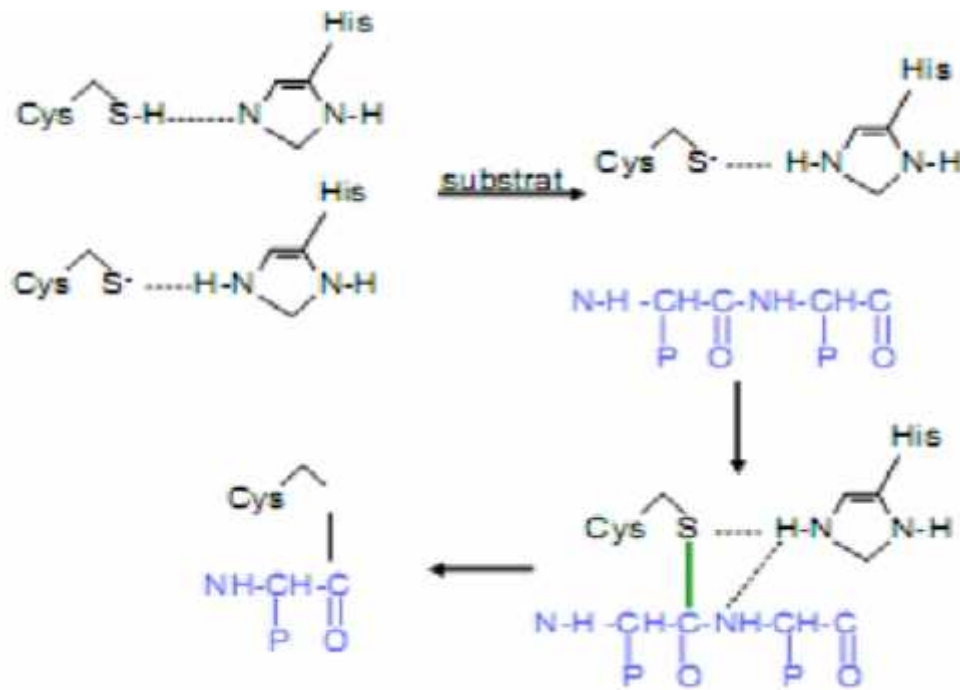
Le polypeptide s'insère dans la protéase à sérine de telle manière que le groupement carbonyle soit proche de la sérine. Le groupement OH de la sérine attaque le groupement carbonyle et l'azote de l'histidine accepte le OH de la sérine. Une association enzyme-substrat intermédiaire tétraédrique se forme. Puis, l'enzyme est acylée et le premier produit d'hydrolyse est libéré. Dans une réaction finale l'enzyme est déacylée et l'extrémité C-terminale est libérée (Lopez, 2008).



**Figure 4:** Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (Lopez, 2008).

### 3.2. Cystéylprotéases

Le premier pas du mécanisme catalytique des cystéylprotéases est la déprotonisation d'un groupement thiol dans le site actif de l'enzyme, réalisé par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (souvent c'est une histidine). Le deuxième pas consiste en une attaque nucléophile du soufre anionique de la cystéine sur le groupe carbonyle du substrat. Dans cette étape, un fragment du substrat est libéré (figure 5). L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonnée et un intermédiaire thioesther lie l'extrémité carboxy-terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioesther est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Lopez, 2008).



**Figure 5:** Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine (Lopez, 2008).

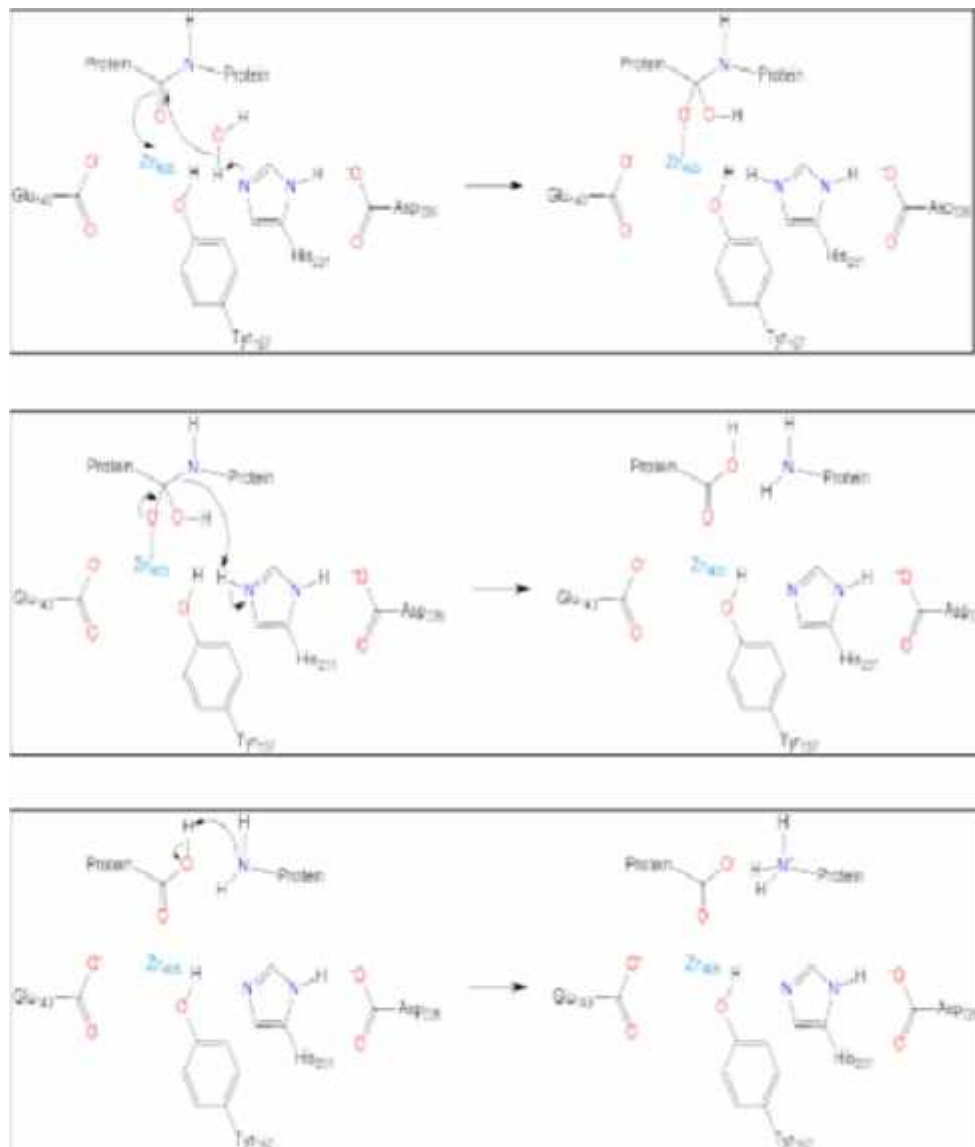
### 3.3. Métalloprotéases

Le mécanisme d'action des métalloprotéases se fait en trois étapes :

A) L'histidine est rendu plus basique grâce à l'acide aspartique (protéase à sérine). L'histidine active une molécule d'eau. La molécule d'eau attaque la liaison peptidique.

B) Le zinc stabilise l'état intermédiaire SP3 et négatif (stabilisation de l'oxyanion). La partie C terminale se dissocie et le proton de l'histidine est transféré vers l'azote de la liaison peptidique.

C) L'azote N-terminale est basique, le groupe carboxylique C-terminale est acide. Comme la réaction est rapide, il y a échange de protons entre ses deux groupes (fig.6).



**Figure 6:** Mécanisme réactionnel des métalloprotéases (Chabriere, 2010)

### 3.4. Aspartylprotéases

Le mécanisme d'action des aspartylprotéases est généralement de type acide-base, basé sur la coordination d'une molécule d'eau entre les deux aspartates du site actif (figure 7). Un aspartate active la molécule d'eau par soustraction d'un proton. Cette activation de la

molécule d'eau permet une modification du carbone carbonyle du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Lopez, 2008).

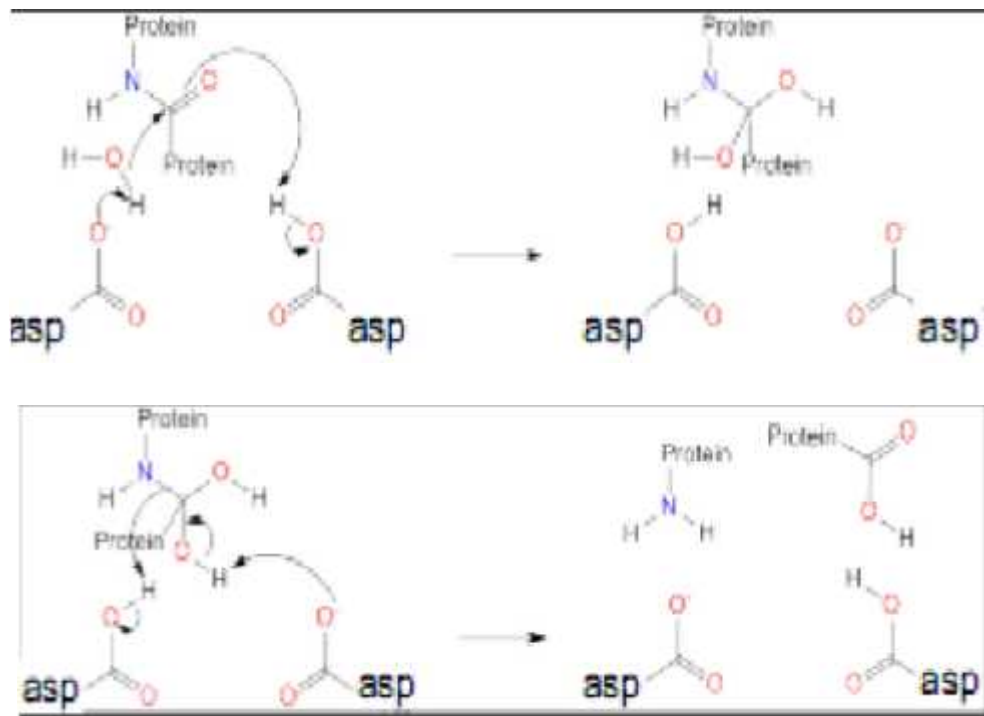


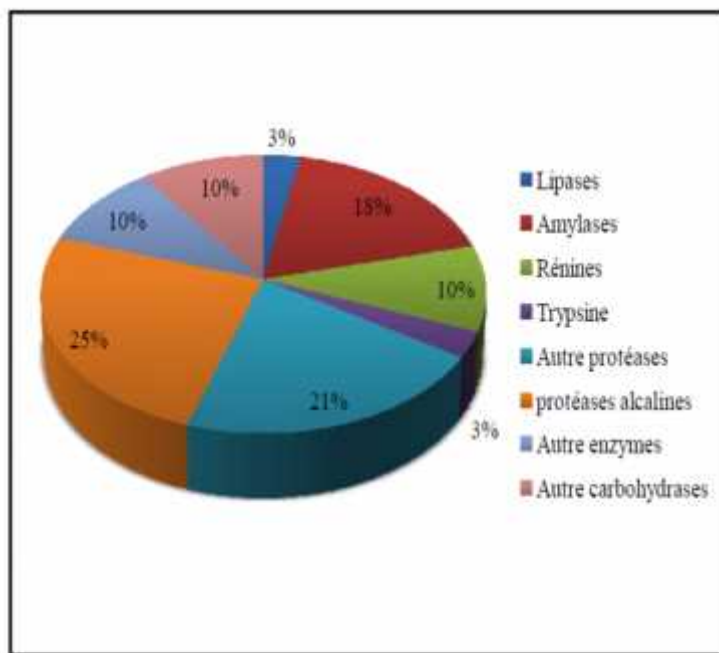
Figure 7: Mécanisme réactionnel des protéases acides (Chabriere, 2010).

## 4. Applications technologiques des protéases

### 4.1. Marché mondial des protéases

De toutes les enzymes industrielles, les protéases sont de loin le groupe le plus important. En effet, les protéases représentent à elles seules entre 60% du total des ventes d'enzymes. La dominance des protéases dans le marché des enzymes industrielles devrait s'accroître. Les ventes industrielles des protéases sont estimées à ~ 3 milliards de dollars US (García-Gómez et al., 2009).





**Figure 8:** Distribution des ventes des enzymes (Chutmanop *et al.* 2008)

Les protéases jouent un rôle important dans les détergents (Gupta *et al.*, 2002), les industries alimentaires (Sullivan et Calkins, 2010) et plus récemment dans le traitement du cuir et comme agents thérapeutiques (Walsh, 2002; Otsuki *et al.*, 2010).

## 4.2. Industrie alimentaire

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

### 4.2.1. Préparation du fromage

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases (Rao *et al.*, 1998). Les protéases employées sont surtout des protéases acides. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes (Alais, 1975). La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor sp.*, *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Ainsi que

d'autres protéases d'origine végétale comme la papaine, la bromélaïne, la ficine et les cardosines sont actuellement utilisées dans l'industrie fromagère (Uhlig, 1998).

#### **4.2.2. Boulangerie**

Les protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten, une protéine insoluble de la farine, qui est responsable des propriétés de la pâte. Le traitement de la pâte facilite sa manipulation et permet la production d'une grande variété de produits. Un tel traitement enzymatique permet de réduire le temps de pétrissage (Aviron-Violet *et al.*, 1982). Également, des protéases d'origine bactérienne sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (Rao *et al.*, 1998).

Les protéases à cystéine sont utilisées dans la boulangerie pour hydrolyser le gluten, de sorte que la masse de cuisson peut être plus facile à préparer. La bromélaïne a également été utilisée pour obtenir de la farine de frome hypoallergénique, en raison de sa capacité à briser la gluténine du blé (Tanabe *et al.*, 1996).

#### **4.2.3. Produits à base de soja**

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

#### **4.2.4. Transformation alimentaire**

Des cystéylprotéases d'origine végétale, comme la papaine brute ou la bromélaïne sont utilisées dans le domaine de brasserie (Kennedy et Pike, 1981) ainsi que la ficine (Priest et Stewart 2006). 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 collagène (Sullivan et Calkins 2010). D'autre séréylprotéases sont traditionnellement utilisées, le fruit de Kachri et de *Cucumis trigonus Roxburghi*, comme attendrisseur de viande.

Une autre utilisation des protéases d'origine végétale c'est la génération des hydrolysats protéiques de poissons (Aspmo *et al.*, 2005).

#### 4.2.5. Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé des résidus L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions bien précises. Une préparation de thermolysin provenant de *Bacillus thermoprotolyticus* est utilisée pour la synthèse de l'aspartame à partir de l'acide L-aspartique et de la L-phénylalanine méthyle ester (Rao *et al.*, 1998).

#### 4.3. Industrie pharmaceutique et médicale

Les protéases ont également une application importante dans l'industrie pharmaceutique. Les extraits de plantes ayant une teneur élevée en enzymes protéolytiques ont été utilisés dans la médecine traditionnelle pour une longue période. Elles ont été utilisées pour le traitement du cancer (Targoni *et al.*, 1999), des troubles de la digestion (Mello *et al.*, 2008), du gonflement ainsi des problèmes d'immunomodulation et comme antitumoraux (Otsuki *et al.*, 2010). Un bon exemple, la bromélaïne est capable de prévenir l'oedème, l'agrégation plaquettaire et la métastase en raison de sa capacité de modifier les structures de surface cellulaire par clivage du peptide.

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).

Le latex de *E. milii* a été rapporté comme un Agent molluscicidal, ainsi, il peut être utilisé comme molluscicide pour contrôler la transmission de la maladie endémique de schistosomiase (Yadav et Jagannadham 2008).

Des collagénases provenant de *Clostridium sp.* ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures, 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); etc.

#### 4.4. Industrie des détergents

À l'heure actuelle, l'industrie des détergents est la plus grande utilisatrice de protéases. Le marché des détergents est aujourd'hui un marché très large qui englobe les détergents pour usage domestique (détergents à lessive, détergents à vaisselle), les produits de nettoyage pour usage industriel et les produits de nettoyage pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Cependant, le plus important marché au niveau des détergents est de loin celui des détergents à lessive (Rao *et al.*, 1998). Les sérylprotéases jouent un rôle important dans l'efficacité des détergents. Parmi ces protéases: La subtilisine produite par *Bacillus sp* (kumar *et al.*, 2008). Ainsi que d'autres protéases produites par des souches de *Bacillus* (Gupta *et al.*, 2002).

#### 4.5. Tannerie

Dans la tannerie, le délainage enzymatique est utilisé depuis le début du siècle dernier et plusieurs souches microbiennes et diverses méthodes ont été suggérées. Les sérylprotéases 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*. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage (la deuxième étape) peuvent contenir des protéases de *A. oryzae*, *B. amyloliquefasciens* ou *B. licheniformis*. Jusqu'à présent, l'usage des protéases a été limité car leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques (Rao *et al.*, 1998; Meunier 1999).

#### 4.6. Traitement des eaux usées industrielles

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

#### 4.7. Autres applications

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). 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).

#### 5. Techniques de purification et de caractérisation des protéases

Comme toute protéine, les protéases peuvent être extraites, purifiées et caractérisées par différentes techniques de séparation et de caractérisation telles que les méthodes chromatographiques et l'électrophorèse.

##### 5.1. Méthodes d'extraction

- **Broyage**

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. Actuellement, le broyage est effectué en présence de l'azote liquide qui permet la libération de la quasi-totalité des protéases intra- ou extracellulaire sans provoquer des dénaturations. C'est le cas de l'extraction des différentes protéases d'origine végétale à partir de *Cynara Scolymus*, de *Cynara cardunculus*, de *Centaurea calcitrapa*, de *Sylibum marianum*, d'*Onopordum acanthium* et du gingembre (Llorente *et al.*, 2004; Silva and Malcata, 2005; Salvador SM., 2006; Vairo Cavalli *et al.*, 2008; Hashim *et al.*, 2011; Brutti *et al.*, 2012).

- **Précipitation**

Le sulfate d'ammonium est en particulier le sel utilisé pour la précipitation. Son addition, à une concentration comprise entre 0,5 et 3 M, à une solution protéique aqueuse entraîne une diminution de la constante diélectrique, donc de la stabilité des protéines, ce qui conduit à leur précipitation (Hainque, 2008). Après la séparation de précipité par centrifugation, les protéines et en particulier l'enzyme à étudier subissent une dialyse.

La précipitation est toujours utilisée afin d'éliminer un taux important des protéines dans les extraits enzymatiques. Afin de purifier la protéase des graines de *C. catciprata*, l'AS est rajouté à l'extrait brut à une concentration entre 30 et 100% suivi par une dialyse (Salvador SM. 2006). Elle est utilisée comme première étape pour la purification des protéases de *Centaurea calcitrapa*, *Synergistes sp.*, *Mucor Pusillus*, (Salvador SM. *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2008; Nouani *et al.*, 2009). Alor que pour la cystéylprotéase du gingembre, la précipitation est réalisée l'acétone froid (- 23°C) (Hashim *et al.*, 2011).

- **Centrifugation**

C'est une méthode qui se base sur la séparation des molécules d'un mélange sur la base de leur différence de densité dans un solvant. Une molécule soumise à un champ gravitationnel se déplace jusqu'à ce qu'elle rencontre une résistance capable de l'arrêter. Une centrifugation réfrigérée est utilisée pour la séparation des protéines (Hainque, 2008).

## **5.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire**

La chromatographie d'exclusion moléculaire, également appelée tamisage moléculaire ou gel-filtration, vise à séparer les molécules en fonction de leur masse moléculaire bien que la forme intervienne également. Le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser à travers des billes poreuses. Les molécules suffisamment petites seront ralenties dans leur progression, alors que les molécules trop grosses progresseront plus rapidement en passant entre les billes.

Cette technique est généralement utilisée comme première étape de la purification de la plupart des protéases, c'est le cas d'*Aspergillus oryzae* MTCC 5341 qui a été purifiée par chromatographie d'exclusion moléculaire suivie par une échangeuse d'ions (Vishwanatha *et al.*, 2009). Elle était la seule étape de purification de la protéase produite par *Synergistes sp.* (Kumar *et al.*, 2008). Pour celle du gingembre le tamisage moléculaire sur Superdex 75 est réalisé (Hashim *et al.*, 2011). Nouani *et al.* (2009) ont utilisé cette chromatographie sur Sephadex G100, suivie d'une échangeuse d'ions sur QAE Sephadex A50 afin de purifier la protéase acide de *Mucor Pusillus*. La gel filtration sur G100 a été utilisée comme seule étape de purification de la protéase de *Synergistes sp.* (Kumar *et al.*, 2008) ainsi pour celle extraite à partir de *Sardinella aurita* (Ben Khaled *et al.*, 2011).

### 5.3. Chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie échangeuse d'ions permet la séparation des protéines selon la charge nette. Pour cela, des résines échangeuses d'ions sont utilisées. Celles-ci ont la capacité d'échanger certains de leurs ions avec d'autres ions provenant d'une solution. Il existe deux types : la résine chargées positivement (chromatographie échangeuse d'anions) ou négativement (chromatographie échangeuse de cations).

Comme la filtration moléculaire, la chromatographie échangeuse d'ions est utilisée dans la plupart des protocoles de purification des protéases. L'aspartylprotéase d'une culture de cellules de *Centaurea calcitrapa* (Raposo et domingos, 2007) ainsi qu'une celle des graines sont purifiées en utilisant le Q-Sepharose comme support suivie par une chromatographie sur une colonne de type Q HiTrap (Salvador MS., 2006). Les cynarase A, B et C ont été purifiées sur le gel Q-Sepharose (Sidrach *et al.*, 2005). La cystéylprotéase extraite du rhizome de gingembre est purifiée sur une colonne de type Q 5/50 GL (Hashim *et al.*, 2011). La sérylprotéase de *Cucumis trigonus Roxburghi* est purifiée sur des gels DEAE-Sepharose et CM-Sepharose. Une autre sérylprotéase de *Ficus religiosa* est purifiée par une chromatographie échangeuse de cations (Kumari *et al.*, 2012).

Une échangeuse d'ions sur DEAE-cellulose suivie d'une gel filtration sur Sephadex G-100 sont utilisées pour la purification de la protéase produite par *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005).

### 5.4. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité est basée sur l'affinité que possède la molécule à séparer vis-à-vis de l'effecteur greffé sur la phase stationnaire, ce qui permet à la molécule de se lier au support par des liaisons covalentes. Il existe plusieurs techniques selon le type d'affinité : enzyme-substrat, ligand- récepteur et antigène- anticorps, ...Ces technique sont actuellement les plus utilisée.

Benlounissi *et al.* (2012) a utilisé cette technique pour la purification des protéases acides extraite d'*Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, d'*Aspergillus awamori* et d'*Aspergillus flavus*.

### 5.5. Chromatographie liquide à haute performance

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) permet de séparer les constituants d'un mélange (les solutés) par entraînement au moyen d'une phase mobile sous

haute pression (liquide ou gaz) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la (ré) partition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile).

Cette technique est utilisée pour la séparation des différentes molécules ainsi que leurs composition, acides aminés, peptides, protéines. Elle a été utilisée pour la séparation des différentes fractions de caséines (Vairo Cavalli *et al.*, 2008; Bruno *et al.*, 2010), pour vérifier la pureté de la protéase produite par *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 après un tamisage moléculaire et la chromatographie échangeuse d'ions (Vishwanatha *et al.*, 2009).

### **5.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE)**

L'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, ou SDS-PAGE, est une technique largement utilisée pour la séparation de mélanges de protéines, basée sur leur taille et rien d'autre (Laemmli, 1970) où la séparation se fait en milieu basique (pH8,8). La matrice est créée par polymérisation d'acrylamide et du bis-acrylamide. Le TEMED et le persulfate d'ammonium sont des agents de polymérisation.

Elle est utilisée pour identifier la structure monomérique ou oligomérique, les isoenzymes et la MM. Elle est utilisée ainsi pour vérifier la pureté de l'enzyme au cours de la purification, c'est le cas de presque toutes les enzymes, cynarase A, B et C (Sidrach *et al.*, 2005), la protéase d'*Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (Vishwanatha *et al.*, 2009) et celle de *Synergistes* sp. (Kumar *et al.*, 2008).

La protéase de graines de *C. calciprata* et celle du gingembre ont subi deux chromatographies échangeuse d'ions et un tamisage moléculaire. L'homogénéité de ces enzymes est vérifiée en réalisant un SDS-PAGE et un zymogramme (Salvador MS *et al.*, 2006; Hashim *et al.*, 2011). Raposo and Domingos (2008) ont utilisé la même technique afin d'estimer la MM de la protéase de *C. calciprata* ainsi pour vérifier l'activité protéolytique.





# Chapitre 2

## Matériel et Méthodes

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

### 1. Matériel biologique

Des tests préliminaires d'évaluation de l'activité protéolytique ont été réalisés sur les plantes suivantes : *Galactite tomentosa*, *Senecio vulgaris* L. *Cirsium arvense* L. *Scolymus maculatus*, *Scolymus hispanicus*, *Salvia officinalis* et *Ceratonia siliqua*

Les deux espèces les plus riches en protéases, *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus* ont été utilisées pour l'extraction et l'étude des caractéristiques des enzymes.

Toutes les plantes ont été récoltées au niveau de Chaab Erssas (Constantine) au mois de Mai dans les années 2010 à 2013.

### 2. Préparation de l'extrait brut

L'extrait enzymatique brut est préparé par broyage sous azote liquide à l'aide d'un mortier. La poudre obtenue est solubilisée dans du tampon citrate 0,05 M, pH 5,5 et du tampon Tris-HCl 0,05 M pH 8 au 1/3 (w/v) pour l'échantillon frais et au 1/10 (w/v) pour l'échantillon séché. Le Triton X-100 à 1% est utilisé pour faciliter la libération de l'enzyme.

Après filtration sur gaze, l'homogénat est clarifié par centrifugation à 10 000 rpm pendant 20 min à 4 C° (centrifugeuse Sigma).

L'extrait brut obtenu sera utilisé d'une part pour purifier la protéase acide et l'étude de ses caractéristiques, et d'autre part pour tester les propriétés technologiques.

### 3. Etapes de purification des protéases

Les protéases sont purifiées en 3 étapes : précipitation par l'AS suivie de dialyse, tamisage moléculaire et chromatographie échangeuse d'ions. Après chaque étape, l'activité protéolytique et la concentration en protéines totales sont dosées.

#### 3.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

La précipitation fractionnée des protéines est réalisée par le sulfate d'ammonium (Sigma) de 20 % à 80 % de saturation avec un incrément de 10%, sous agitation modérée dans un bain de glace pendant 1 heure. Après chaque étape, une centrifugation à 11000 rpm pendant 30 min à

4°C est réalisée. Le culot est dissous dans 2 ml de tampon citrate/citrate de sodium (0,05 M, pH 5,5) et le surnageant est récupéré pour la précipitation suivante.

### **3.2. Dialyse**

Les fractions obtenus après chaque précipitation sont dialysées dans des sacs de cellophane (bag 260 C.T de 2 cm de diamètre) découpées en boudins de 20 cm de longueur, contre un grand volume de tampon citrate (0,05 M, pH 5,5) à 4°C pendant 24 h sous agitation.

### **3.3. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G100**

La chromatographie est réalisée sur une colonne (Pharmacia Fine Chemicals) de dimension (50cm x 1,5cm) sur le gel Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals). Le gel est mis à gonfler dans un tampon citrate (0,05M, pH5,5).

Un ml de l'extrait enzymatique dialysé est déposé au sommet de la colonne équilibrée et éluée par le même tampon. L'éluat est collecté par fractions de 2 ml. Les fractions correspondant au pic d'activité sont rassemblées et lyophilisées.

### **3.4. Chromatographie échangeuse d'ions**

Une chromatographie échangeuse d'anions sur une colonne du type Q HiTrap (Sigma Aldrich) préalablement équilibrée avec du tampon phosphate (0,05 M; pH 6). 2 ml de l'échantillon lyophilisés et dissout dans le tampon citrate, sont déposés sur la colonne. L'élution s'effectue en utilisant un gradient en palier de NaCl de force ionique allant de 0 à 1 M. Le débit d'élution est maintenu constant à 5 ml/min. La lecture de l'absorbance est réalisée à 280 nm. Les fractions actives sont lyophilisées et conservées pour l'électrophorèse.

### **3.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS PAGE)**

Le contrôle de l'homogénéité et la pureté de l'enzyme ainsi que le poids moléculaire sont déterminés par SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (1970).

Les échantillons ainsi que les marqueurs, repris dans le tampon de séparation, sont séparés sur un gel de polyacrylamide constitué d'un gel de concentration à 5 % et d'un gel de séparation à 15 %. La migration électrophorétique est réalisée grâce à un système «Bio-rad

Laboratoires». La migration est menée à une intensité constante de 30 mA. La révélation des protéines séparées se fait par la coloration du gel au bleu de Coomassie (R-250) pendant deux heures. Le gel est ensuite décoloré par un mélange d'acide acétique et d'eau.

L'activité protéolytique est détectée par la réalisation d'un zymogramme. Après migration des échantillons, le gel est immergé dans 2% (w/v) de caséine dans du tampon citrate pH 5,5 pendant une heure à 55 °C. Après incubation, le gel est lavé trois fois dans de l'eau puis coloré avec du bleu de Coomassie R-250. Le développement d'une bande incolore sur fond bleu du gel indique la présence de l'activité protéolytique

#### **4. Méthodes de dosage**

##### **4.1. Dosage de l'activité protéolytique**

L'activité protéolytique est mise en évidence par un dosage colorimétrique des groupements tyrosine à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma); conformément à la technique adaptée par Mechakra *et al.* (1999) (voir protocole en annexe 1).

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard. Une unité (U) de protéase est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1 h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme. Chaque dosage est effectué en triple.

La gamme étalon est établie à partir d'une solution de tyrosine, avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µg/ml (voir annexe 2)

##### **4.2. Dosage des protéines selon la méthode le LOWRY (1951)**

Le principe du dosage des protéines est fondé sur la résultante de deux réactions ; la première est la réaction de Biuret, la deuxième est la réaction au réactif de Folin-Ciocalteu qui réagit sur la tyrosine et le tryptophane présents dans les protéines et se réduit en un complexe bleu. La fixation du cuivre par la chélation faciliterait le transfert d'électrons vers l'acide mixte. L'absorbance se fait à 700 nm (voir protocole en annexe 1).

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).

#### **5. Etude des caractéristiques de la protéase acide des deux plantes**

La fraction purifiée a été étudiée afin de déterminer quelques caractéristiques de l'enzyme: pH optimal, température optimale, stabilité à la température optimale et effet de quelques effecteurs (activateurs / inhibiteurs).

### **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 et 5%, avec un intervalle de variation de 0,5 %. Les paramètres cinétiques sont calculés à partir de la courbe tracée selon la méthode de Lineweaver-Burk.

### **5.2. Affinité des protéases vis-à-vis de différents substrats**

Le meilleur substrat est déterminé par la mesure de l'activité protéolytique des protéases en présence des protéines suivantes: BSA, hémoglobine, ovalbumine et caséine (Sigma). Les substrats de protéines sont dissous à une concentration de 2,5 % (w/v) dans du citrate de sodium à 0,02 M, pH 5,5. Les dosages des activités protéolytiques sont réalisés selon la méthode décrite plus haut.

### **5.3. Détermination du pH optimum**

Le pH optimal de la protéase acide de chacune des deux plantes étudiées est déterminé par la méthode 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.

### **5.4. 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 90°C avec un incrément de 5°C. Pour chaque température, les enzymes sont incubées pendant 1 heure à pH optimal.

### 5.5. Stabilité thermique

L'étude de la stabilité thermique à 50°C, 60°C, 70°C et 80°C est réalisée par dosage de l'activité enzymatique après incubation de l'enzyme pendant des temps de 10 à 90 min, avec des prélèvements toutes les 10 minutes. Les tubes contenant les solutions enzymatiques sont refroidis par immersion dans l'eau glacée à la fin de chaque temps d'incubation. L'activité résiduelle est mesurée à pH 5.

Le temps de demi-vie ou  $t_{1/2}$  ou  $t_{50}$  est déterminé par la représentation graphique linéarisée en utilisant l'équation suivante :  $\log v = -k_{in}t/2.3 + \log v_0$

Sachant que :

- V est la vitesse de la réaction au temps t (activité résiduelle).
- $V_0$  est la vitesse de la réaction au temps zéro (activité initiale de l'enzyme).
- $k_{in}$  est la constante de vitesse d'inactivation de la protéase.

Le temps de demi-vie est égal à  $\ln 2 / k$

### 5.6. Action de quelques effecteurs

L'effet de la pepstatine A, de l'EDTA et de l'iodoacétamide sur l'activité des protéases acides, est mesuré par addition de concentrations de 1mM et 10 mM aux solutions enzymatiques.

L'effet des ions  $Ca^{2+}$  est étudié en présence de  $CaCl_2$  à des concentrations de 1 à 10 mM ; celui des ions  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $FeCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $HgCl_2$  et  $FeCl_3$  est testé à la concentration de 10 mM.

Pour chaque test, le mélange enzyme-effecteur est pré-incubé pendant 2h à 20°C. L'activité résiduelle est mesurée par rapport à un contrôle en absence de tout effecteur.

## 6. Evaluation des propriétés technologiques des protéases extraites

### 6.1. Tests de coagulation

#### 6.1.1. Mesure de l'activité coagulante

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de Berridge (1945) sur le lait de vache frais et le lait UHT. La technique consiste à ajouter 1 mL d'extrait enzymatique à 10 mL de substrat contenant 0,01 M du  $\text{CaCl}_2$ . Le pH est ensuite ajusté à 6,5 à l'aide d'une solution de NaOH 0,1 N. Le temps de coagulation est le temps d'apparition des petits flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube après l'addition du substrat à 30°C.

L'activité est exprimée en unité présure (UP) qui correspond au nombre d'unités de poids ou de volumes de lait qui peuvent être coagulés par 1 mL de préparation coagulante en 100 secondes à 30 °C. Elle est calculée en utilisant l'équation de Berridge (1945) suivante.

$$UP = 10 \times V / T_c \times Q$$

Où :

UP = unité présure ;

V = volume de substrat standard utilisé ;

Q = volume d'extrait coagulant ;

T<sub>c</sub> = temps de coagulation.

L'activité coagulante est également exprimée en « force coagulante de SOXHLET » (F), selon la relation suivante :

$F = UP/0,0045$ , où F est la force coagulante de Soxhlet.

#### 6.1.2. Comparaison de la coagulation des deux protéases avec celle de la présure commerciale

L'activité coagulante des protéases est comparée à celle de la présure par la mesure des temps de floculation de lait bovin frais et de lait UHT. Pour cela nous avons évalué le temps de coagulation, l'aspect et la couleur des caillés.



### 6.1.3. Effet du pH sur l'activité coagulante

Le pH optimal de coagulation du lait UHT est déterminé par la mesure du temps de floculation à des pH compris entre 5,5 et 7 avec HCl 0,05N, avec un incrément de 0,5. Chaque essai est réalisé selon trois répétitions.

### 6.1.4. Effet de la température sur l'activité coagulante

La température optimale de coagulation du lait UHT par les protéases est déduite après mesure du temps de floculation à différentes températures, de 30 à 60 °C avec un incrément de 5°C. Chaque essai est réalisé selon trois répétitions.

### 6.1.5. Effet des ions de calcium et de sodium sur l'activité coagulante

L'effet du calcium et du sodium sur l'activité coagulante du lait écrémé par les protéases purifiées est étudié à un pH de 6,5 avec des concentrations de 10 à 60 mM de NaCl et de 10 à 50 mM de CaCl<sub>2</sub>.

### 6.1.6. Action des protéases sur les caséines

#### 6.1.6.1. Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse

L'action des protéases du *S. maculatus* et *S. hispanicus* est testée sur  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$ -caséine (Sigma Aldrich Co.) dissoutes à une concentration finale de 1 % (w/v) dans du tampon phosphate 0,1 mM pH 6,5 contenant de l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) à 0,1 % (w/v) à 30 °C. La réaction est déclenchée par l'addition de 450  $\mu$ l de chaque substrat à 45  $\mu$ l de chacune des deux protéases ainsi que la présure à 40°C. La réaction est stoppée par addition de 500  $\mu$ l de TCA à 5% (w/v) à 30, 90 et 120 min.

Les échantillons sont laissés précipiter pendant une nuit à 4°C puis centrifugés à 10000 g pendant 15 min. Les précipités sont dissous dans 450  $\mu$ l de solution d'extraction composée de tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 contenant 2% de SDS, 0,5 % de  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0,02 % de bleu de bromophénol et 10 % glycérol. Le mélange est agité au vortex quatre fois pendant 30 s puis chauffé à 100 °C pendant 5 min. Les contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions mais sans addition d'enzyme.

Les produits des différentes réactions sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en présence de glycine à 4°C comme décrit par Laemmli (1970) en utilisant une tension constante (90 à 100 V). Après migration, le gel est coloré avec par le bleu de Coomassie R-250 à 0,1 % (w/v) dans l'éthanol. La décoloration est réalisée par de l'eau/acide acétique 6: 4 (v/v).

#### **6.1.6.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC**

Le système de l'HPLC utilisé se compose d'un système de pompage avec un formeur de gradient, d'une colonne, d'un injecteur (Pump.Agilent G 1312A binary, C<sub>18</sub>colonn) avec un diamètre de 5 µm en phase inverse (4,6 X 250 mm) et d'un détecteur UV à une longueur d'onde de 220 nm. Les différents éléments sont reliés à un micro-ordinateur qui permet de piloter automatiquement les différents composants du système.

Un système de gradient de solvant utilisé est de type isocratique formé de 0,06% du TFA (solvant A) et le méthanol (solvant B).

Les analyses d'hydrolyse et de RP-HPLC sont effectuées selon la méthode décrite par Gallagher et al. (1994) adaptée par Egito et al. (2007). Une solution à 2 % de caséine α, β et κ (Sigma, 3050, St. Louis, MO 63103, USA) dans le tampon citrate 50 mM pH 5,5, est soumise à une hydrolyse à 35°C à différents temps (5 min, 90 min et 24 h). Chaque réaction est initiée par l'addition de 100 µl de l'extrait enzymatique et de 900 µl du substrat correspondant. La solution enzymatique est normalisée à une activité coagulante du lait égale à 15 min. La réaction est stoppée par chauffage des hydrolysats à 100°C pendant 10 min puis addition de 1ml du méthanol.

Un aliquote de chaque échantillon est filtré à travers des filtres de 0,22 µm (Millipore) avant l'analyse par RP-HPLC.

Chaque échantillon est injecté à la dose de 20 µl puis élué à un débit de 0,7 mL/min par 0,06 % de TFA/méthanol de qualité HPLC. La concentration du modificateur de phase mobile a été augmentée linéairement de 0 % à 91 %.

## 6.2. Test de lavage

L'action détergente des extraits protéolytiques bruts des deux plantes est testée à pH 8 sur des pièces de coton (5×5cm) tachées par le sang selon la série suivante.

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

Les morceaux de tissu sont incubés à 50°C pendant 20 min puis retirés des flacons, rincés avec de l'eau et séché. L'élimination des taches est évaluée par simple examen visuel des différentes pièces. Les morceaux de tissu tachés de sang et non traités sont pris comme contrôle.

## 6.3. Digestion des protéines naturelles

Les mêmes extraits bruts utilisés comme détergents sont testés pour les propriétés anticoagulantes sur du sang coagulé et du blanc d'œuf. Chaque extrait enzymatique (2 ml) est mélangé à 1ml de tampon citrate phosphate pH 6,8 et 3 ml de substrat. Après 12 h d'incubation à température ambiante, le résultat de l'hydrolyse est évaluée par simple examen visuel (Sen *et al.*, 2011).

## 6.4. Test de tannerie

Des pièces de peau de vache et de peau de brebis (5 x 5 cm) sont incubées dans 20 ml de l'extrait protéolytique dans du tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8 et à 45° C. Les peaux sont vérifiées par rapport à l'enlèvement des poils après différents temps d'incubation (Haddar *et al.*, 2011).

Chapitre 3  
Résultats de  
l'extraction et la  
purification protéases

## Chapitre 3 : Résultats de l'extraction et la purification des deux protéases

### 1. Recherche de l'activité protéolytique chez quelques plantes

L'activité protéolytique a été recherchée au niveau des fleurs de cinq (05) plantes de la famille des astéracées, *Galactite tomentosa*, *Senecio vulgaris* L. *Cirsium arvense* L. *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus* et d'une espèce de la famille des lamiacées, *Salvia officinalis* et du fruit d'une fabacée, *Ceratonia siliqua* L. L'extraction des protéases à différents pH fait apparaître les résultats récapitulés dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Activité protéolytique chez quelques plantes à différents pH.

Espèce	Activité protéolytique (UI)		
	pH 5	pH 7,5	pH 9
<i>Ceratonia siliqua</i>	-	-	-
<i>Senecio vulgaris</i>	-	-	-
<i>Cirsium arvense</i>	1490	-	-
<i>Salvia officinalis</i>	-	-	-
<i>Galactite tomentosa</i>	5060	-	-
<i>Scolymus maculatus</i>	9510	3430	7500
<i>Scolymus hispanicus</i>	8450	3080	6250

D'après ces résultats, il apparaît une meilleure activité protéolytique à pH 5 chez *Scolymus maculatus* avec une valeur de 9510 UI et *Scolymus hispanicus* avec 8450 UI. Une activité moyenne est observée chez *Galactite tomentosa* (5060 UI) et enfin une faible activité chez *Cirsium arvense* (1490 UI). Les deux premières espèces végétales sont retenues pour la suite du travail.

### 2. Localisation de l'activité protéolytique chez *S. hispanicus* et *S. maculatus*

#### 2.1. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des plantes

Les dosages de l'extrait brut des différentes parties des deux plantes à l'état frais font apparaître des activités protéolytiques très élevées au niveau des fleurs avec un rendement

d'environ 72% pour les deux espèces *S. hispanicus* et *S. maculatus*. Une faible activité est détectée dans les autres parties des plantes (**Tableau 5**).

**Tableau 5** : Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

	Partie de la plante	Poids (g)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (UI/mg)	Rendement %
<i>S. maculatus</i>	Plante entière	109,15	3050	165,31	100%
	Fleurs	21,99	2415	118,52	<b>71,69%</b>
	Tige	39,16	160	30,70	9,72%
	Feuilles	48	575	36,42	18,57%
<i>S. hispanicus</i>	Plante entière	164,2	2025	139,96	100%
	Fleurs	28,7	1775	100,85	<b>72,03%</b>
	Tige	65	50	15,15	10,82%
	Feuilles	70,5	350	24,89	17,69%

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Heimgartner *et al.*(1990), Llorente *et al.* (2004) et Vairo-Cavalli *et al.* (2005) qui ont purifié des protéases acides à partir de *Cynara cardunculus*, *Cynara Scolymus* et *Silybum marianum*, sachant que ces trois espèces appartiennent à la même famille des Asteraceae que *Scolymus hispanicus* et *Scolymus maculatus*. Des activités élevées ont également été observées au niveau des fleurs d'autres plantes telle *Moringa oleifera* (Emmanuel *et al.*, 2012).

## 2.2. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des fleurs

La recherche de l'activité protéolytique acide au niveau des fleurs de *S. maculatus* et *S. hispanicus* a permis de la localiser essentiellement au niveau des pétales avec 86,38% pour *S. maculatus* et 88,73% pour *S. hispanicus* (**Tableau 6**) comme cela a été observé chez *Silybum marianum* (Vairo Cavalli *et al.*, 2008). Chez *Cynara cardunculus*, deux protéases, les Cardosines A et B, se retrouvent au niveau des stigmates des fleurs (Verissimo *et al.*, 1996). La même localisation au niveau des stigmates est notée pour les trois fractions de protéases de *Cynara scolymus*, les cynarases A, B et C (Sidrach *et al.*, 2005).

**Tableau 6** : Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties des fleurs de *S. maculatus* et *S. hispanicus*.

	Partie de la fleur	Poids (g)	Activité totale (UI)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement %
<i>S. maculatus</i>	Fleur entière	45*	2627,5	168,93	100
	Pétales	23,8	2390	146,18	<b>86,38</b>
	Reste de la fleur	21,2	182,5	19,57	13,62
<i>S. hispanicus</i>	Fleur entière	9,72**	1795	130,87	100
	Pétales	3,5	1640	116,13	<b>88,73</b>
	Reste de la fleur	5,5	90	10,71	11,27

\*moyenne de 13 fleurs ; \*\* moyenne de 10 fleurs.

Les mesures de l'activité enzymatique des extraits bruts des deux scolymes sur les échantillons frais et des échantillons ayant subi un séchage par le CaCl<sub>2</sub> fait apparaitre les mêmes activités (**Tableau 7**). Cela montre que la conservation des pétales ne provoque pas de perte de l'activité protéolytique. Le séchage par le CaCl<sub>2</sub> apparait donc comme un moyen efficace pour la conservation des plantes pendant des périodes de 2 mois à une année, ce qui permet d'extraire les protéases indépendamment de la saison.

**Tableau 7** : Comparaison de l'activité protéolytique entre les pétales frais et les pétales séchés.

	Pétales	Activité totale (UI)
<i>S. maculatus</i>	Frais	2390
	Séchés	2460
<i>S. hispanicus</i>	Frais	1640
	Séchés	1765

### 3. Optimisation de l'extraction des protéases acides de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

L'optimisation de l'extraction des protéases par des méthodes mécaniques et chimiques (broyage à l'aide d'un mortier avec et sans utilisation de l'azote liquide et extraction en présence du Triton X 100) montre l'efficacité du broyage sous azote liquide. Celui-ci permet d'extraire 8500 UI pour *S. maculatus* et 7540 UI pour *S. hispanicus*, soit avec une augmentation du rendement de 34% et 39% respectivement (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Comparaison entre le broyage par un mortier avec et sans congélation par l'azote liquide.

	Activité (UI) avec l'azote liquide	Activité (UI) sans azote liquide
<i>S. maculatus</i>	8500	5600
<i>S. hispanicus</i>	7540	4650

L'utilisation du Triton X100 à la concentration de 1% permet l'extraction de 5700,37 UI pour *S. maculatus* et de 3537,5 UI pour *Scolymus hispanicus*, soit avec une augmentation de 56,84% et 50,10% respectivement (**Tableau 9**), ce qui suggère que les protéases acides de *S. maculatus* et de *S. hispanicus* sont des enzymes endocellulaires.

**Tableau 9** : Mesure de l'activité des protéases acides de *S. maculatus* et *S. hispanicus* en absence et en présence du Triton X100.

	En présence du Triton X100	En absence du Triton X100
<i>S. maculatus</i>	5700,37 UI	2460 UI
<i>S. hispanicus</i>	3537,5 UI	1765UI

D'après les résultats de Simões *et al.*, (2004), la majorité des aspartyl-protéases d'origine végétale sont des enzymes intracellulaires. Cette étude a révélé une accumulation des activités protéolytiques au niveau des vacuoles de stockage des protéines.

Les extraits bruts obtenus après broyage après congélation par l'azote liquide et traités par le Triton X100 sont utilisés pour la suite du travail.



#### 4. Purification des protéases extraites à partir de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

##### 4.1. Résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium

Les résultats des dosages de l'activité enzymatique après précipitation par le sulfate d'ammonium des extraits bruts des deux plantes à différents pourcentages de saturation sont récapitulés dans le tableau 10.

**Tableau 10:** Résultats de la précipitation fractionnée par sulfate d'ammonium.

% de saturation		Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)
<i>S. maculatus</i>	Extrait brut	20	26750	326	71,6	100
	20%	2	4500	26,2	171,75	16,56
	30%	2	8208,33	25,46	322,78	<b>30,68</b>
	40%	2	2250	23,53	95,60	8,41
	50%	2	458,33	9,81	46,68	1,71
	60%	2	291,66	5,83	50	1,83
	70%	2	41,66	1	41,66	0,2
	80%	2	16,66	0,58	28,73	0,06
<i>S. hispanicus</i>	Extrait brut	20	27459	389	70,15	100
	20%	2	3541,66	26,16	135,35	12,89
	30%	2	5633,33	25,16	303,84	<b>25,51</b>
	40%	2	1066,66	24,46	43,59	3,88
	50%	2	316,66	10,1	31,35	1,15
	60%	2	166,66	8,86	18,79	0,60
	70%	2	33,33	1,5	22,22	0,12
	80%	2	8,33	0,6	13,88	0,03

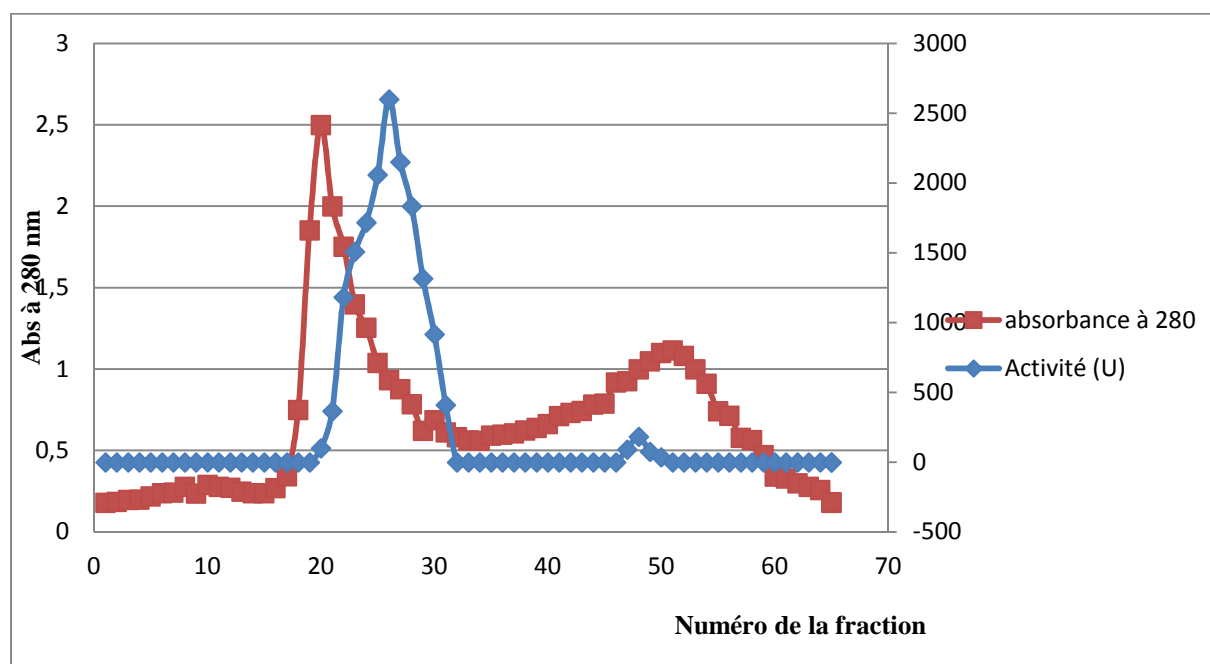
D'après les résultats, les meilleures activités protéolytiques acides ont été obtenues dans la fraction précipitée à 30 % de sulfate d'ammonium avec un rendement égal à 30,68 % et 25,51 % pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres auteurs tels que Hashim *et al.* (2011) qui ont extrait la protéase du gingembre avec un rendement de 20 à 65% de saturation.

L'enzyme précipitée à 30% est concentrée et ensuite dialysée afin de lui faire subir une chromatographie d'exclusion moléculaire sur Sephadex G100.

#### 4.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Le tamisage moléculaire des échantillons sur Sephadex G 100 a donné les profils d'élution des figures 9 et 10.

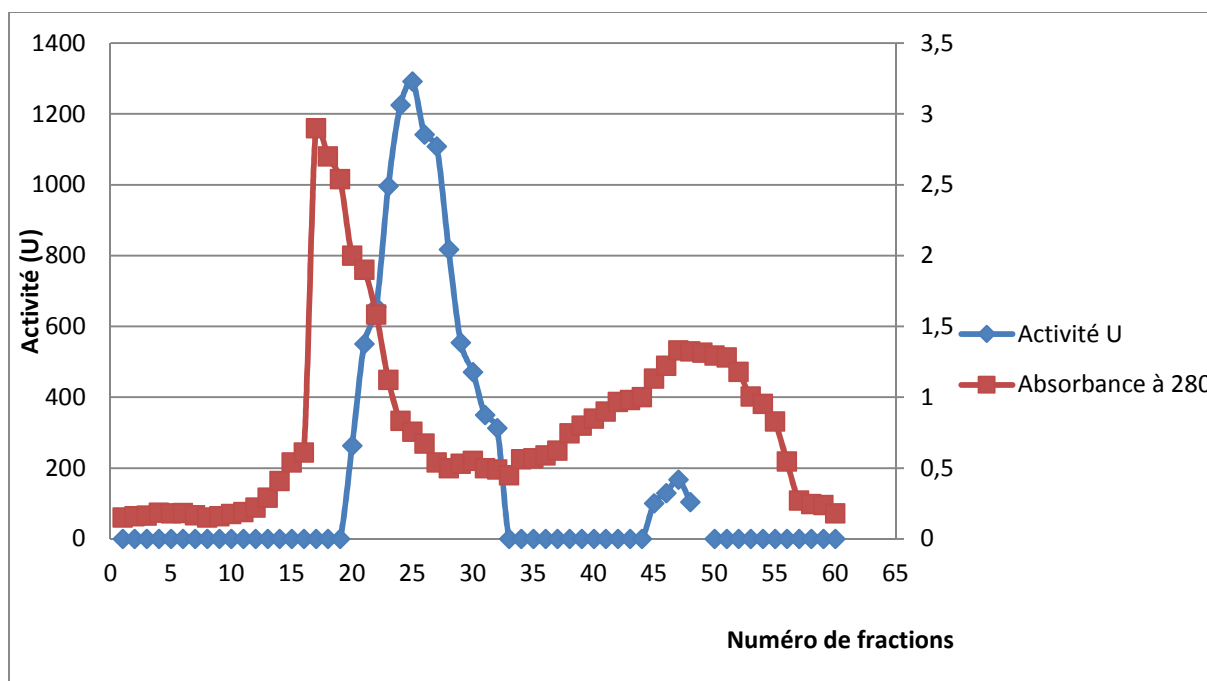


**Figure 9** : Profil d'élution de la protéase acide de *S. maculatus* sur le Sephadex G-100 de la fraction précipitée à 30 % par l'AS. Elution par le tampon citrate 0,05 M, pH 5 ; volume des fractions : 2 ml.

Le profil d'élution (**fig. 9**) de l'échantillon de *S. maculatus* révèle deux pics d'activité. Le premier constitue la forme majeure  $A_{SM1}$ , élue entre les fractions 21 et 30, et le deuxième, la forme mineure  $A_{SM2}$ , élue entre les fractions 47 et 49. Seule  $A_{SM1}$  a été retenue pour la suite

du travail ; à savoir les dosages et la détermination des propriétés. Cette fraction protéasique est séparée avec un rendement en activité égale à 37,5%, une valeur proche de celle obtenue par Hashim *et al.* (2011) qui ont purifié une protéase à partir du gingembre avec un rendement de 34.9% en utilisant le même gel de filtration. Le degré de purification obtenu est de 39,58 ; il est bien supérieur à valeur de 15,8 obtenue par Kumar *et al.*, (2007) pour la purification de la protéase acide de *Synergistes sp* et de 10,23 obtenue par Hashim *et al.*(2011) pour la protéase du gingembre.

L'extrait dialysé de la plante *S. hispanicus* a subit le même protocole que la première plante, le profil de la chromatographie est représenté sur la figure 10.



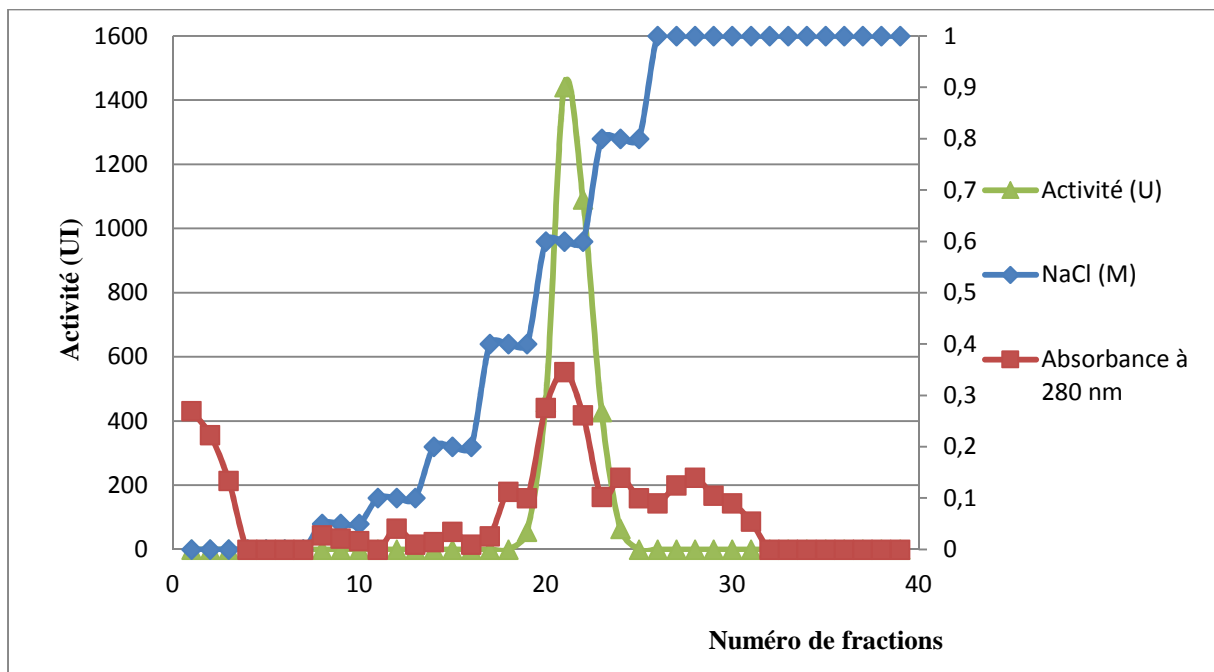
**Figure 10:** Profil d'élution de la protéase acide de *S. hispanicus* sur le Sephadex G-100 de la fraction précipitée à 30 % par l'AS. Elution par le tampon citrate 0,05 M, pH 5. Volume des fractions 2 ml.

Le profil d'élution de la protéase de *S. hispanicus* a permis d'obtenir un profil similaire à celui obtenu pour *S. maculatus* ; soit deux pics différents  $A_{SH1}$  éluee entre les fractions 21 et 34 et  $A_{SH2}$  éluee entre les fractions 46 et 49. L'activité majeure  $A_{SH1}$  est séparée avec un rendement de 23,65 % et un degré de purification de 25,14 (**Tableau 12**).

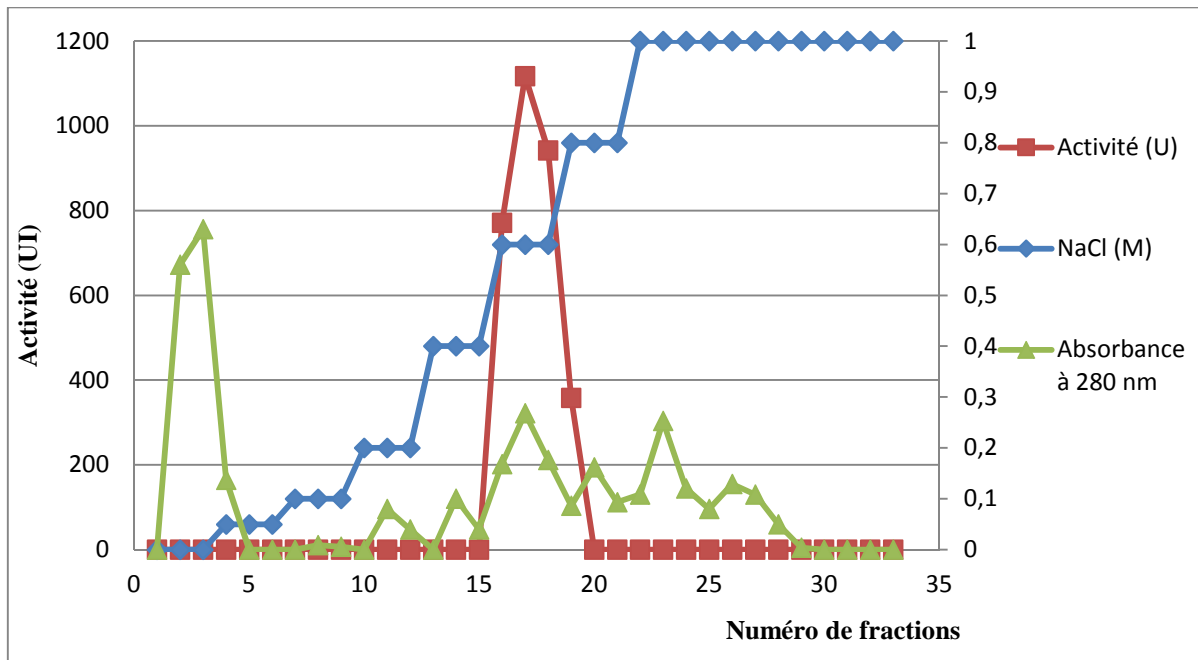
Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Kumar *et al.* (2005) pour la protéase acide de *R. oryzae* purifiée selon le même protocole utilisé dans ce travail. Ils sont supérieurs à ceux obtenus par Fazouane *et al.* (2010) pour la protéase acide d'*Aspergillus niger*.

### 4.3. Chromatographie échangeuse d'ions

La chromatographie d'échange d'ions a été réalisée sur une colonne échangeuse d'anions de type Q HiTrap. Le profil d'activité de la protéase de *S. maculatus* (**fig.11**) est identique à celui de la protéase de *S. hispanicus* (**fig. 12**) mais avec des différences des taux de protéines et d'activité enzymatique (**Tableau 11**). Toutes les fractions actives montrent un seul pic d'activité obtenu au gradient 0,6 M de NaCl.



**Figure 11:** Profil d'élution de la protéase acide de *S. maculatus* sur une colonne Q HiTrap de 5 ml. Elution par NaCl à gradient en palier. Volume des fractions 3 ml.



**Figure 12 :** Profil d'élution de la protéase acide de *S. hispanicus* sur une colonne Q HiTrap de 5 ml. Elution par NaCl à gradient en palier. Volume des fractions 3 ml.

Au cours de cette étape, nous avons observé une augmentation du facteur de purification et de l'activité spécifique par rapport à l'étape précédente, malgré une baisse du rendement (**Tableaux 11 et 12**).

Après les trois étapes de purification, la protéase de *S. maculatus* est purifiée avec une activité spécifique de 4850,44 UI, un degré de purification de 60,48 et un rendement de 30,56% (**Tableau 11**). Dans le cas de *S. hispanicus*, l'activité spécifique est de 4450 UI, le degré de purification de 57,52 et le rendement de 20,97 % (**Tableau 12**). Ces résultats indiquent un meilleur degré de purification et un rendement plus faible par rapport à ceux de la protéase extraite de graines de *Centaurea calcitrapa* (Salvador *et al.*, 2006). L'inverse apparaît par rapport aux 3 fractions protéasiques extraites à partir d'une culture cellulaire de *C. calcitrapa* avec un rendement de 12%, 18% et 9.5%, avec des degrés de purification de 123, 110 et 46 (Raposo and Domingos, 2007). Par ailleurs, des résultats variables sont obtenus pour les cynarases purifiées à partir de *Cynara Scolymus* (Sidrach *et al.*, 2004) ainsi que pour les protéases acides de *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus tubingensis* (Belounissi, 2013).

**Tableau 11:** Tableau de purification de la protéase extraite à partir de *S. maculatus*.

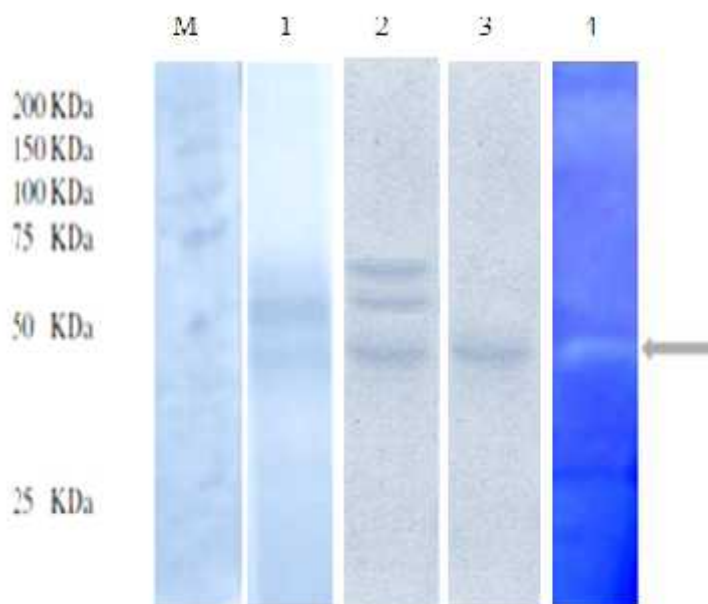
Etape de purification	Volume (ml)	Activité totale (U)	Protéines (mg)	Activité Spécifique (UI)	Rendement (%)	Degré de purification
Extrait brut	40	53500	534,66	100,06	100	1
Précipitation par l'AS à 30%	8	27533,33	69,46	396,35	51,46	3,96
Exclusion moléculaire 1 <sup>ère</sup> fraction	16	20066,66	5,06	3960,52	37,50	39,58
2 <sup>ème</sup> fraction	8	1800	1,26	1421,05	11,25	6,24
Echangeuse d'ions	9	16350	2,47	6055,55	30,56	60,51

**Tableau 12 :** Tableau de purification de la protéase extraite à partir de *S. hispanicus*

Etape de purification	Volume (ml)	Acticité totale(U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (UI.)	Rendement (%)	Degré de purification
Extrait brut	49	63700	680,28	93,63	100	1
Précipitation par l'AS à 30%	9	27562,5	90,6	304,22	43,26	3,24
Exclusion moléculaire 1 <sup>ère</sup> fraction	16	15066,66	6,4	2424,24	23,65	25,56
2 <sup>ème</sup> fraction	8	1200	0,83	1440	6,4	6,87
Echangeuse d'ions	9	13350	2,47	5393,93	20,97	57,60

#### 4.4. Electrophorèse

Afin de vérifier l'homogénéité des protéases extraites des deux plantes, deux types d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide sont réalisées après chaque étape de purification, en conditions non dénaturantes (PAGE) et en conditions dénaturantes (SDS PAGE). Les résultats sont indiqués dans les figures 13 et 14.



**Figure 13:** Profil électrophorétique de la protéase de *S. maculatus*.

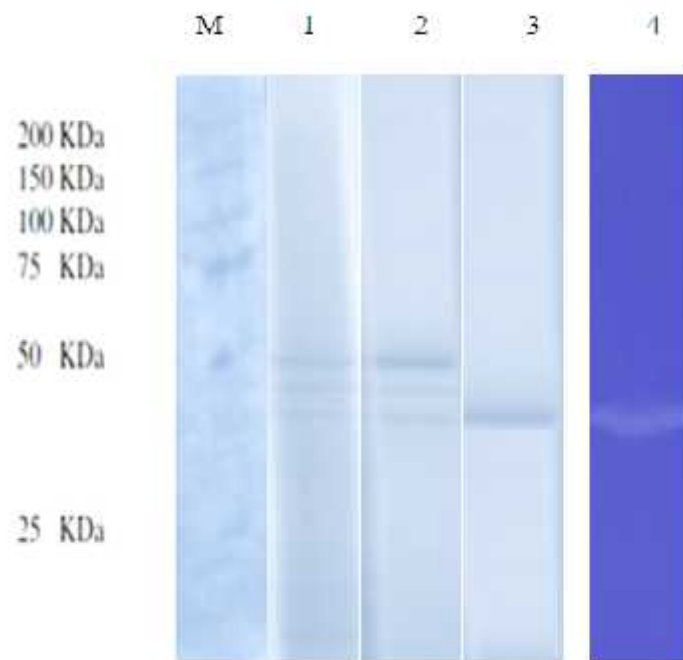
M : marqueurs de taille, 1 : PAGE de la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire ; 2 : SDS PAGE de la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire ; 3 : SDS PAGE de la protéase purifiée après chromatographie échangeuse d'ions ; 4 : Zymmogramme de la protéase purifiée.

L'électrophorégramme de l'enzyme de *Scolymus maculatus* après gel filtration fait apparaître le même profil aussi bien pour la PAGE que pour la SDS PAGE, ce qui indique que la protéase a une structure monomérique.

La SDS-PAGE de la protéase issue de la chromatographie échangeuse d'ions montre une seule bande, ce qui indique une enzyme pure ayant une masse moléculaire de 45 kDa (**fig.13**). Le zymogramme montre également une seule bande, confirmant l'activité de la protéase en tant que monomère et une masse moléculaire native conforme avec celle obtenue par SDS-PAGE.

L'activité de la bande indique également que l'enzyme est résistante au SDS. Cette caractéristique a également été observée chez d'autres protéases végétales, en particulier des sérine-protéases (Yamagata *et al.*, 1989).

Dans le cas de la protéase de *S. hispanicus*, l'électrophorégramme de la fraction majeure active, issue de la gel filtration et lyophilisée, indique un résultat similaire à celui de la protéase de *Scolymus maculatus*. Cette fraction est séparée 3 bandes selon le même profil qu'en conditions non dénaturantes (**fig. 14**) indiquant une structure monomérique de la protéase et une masse moléculaire de 45 kDa. Le zymogramme des gels obtenus par SDS PAGE et incubés dans 2,5% de caséine donne également une seule bande d'activité protéolytique.



**Figure 14:** Profil électrophorétique de l'enzyme de *S. hispanicus*.

M : marqueurs de taille, 1 : PAGE de la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire ;  
2 : SDS PAGE de la fraction active issue de la chromatographie d'exclusion moléculaire ; 3 : SDS PAGE de la  
protéase purifiée après chromatographie échangeuse d'ions ; 4 : Zymogramme de la protéase purifiée.

Ces résultats sont similaires à ceux de la protéase acide d'*Onopordum acanthium* (Brutti *et al.*, 2012) et ceux des cynarases A, B et C avec des valeurs de 40,8 kDa, 43,4 kDa et 46 kDa, respectivement (Sidrach *et al.* 2005).



La masse moléculaire des protéases des deux plantes est par ailleurs supérieure à celle de la protéase extraite des grains de *Centaurea calciprata* (35 KDa) (Salvador *et al.*, 2006) et de *Bromelia hieronymi* (25 KDa) (Bruno *et al.*, 2002). Elle est, par contre, inférieure à celle de *C. calciprata* (66 KDa pour la fraction A et 50 KDa pour les fractions B et C) (Raposo and Domingos, 2008) ainsi que par rapport à la protéase du *Helianthus annuus* dont le poids moléculaire est de 110 KDa (Egito *et al.*, 2007).

Dans le cas des protéases acides d'origine microbienne, la MM varie d'une espèce à l'autre ; 34 KDa pour *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005), 60 KDa pour *Synergistes sp.* (Vishwanatha *et al.*, 2009) et 47 KDa pour *Aspergillus oryzae*. Dans le cas des protéases acides purifiées à partir de *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus tubingensis*, les MM apparentes sont de 30 KDa, 55 KDa et 55 KDa respectivement (Benlounissi, 2012). Pour *Aspergillus niger*, la MM est de 47 KDa (Fazouane-Naimi *et al.*, 2010).

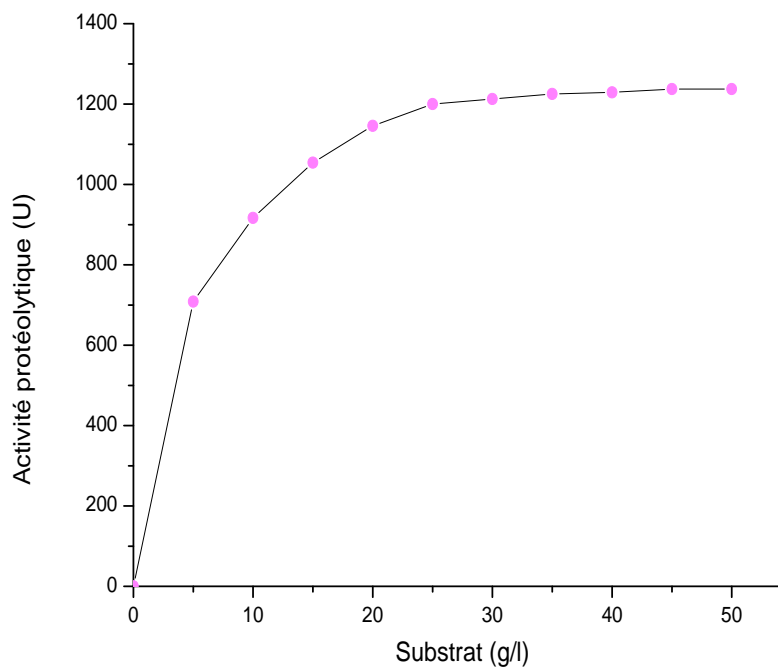
Chapitre 4:  
Résultats des  
propriétés  
physicochimiques des  
protéases

## Chapitre 4: Résultats des propriétés physicochimiques des protéases purifiées

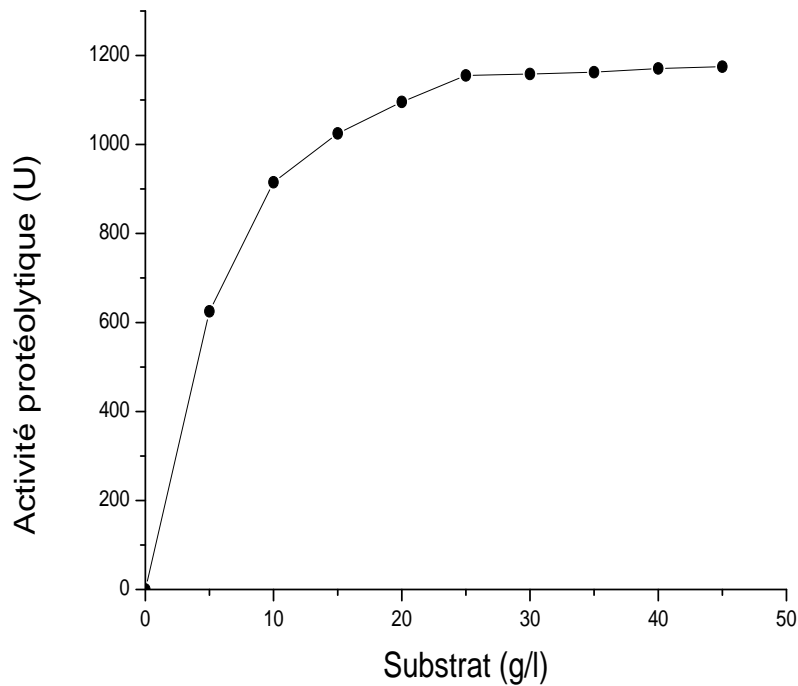
### 1. Mesure des paramètres cinétiques des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

Les activités enzymatiques des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* sont mesurées à différentes concentrations de caséine (0% à 5%) afin de déterminer les paramètres cinétiques des deux protéases.

La représentation graphique (**fig. 15** et **16**), des variations des vitesses en fonction de la concentration du substrat, présente une allure michaélienne pour les deux protéases, ce qui confirme sa structure monomérique, comme cela a été observé dans l'électrophorèse (chapitre précédent).



**Figure 15:** Effet de la concentration du substrat sur la protéase de *S. maculatus*.



**Figure 16:** Effet de la concentration du substrat sur la protéase de *S. hispanicus*.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés dans la bibliographie pour les protéases de *C. cardunculus* et *C. scolymus*. En effet, les cardosines A et B et la cynarase A ont une structure monomérique (Verissimo *et al.*, 1996 ; Silva *et al.*, 2003 ; Sidrach *et al.*, 2005). La même cinétique hyperbolique est observée pour la protéase acide d'*A. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005) et de *R. oryzae* (Vishwanatha *et al.*, 2009).

La représentation de Lineweaver et Burk (**fig. 17 et 18**) a donné des constantes de Michaelis ( $K_M$ ) de 4,76 g/L et 5,71 g/L et des vitesses maximales de 1391 U et 1367 U pour *S. hispanicus* et *S. maculatus* respectivement. Ces résultats sont similaires à ceux des protéases acides d'*A. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005) et de *R. oryzae* (Vishwanatha *et al.*, 2009).

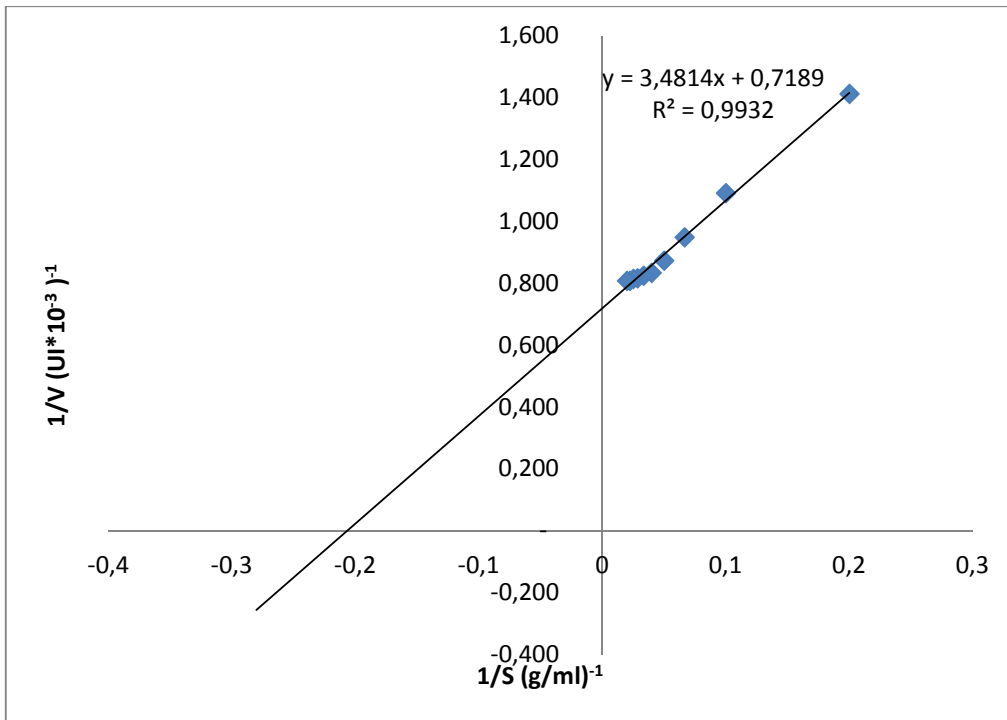


Figure 17: Cinétique de laprotéase de *S. maculatus* selon la représentation de Lineweaver-Burk

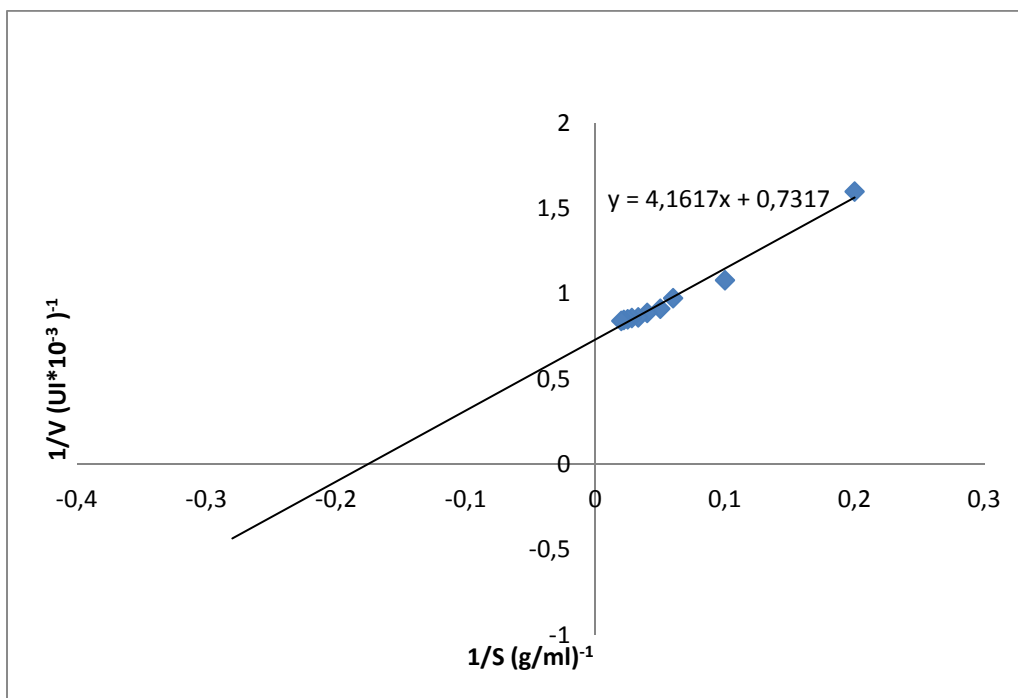


Figure 18: Cinétique de laprotéase de *S. hispanicus* selon la représentation de Lineweaver-Burk

## 2. Affinité des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* vis-à-vis de quelques substrats

L'activité des protéases acides des deux plantes mesurée en présence de quelques substrats naturels (BSA, hémoglobine, caséine et ovalbumine) (**Tableau 13**) indique une meilleure affinité pour la caséine. L'activité envers l'hémoglobine et la BSA est 4 fois inférieure par rapport à celle de la caséine. L'activité avec l'ovalbumine n'était que de 9% et de 7% environ par rapport à celle de caséine comme substrat, pour la protéase de *S. maculatus* et *S. hispanicus* ; soit moins du dixième de l'activité de référence.

**Tableau 13** : Affinité des deux protéases aux différents substrats

Substrats	Activité résiduelle (%)	
	<i>S. maculatus</i>	<i>S. hispanicus</i>
Caséine	100	100
Hémoglobine	29	27
BSA	25,5	27,5
Ovalbumine	9	7

## 3. Effet du pH sur l'activité protéolytique

L'évolution de l'activité protéolytique de la protéase purifiée en fonction du pH est présentée dans les figures 19 pour *S. maculatus* et 21 pour *S. hispanicus*. Une augmentation de l'activité est observée pour les deux protéases jusqu'à pH 5, où elle atteint sa valeur maximale. Au-delà, elle diminue. A pH 7, les deux enzymes perdent environ 60% de leur activité.

L'analyse de la variance (ANOVA) des résultats montre que le pH a un effet très significatif sur l'activité enzymatique de la protéase acide des deux espèces ( $p = 0,000002$ ).

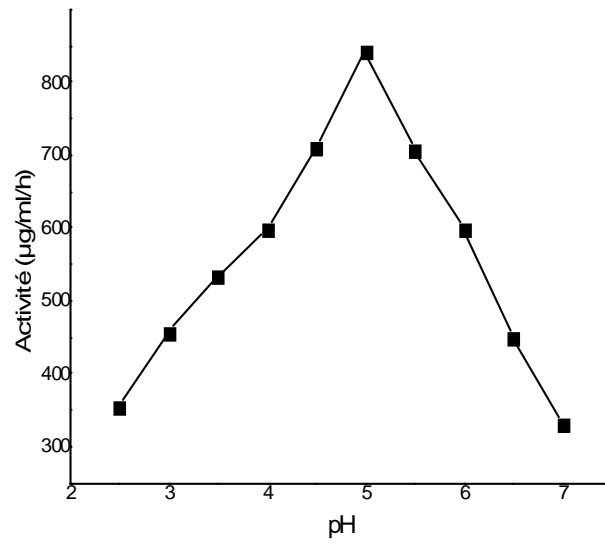


Figure 19 : Effet du pH sur l'activité la protéase de *S. maculatus*.

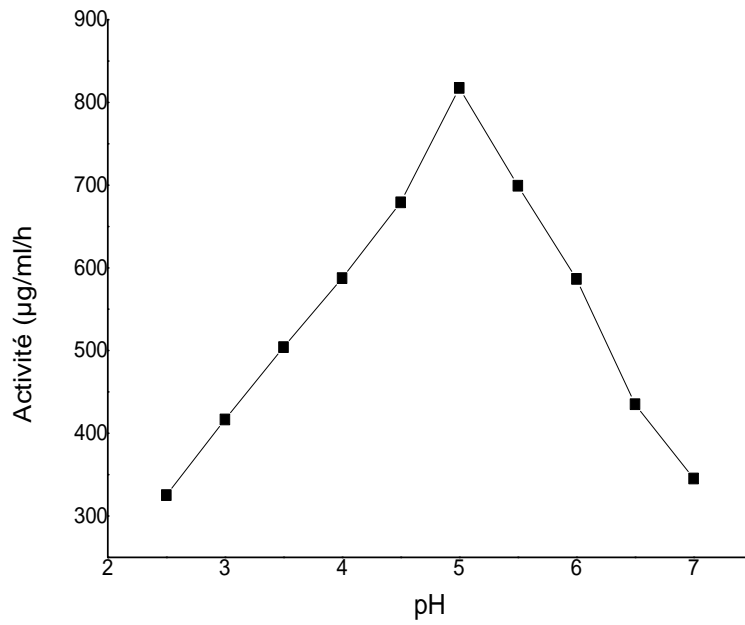


Figure 20 : Effet du pH sur l'activité la protéase de *S. hispanicus*.

Le pH optimal des protéases des deux plantes est le même que celui obtenu pour celles des cardosines A et B isolées des fleurs de *Cynara cardunculus* (Faro *et al.*, 1995), d'*Arabidopsis thaliana* (Mutlu *et al.*, 1998), de *Fagopyrum esculentum* (Timotijevic *et al.*, 2003), de *Centaurea calcitrapa* (Domingos *et al.*, 2000; Lourenc *et al.*, 2002; Salvador *et al.*, 2006) et de *Cynara scolymus* (Llorente *et al.*, 2004 ; Sidrach *et al.*, 2005). Ces résultats sont également très proches du pH optimal des protéases acides produites par les moisissures *Penicillium pinophilum* (5,5) et *Aspergillusniger* (5,5) (Benlounissi, 2012).

Un pH plus acide (3,8) est obtenu pour la protéase de *Silybum marianum* (Vairo Cavalli *et al.*, 2005) de même que pour les protéases de *Aspergillus Oryzae* MTCC 5341 (3,2) (Vishwanatha *et al.*, 2009), *Aspergillustubengensis* (4,3) et *Aspergillusawamori*(4,5) (Benlounissi, 2012). Un pH plus alcalin (6,0) est noté pour la protéase de *C. Cardunculus* (Chen *et al.*, 2003).

#### **4. Effet de la température sur l'activité protéolytique**

L'effet des températures de 30° à 90°C sur l'activité de la protéase acide de *S. maculatus* est présenté dans les figures 21 et 22. Celles-ci montrent une augmentation jusqu'à 55°C, température maximale. Au-delà, l'enzyme perd son activité ; elle est inactivée complètement à 90°C, indiquant une dénaturation de l'enzyme par modification de la structure tertiaire (Scriban, 1993).

L'analyse de la variance des résultats (ANOVA) révèle que la température exerce un effet significatif sur l'activité enzymatique de la protéase des deux espèces étudiées ( $p = 0,004711$  pour *S. maculatus* et  $p = 0,005$  pour *S. hispanicus*).



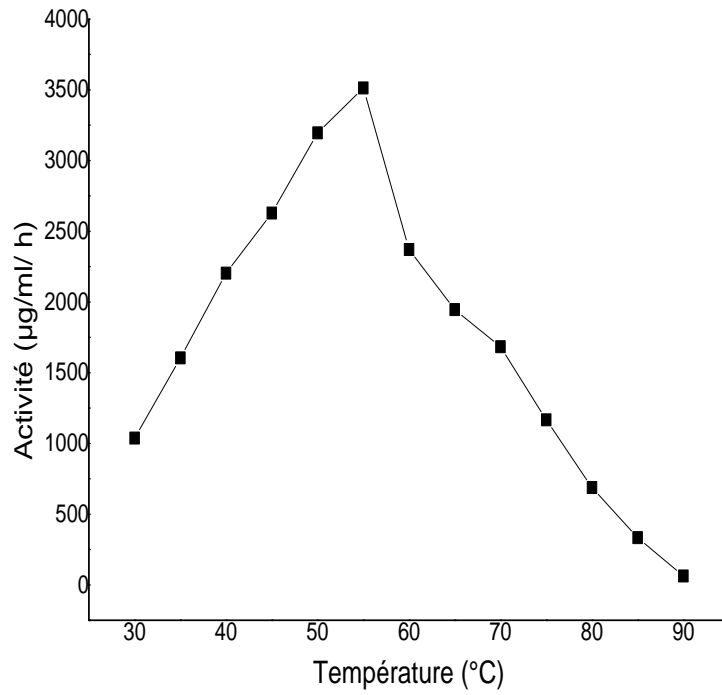


Figure 21 : Effet de la température sur la protéase acide de *S. maculatus*.

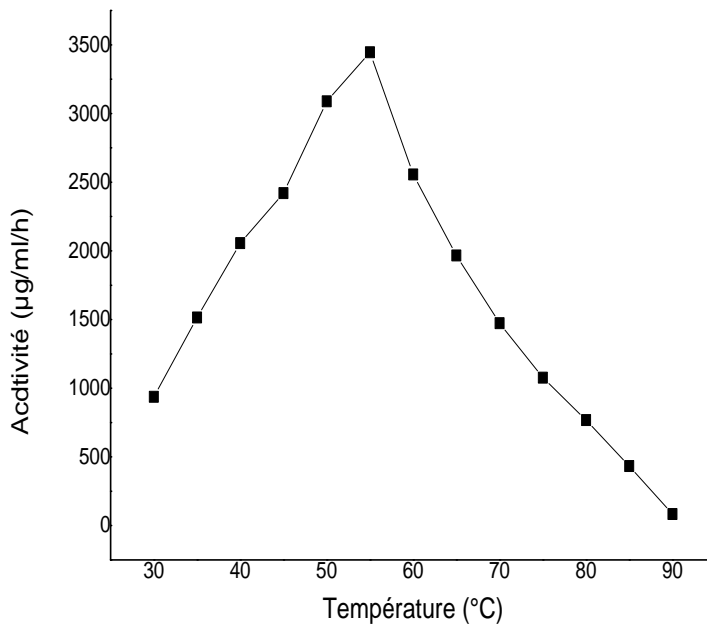


Figure 22: Effet de la température sur la protéase acide de *S. hispanicus*

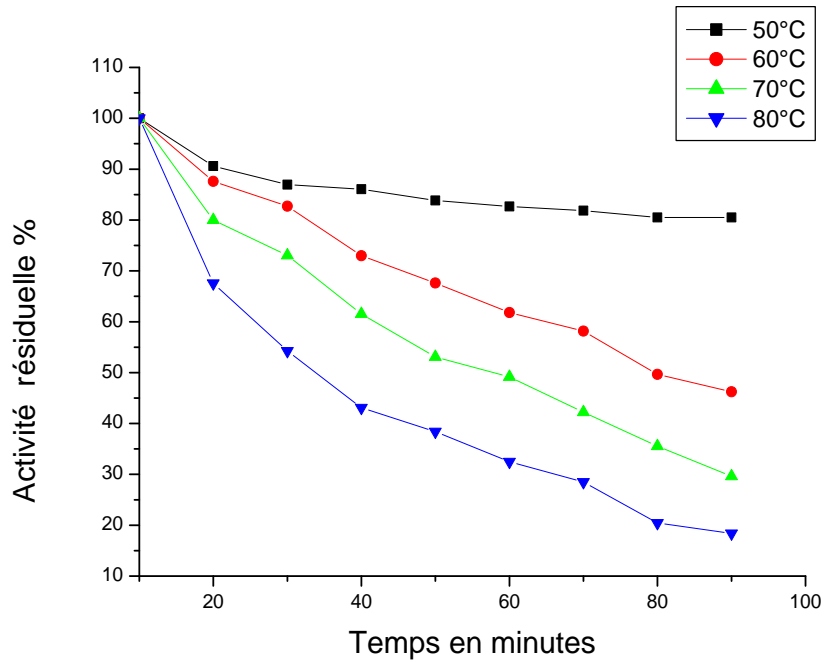
Les valeurs de température optimales sont relativement élevées par rapport aux autres protéases ; elle confirme le caractère thermorésistant des protéases d'origine végétale telle que la papaïne (55°C). Les deux aspartyl protéases de *C. cardunculus* sont très stables à des températures supérieures à 60°C ; avec un maximum d'activité à 50°C. C'est aussi le cas de la cynarase A de *C. scolymus* (Verissimo *et al.*, 1996).

Le même effet a été observé pour la protéase acide de *C. calcitrapa* (Domingos *et al.*, 2000; Salvador *et al.*, 2005 et 2006) ainsi que pour la protéase acide de *Cryptococcus albidus* (Alessandro *et al.*, 1980), et de *Penicillium oxalicum* (Hashem, 1999) qui agissent à une température optimale de 60°C.

Des valeurs proches sont obtenues pour d'autres protéases d'origine microbienne, c'est le cas de la protéase d'*A. oryzae* qui possède une activité maximale à 55°C (Vishwanatha *et al.*, 2009), ainsi que celle de *R. oryzae* qui agit à 60°C (Kumar *et al.*, 2005).

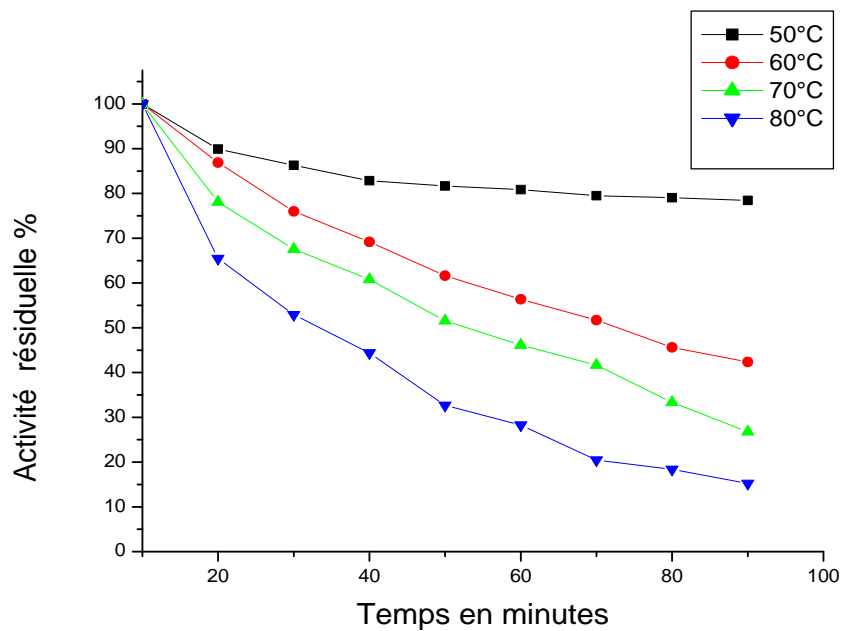
#### **5. Stabilité thermique des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus***

La stabilité thermique des protéases acides des deux plantes réalisée à 50°C, 60°C, 70°C et 80°C pendant des temps variant de 10 à 90 min à pH 5.5 est représentée dans les figures 23 et 24. On observe une stabilité des deux enzymes à 50°C et à 60°C où elles gardent environ 90% et 60% de leurs activités après 90 minutes.



**Figure 23:** Stabilité thermique de la protéase issue de *Scolymus maculatus* à différentes températures (50°C ,60°C, 70°C et 80°C)

L'activité résiduelle de la protéase de *S. maculatus* exprimée par heure d'incubation, est de 58% à 60°C, de 47% à 70°C et de 28,5% à 80°C.



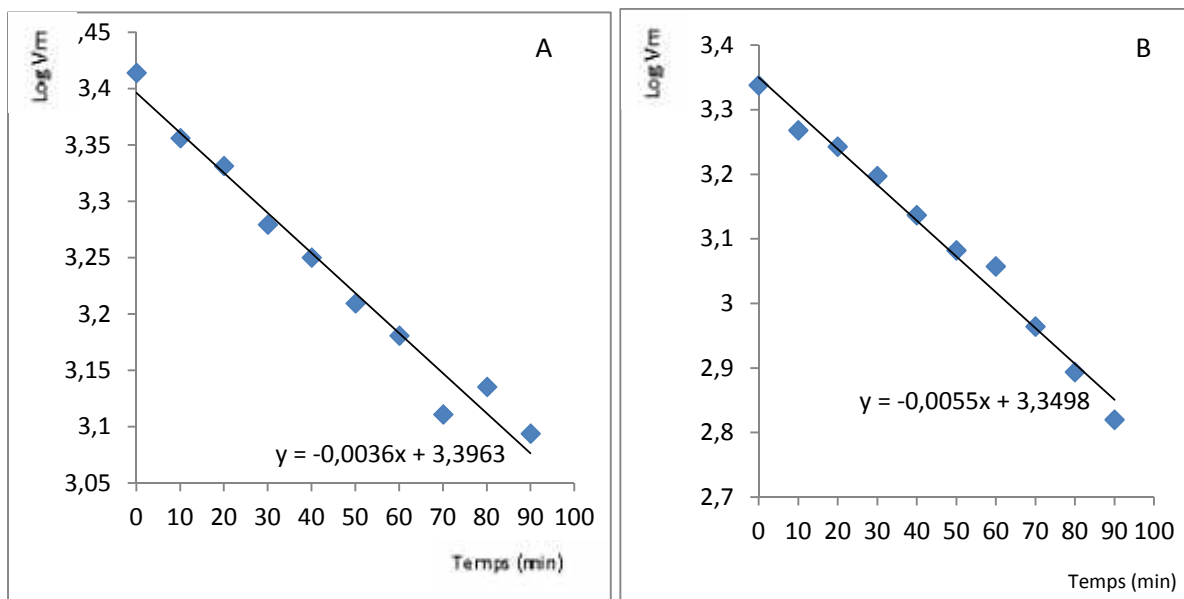
**Figure 24:** Stabilité thermique de la protéase issue de *Scolymus hispanicus* à différentes températures (50°C ,60°C, 70°C et 80°C).

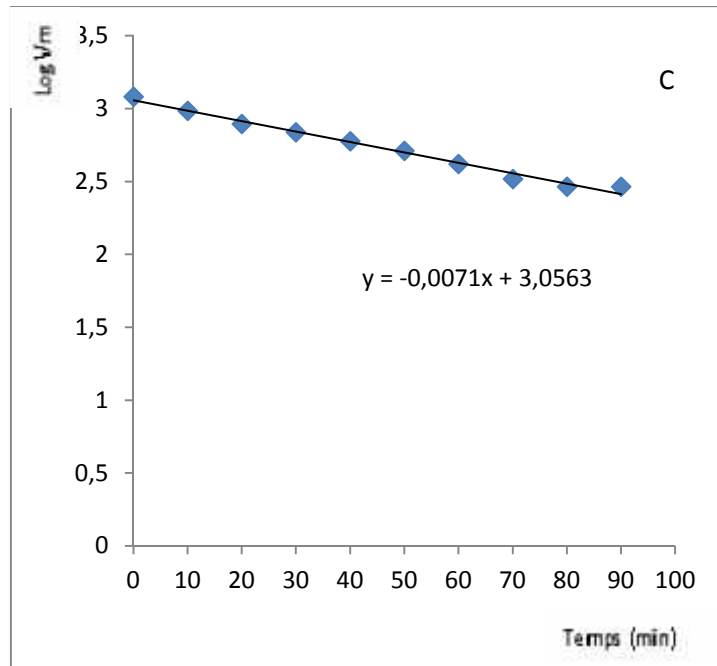
Le même résultat a été observé pour la protéase extraite à partir de *S. hispanicus*, où l'enzyme garde 56,36% de son activité à 60°C, 46,12% à 70°C et 28,26 à 80°C. Ces résultats confirment la thermostabilité des deux protéases.

Des résultats obtenus par Mufti *et al.*, 2006 avec la protéase de *Cucumis trigonus* montrent que l'enzyme perd 50% de son activité initiale à 70 C° dans la première heure. Un résultat similaire est rapporté par Kumar *et al.* (2005) qui a travaillé sur l'aspartyl protéase de *R.oryzae* ; celle-ci garde 62% de son activité à 60°C après une heure d'incubation.

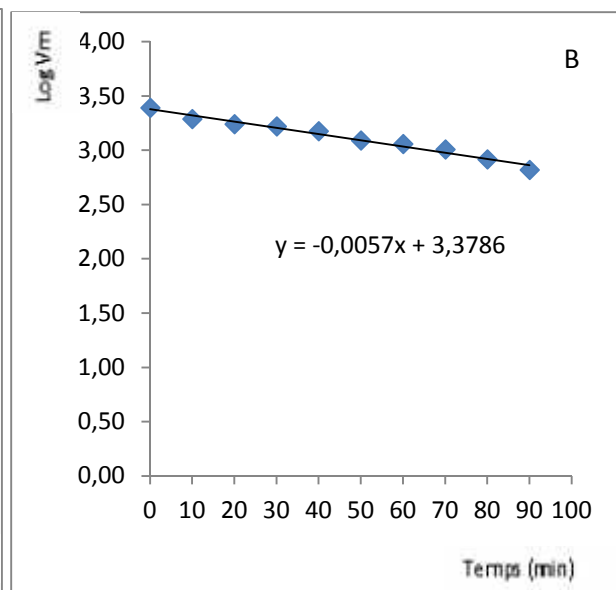
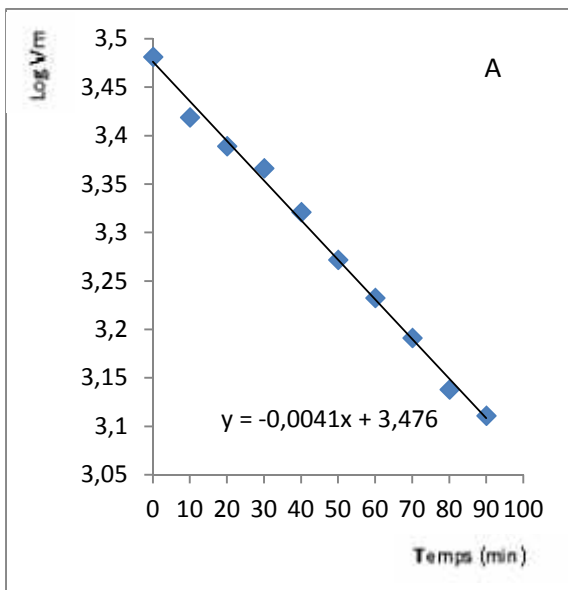
Le temps de demi-vie est calculé grâce à la représentation graphique linéaire (**fig.25** et **26**). La protéase de *S. maculatus* possède un temps de demi-vie de 27 min et 45 s à 80°C, 60 min et 36 s à 70°C et 80 min et 23s à 60°C. L'enzyme garde 18% de son activité à 80°C et 26% à 70°C après 90 minutes d'incubation.

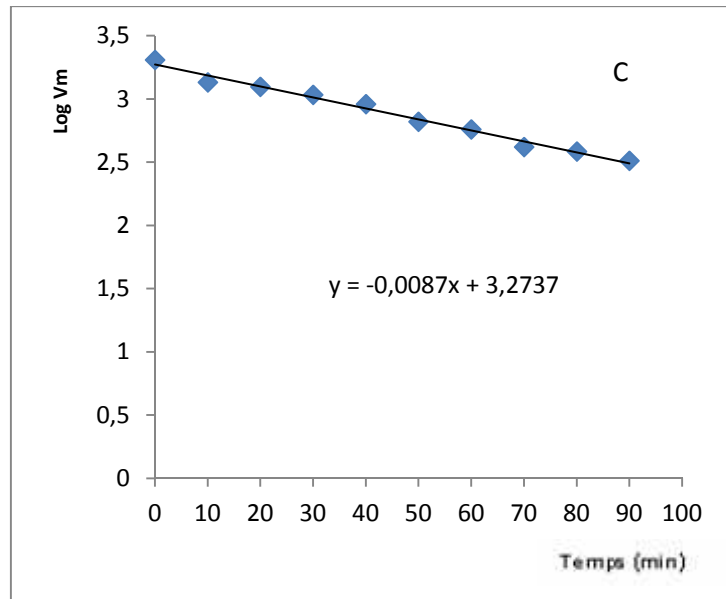
La protéase de *S. hispanicusa* une demi-vie de 38 min et 7 s à 80°C ,60 min et 27 s à 70°C et 77 min et 7s à 60°C. Cette enzyme garde 42% de son activité à 60°C, 27% à 70°C et 15% à 80°C après 90 min d'incubation.





**Figure 25:** Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de *S. maculatus* à : A : 60°C, B: 70°C et C : 80°C.





**Figure 26** : Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de *Scolymus hispanicus* à : A : 60°C, B: 70°C et C : 80°C.

Les profils de la température et de la stabilité de l'enzyme révèlent que les deux enzymes sont thermostables. Il existe plusieurs champs d'application de ces protéases. Par exemple, lorsqu'il est nécessaire d'inactiver sélectivement des protéases après leur action dans un mélange de protéines; de telles enzymes pourraient être de nouveaux outils utiles dans la biologie moléculaire. En outre, La plupart des industries alimentaires telles que la boulangerie et la fabrication du fromage exigent que leurs processus soient portés à des températures autour de 50-60°C ; les protéases acides de *S. maculatus* et *S. hispanicus* servir alors comme agent de transformation des aliments (Sumantha *et al.*, 2006).

En se basant sur le pH optimal et la température optimale, les résultats ont montré la convenance de l'enzyme pour les applications biotechnologiques où des valeurs de température de 45 à 65 °C et du pH de 4 à 5 sont exigées.

## 6. Effet de quelques effecteurs sur l'activité des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

L'effet de quelques inhibiteurs sur l'activité des deux protéases est récapitulé dans le tableau 14. Les deux enzymes sont complètement inhibées par la pepstatine-A à la concentration de 0,01 mM.

D'après ces résultats, on peut conclure que les deux enzymes sont des aspartyl protéases. L'inhibition de l'activité enzymatique indique un changement de conformation de l'enzyme par la pepstatine qui se fixe par liaison covalente au résidu aspartate du site actif; ce qui empêche la fixation du substrat (Viratelle, 1993).

**Tableau 14** : Effet de quelques inhibiteurs sur l'activité protéolytique

		Contrôle	EDTA	Pepstatine-A	Iodoacetamide
<i>Scolymus</i>	10mM	100	99,5	1,5	97
<i>maculatus</i>	1mM	-	99	1	95
<i>Scolymus</i>	10mM	-	98,5	2,5	96
<i>hispanicus</i>	1mM	-	97	2	95

Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Devaraj *et al.* (2008) qui ont travaillé sur une protéase acide du latex de *Ficus racemosa* où l'inhibition est de 100% avec la pepstatine-A.

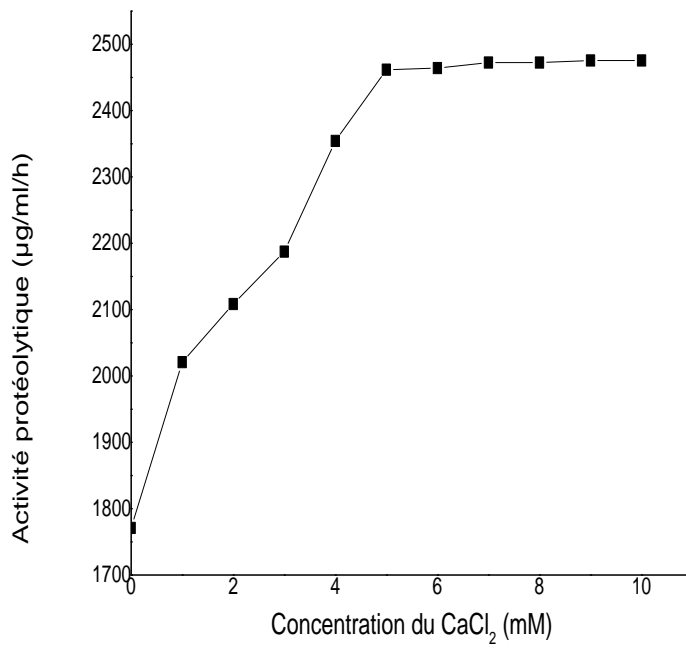
Une forte inhibition a également été observée pour l'aspartyl protéase d'*Acanthium onopordum*, (Brutti *et al.*, 2012), de *C. Calciprata* (Raposo *et al.*, 2008), d'*Aspergillus oryzae* (Vishwanatha *et al.*, 2009) et de *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005).

Les deux protéases conservent pratiquement toute leur activité en présence de l'EDTA et de l'iodoacetamide (activité résiduelle supérieure à 95%); ce qui indique qu'elles n'appartiennent pas au groupe des métalloprotéases.

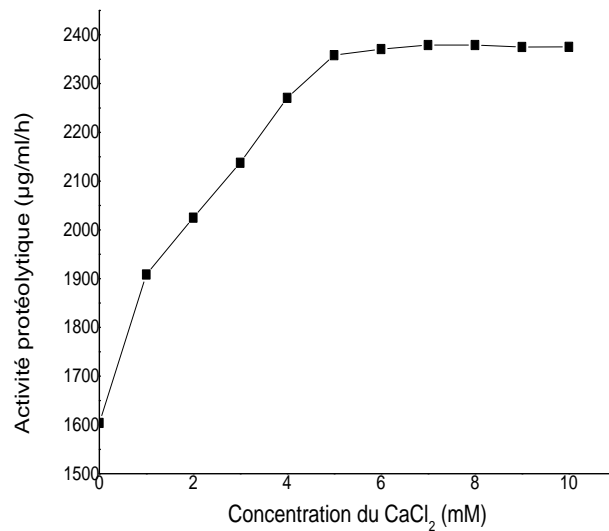
### **7. Effet du calcium sur l'activité protéolytiques des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus***

L'influence des ions calciques sur l'activité protéolytique des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* est montrée dans les figures 27 et 28. Une relation linéaire est observée entre l'activité enzymatique et la concentration  $\text{CaCl}_2$  pour les deux protéases. Le cation divalent  $\text{Ca}^{2+}$  induit l'activité enzymatique qui atteint son niveau maximal à 5 mM.

L'analyse de la variance des résultats montre que la concentration du  $\text{CaCl}_2$  a un effet très significatif sur l'activité enzymatique de la protéase acide des deux espèces ( $p < 0,1$ ).



**Figure 27:** Effet de la concentration du calcium sur l'activité protéolytique de la protéase de *S. maculatus*



**Figure 28:** Effet de la concentration du calcium sur l'activité protéolytique de la protéase de *S. hispanicus*



L'ion  $\text{Ca}^{2+}$  stimule également la protéase produite par *Synergistes sp*, avec une concentration optimale de 5 mM (Kumar *et al.*, 2008).

Les ions calcium modulent les activités d'un large éventail de systèmes biochimiques. Cela s'explique par les nombreuses liaisons qui s'établissent entre les systèmes enzymatiques et les ions, ce qui conduit à l'amélioration de la stabilité des liaisons peptidiques en créant un environnement protecteur contre les facteurs extérieurs (Sharma *et al.*, 1998).

### 8. Effet des ions métalliques sur l'activité protéolytique des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

Les effets de divers ions métalliques sur l'activité des aspartyl protéases des deux plantes sont présentés en figure 29. Celle-ci est affectée par  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  avec une augmentation de plus de 20% et de 10% pour les deux ions respectivement.

Les ions  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et de  $\text{Hg}^{2+}$  engendrent une diminution de l'activité respectivement de 40%, 45% et 50% chez *S. maculatus*, et de 50%, 65% et 60% chez *S. hispanicus*. Le  $\text{Mn}^{2+}$ , et  $\text{Mg}^{2+}$  n'ont eu aucun effet sur l'activité protéolytique.

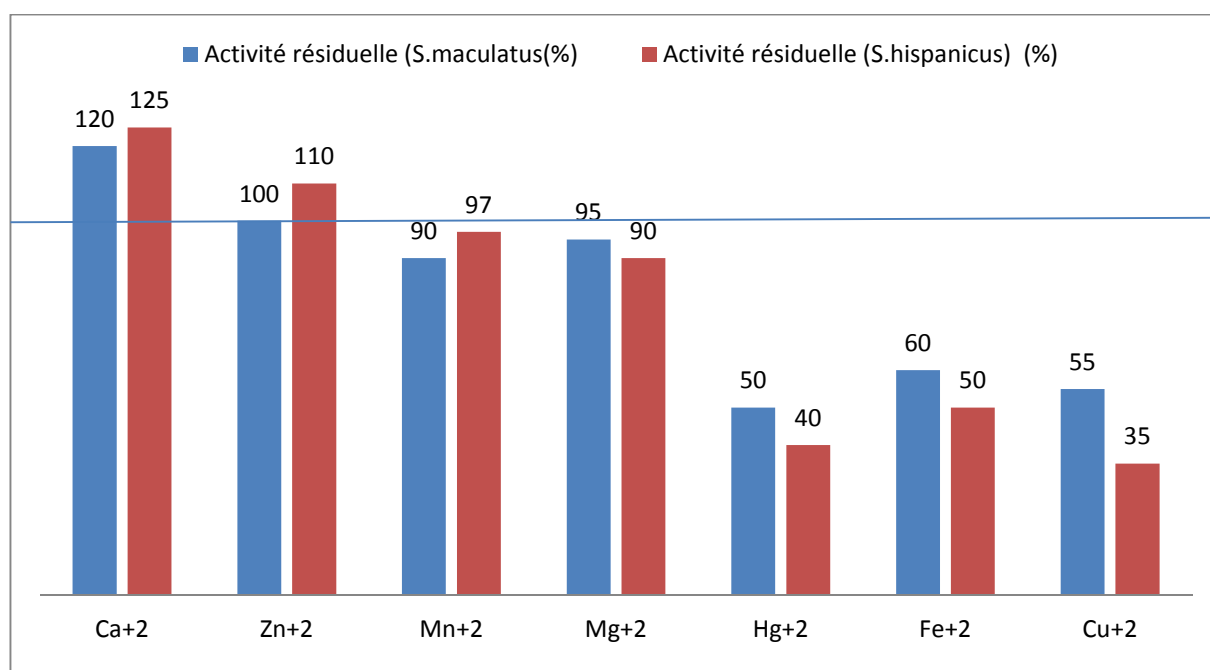


Figure 29: Effet de quelques ions métalliques sur l'activité protéolytique

Des résultats similaires sont obtenus pour la protéase acide de *Cryptococcus sp.* Dans ce cas l'activité protéolytique est légèrement inhibée par le  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , et  $\text{Hg}^{2+}$  tandis que  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  n'ont aucun effet. La  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  activent légèrement la protéase (Rao *et al.*, 2011).

L'effet de ces ions diffère chez la protéase de *Sardinella aurita* où l'activité protéolytique est légèrement activée par le  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . L'addition du  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Hg}^{2+}$  provoque pour sa part une diminution de l'activité de 50%, 50% et 60%, respectivement (Benkhaled *et al.*, 2011).

Chapitre 5:  
Résultats des  
propriétés  
technologiques des  
protéases extraites

## Chapitre 5. Résultats des propriétés technologiques des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus*

Les protéases extraites de *S. maculatus* et de *S. hispanicus* à pH 5,5 et pH 8 sont testées pour leurs activités coagulantes, détergentes, anticoagulantes et en tannerie.

### 1. Application des protéases acides dans la coagulation du lait

#### 1.1. Mesure de l'activité coagulante

L'effet des protéases extraites à partir de *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus* sur le lait de vache frais et le lait écrémé UHT est reporté dans le tableau 15.

**Tableau 15:** Comparaison entre le temps de coagulation du lait de vache frais et UHT écrémé.

Espèces	Temps de coagulation (min)	
	Lait frais	Lait UHT
<i>Scolymus maculatus</i>	7	15
<i>Scolymus hispanicus</i>	10	20

D'après le tableau, on remarque que le lait frais coagule plus vite que le lait UHT. La stérilisation à haute température du lait a entraîné des temps de coagulation plus élevés dû probablement à une dénaturation des caséines du lait sous l'effet de la chaleur.

Les temps de coagulation, les activités coagulantes et les forces coagulantes des protéases obtenues après chaque étape de purification sont reportés sur le tableau 16.

**Tableau 16:** Temps de coagulation, activité coagulante et force de coagulation des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* sur le lait de vache UHT.

Espèces	Etape de purification	Temps de coagulation (min)	Activité coagulante (UP/ml)	Force de Sohxlet
<i>Scolymus maculatus</i>	Extrait brut	37	0,045	10,01
	Après précipitation	15	0,111	24,69
	Après gel filtration	10	0,166	37,03
<i>Scolymus hispanicus</i>	Extrait brut	48	0,034	7,71
	Après précipitation	17	0,098	21,78
	Après gel filtration	14	0,119	26,45

Les mesures effectuées montrent que le temps de floculation diminue au fur et à mesure avec la purification. C'est le cas pour les protéases des deux plantes, où le temps de coagulation diminue de plus de 50% du temps après précipitation par le sulfate d'ammonium. Le même effet est observé dans le cas des protéases coagulant le lait de *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus tubendensis* et *Aspergillus flavus* (Benlounissi, 2012).

### 1.2. Comparaison de l'action des protéases acides avec la présure

La protéase extraite à partir de *Scolymus maculatus* coagule le lait en 15 minutes à 30°C (**fig.30**). Les protéines du lait s'agrègent et forment un caillé ferme brillant jaunâtre et un sérum limpide de couleur jaune.



**Figure 30:** *S. maculatus*; aspect du caillé après coagulation.

La même observation est obtenue pour la protéase extraite à partir de *Scolymus hispanicus* (**fig.31**) où la coagulation se fait après 20 min d'incubation. Le lait coagule de façon homogène laissant apparaître un caillé et un sérum jaunâtres.



**Figure 31:** *S. hispanicus* ; aspect du caillé après coagulation.

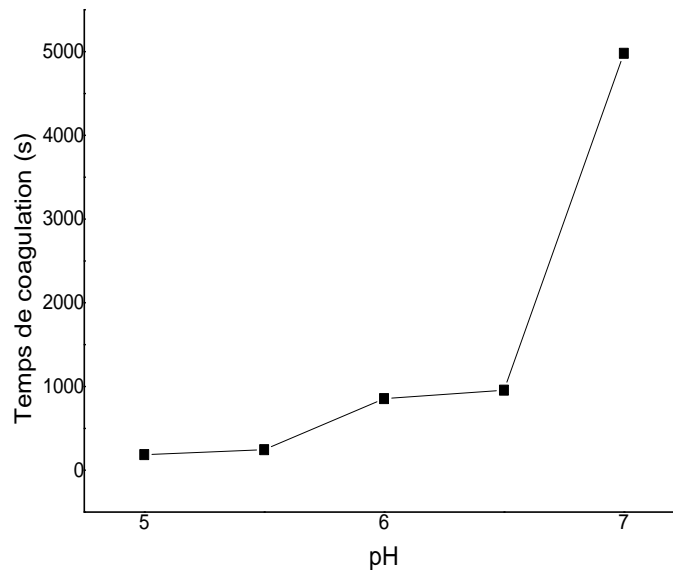
La présure commerciale donne un caillé ferme brillant de couleur blanche ainsi qu'un sérum claire blanchâtre (**fig. 32**).



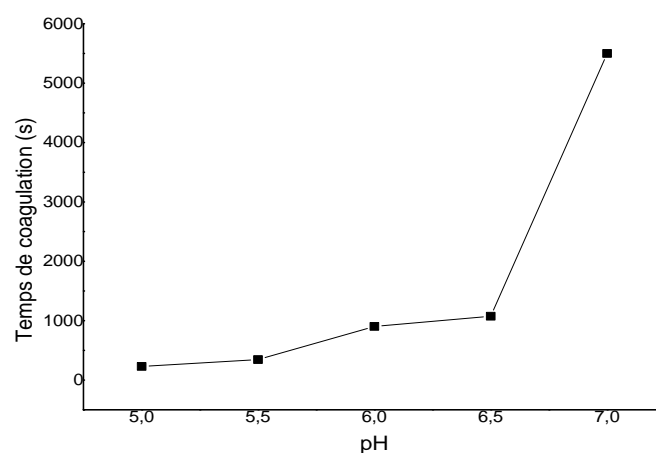
**Figure 32:** Présure commerciale ; aspect du caillé après coagulation.

### 1.3. Influence de pH sur le temps de floculation du lait

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la protéase de *S. maculatus* et celle de *S. hispanicus* est étudié en ajustant le pH du lait aux valeurs de l'intervalle 5,5 à 7. La température d'incubation est fixée à 30 °C. Les figures 33 et 34 montrent l'effet du pH sur l'activité coagulante des deux enzymes.



**Figure 33 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir de *S. maculatus* en fonction du pH.



**Figure 34 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir de *S. hispanicus* en fonction du pH.

L'abaissement du pH s'accompagne d'une diminution du temps de floculation. Cependant, l'importance de cette variation n'est pas la même selon l'intervalle de pH considéré.

Les résultats montrent que le pH 5 représente le pH optimal pour l'activité des deux extraits protéolytiques. L'analyse statistique indique que l'effet de ce paramètre sur le temps de floculation n'est pas significatif pour les deux extraits coagulants. Les protéases acides de *S. maculatus* et *S. hispanicus* agissent comme la présure qui agit fortement dans la gamme acide (Richardson *et al.*, 1967; Mohanty *et al.*, 2003).

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Castillo *et al.* (2000a), par Kumar *et al.* (2005) pour la protéase de *R. oryzae*, par Awad (2007) et par Merheb-Dini *et al.* (2010) pour les protéases de *Thermomucor indicae-seudaticae*. Dans le cas de la protéase de *Cynara scolymus*, *Brassica napus*, les auteurs ont trouvé une forte diminution de la MCA à pH 7 (Chazarra *et al.*, 2007 ; El-Sayed *et al.*, 2013).

Contrairement à ces résultats, El-Bendary *et al.* (2007) ont trouvé un pH optimal entre 6 et 7,3.

Ces résultats montrent la sensibilité de l'influence du pH du lait sur le temps de floculation. Celui-ci devient plus court lorsque le pH du lait est abaissé au dessous de sa valeur normale dans le lait. Selon Ramet (2001), les enzymes coagulantes de fromagerie sont des protéases à caractère acide (pHi proche de 5,5). La caséine Kappa présente un maximum de stabilité dans l'intervalle de pH 5-6 et un pH optimum d'hydrolyse par la présure entre 5.1 et 5.3, ce qui permet la déstabilisation des micelles de caséines (Nagera *et al.*, 2003).

L'effet du pH sur l'activité coagulante est mis à profit en fromagerie. En effet, l'emploi du lait légèrement acidifié, lorsque le type de fromage le permet, est recommandé pour réduire la quantité d'enzyme utilisée (Grenn *et al.*, 1984). L'effet de l'acidification du lait sur les propriétés du gel formé doit être pris en considération.

Cependant, si l'abaissement du pH augmente l'activité coagulante de ces protéases, il aura un effet comparable sur leur activité protéolytique au cours de la maturation et de l'affinage du fromage, notamment pour certains types de fromage pour lesquels les valeurs du pH sont relativement abaissées au cours des étapes de fabrication.

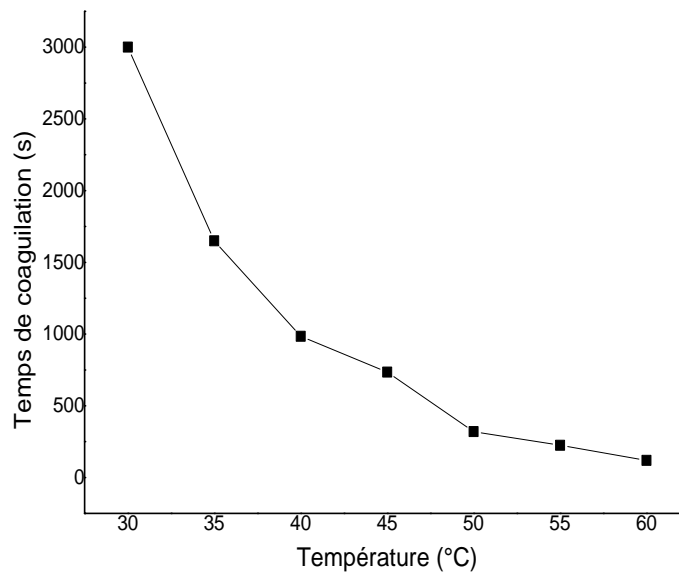


#### 1.4. Influence de la température sur le temps de floculation du lait

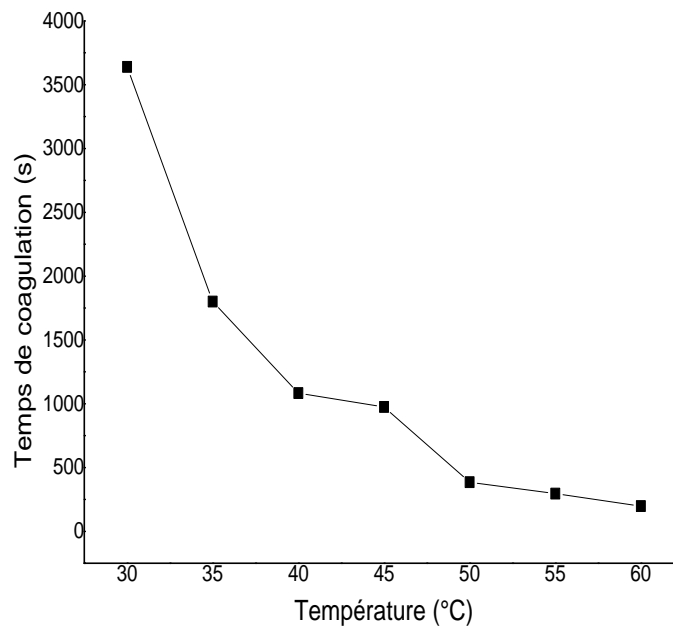
L'effet de la température sur la coagulation est étudié entre 30°C et 60°C. Il ressort des figures 35 et 36 que la MCA des deux protéases varie avec la température et que cette activité est à son optimum vers 60°C et ce quelque soit l'extrait coagulant.

En effet, une diminution très significative ( $P < 0.01$ ) de l'ordre de 45 et 50% est enregistrée en augmentant la température de 30 à 40°C respectivement pour *S. maculatus* et *S. hispanicus*, alors que le passage de la température de 40 à 50°C s'accompagne d'une diminution d'environ 30%.

Bien que des changements dans l'équilibre des sels soient impliqués, le facteur responsable de l'augmentation du temps de coagulation du lait chauffé est le complexe formé entre la  $\kappa$ -caséine et la  $\beta$ -lactoglobuline ou une lactalbumine (Balcones *et al.*, 1996).



**Figure 35 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. maculatus* en fonction de la température.



**Figure 36:** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. hispanicus* en fonction de la température.

Les mêmes résultats sont rapportés pour la protéase de *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005) pour la protéase de *C. scolyms* (Chazarra *et al.*, 2007) et pour la protéase de *Brassica napus* (El-Sayed *et al.*, 2013).

Le maximum de l'activité coagulante est enregistré à une température du lait plus élevée (65°C) pour les protéases de *Bacillus. Subtilis*, *Bacillus. megaterium* (Shehata *et al.*, 1996), *Bacillus sphaericus* (El Bendary *et al.*, 2007) et *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Merheb *et al.*, 2010).

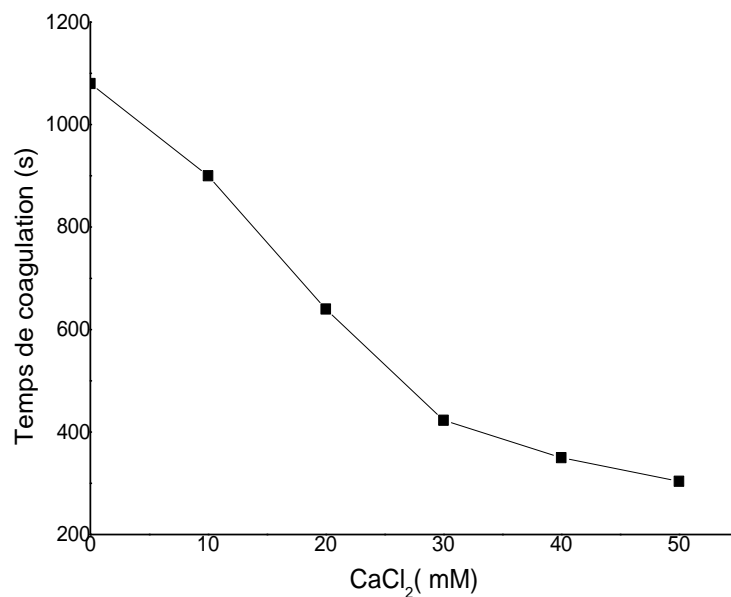
L'effet de la température résulte de la conjugaison de deux effets, l'un sur la réaction enzymatique, et l'autre sur la phase secondaire de la coagulation et qui correspond à l'étape de l'agrégation. En effet, la coagulation de lait ne peut avoir lieu qu'à des températures supérieures ou égales à 18°C. Cela est dû à l'importance des interactions hydrophobes dans l'agrégation des micelles hydrolysées (Lucey, 2002).

En fromagerie, l'effet favorable de la température sur l'activité coagulante des enzymes peut être mis en profit lorsque les conditions de coagulation le permettent. Ce qui entraîne une réduction de la quantité d'enzyme ajoutée et par conséquent, l'activité protéolytique ultérieure.

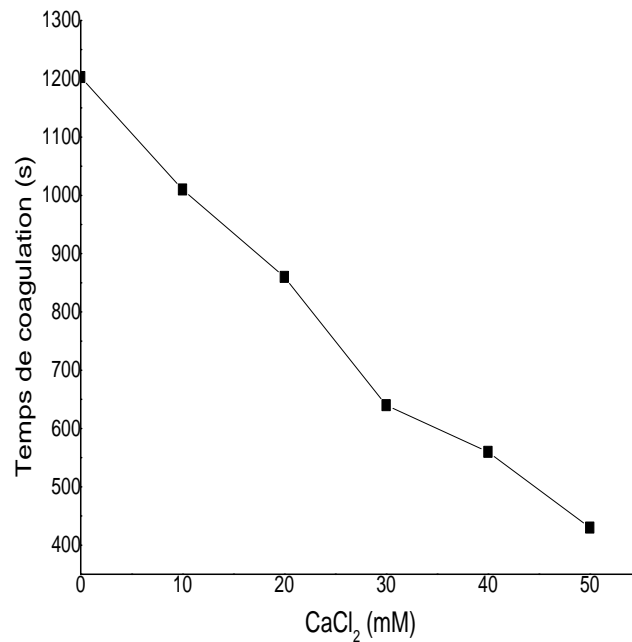
Sur la base des résultats du pH et de la température nous préconisons une température optimale de 60°C et un pH de 5 pour une meilleure activité des préparations enzymatiques extraites de *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus*.

### **1.5. Influence de la concentration du CaCl<sub>2</sub> sur le temps de floculation du lait**

Les variations du temps de coagulation du lait de vache UHT en fonction de différentes concentrations de CaCl<sub>2</sub>, enregistrées pour les deux extraits coagulants sont illustrés sur les figures 37et 38.



**Figure 37 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. maculatus* en fonction de la concentration des ions calcium.



**Figure 38 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. hispanicus* en fonction de la concentration des ions calcium.

Il apparaît que le temps de floculation est influencé par la variation des concentrations en chlorure de calcium rajouté, il est inversement proportionnel à ces dernières. Il ressort de ces tendances que la concentration optimale de  $\text{CaCl}_2$  qui donne le temps le plus court est de 0,05 M et cela, avec les deux extraits. L'analyse statistique a montré que l'effet était significatif ( $p$  0,005 pour *S. hispanicus* et 0,001 pour *S. maculatus*).

Étant donné que le pH est ajusté après l'ajout de calcium, les variations observées avec la concentration de calcium devraient être liées à un effet direct sur les taux d'agrégation et raffermissant (Castillo *et al.*, 2002b).

Un comportement similaire est rapporté par plusieurs auteurs, entre autres Sidrach *et al.* (2005) pour la cynarase A, Vairo-Cavalli *et al.* (2005) pour la protéase de *Sylibum marianum* (40 mM), Nouani *et al.* (2009) pour les protéases de *Ficus carica*, Chazarra *et al.* (2007) pour la protéase de *Cynara scolymus*, Corrons *et al.* (2012) pour la protéase de *Maclura pomifera* et El-Sayed *et al.* (2013) pour l'aspartyl protéase de *Brassica napus*. C'est aussi le cas de la protéase extraite à partir des fruits de *Bromelia hieronymi* (Bruno *et al.*, 2010) et des fleurs de *Moringa oleifera* (Emmanuel *et al.*, 2012).

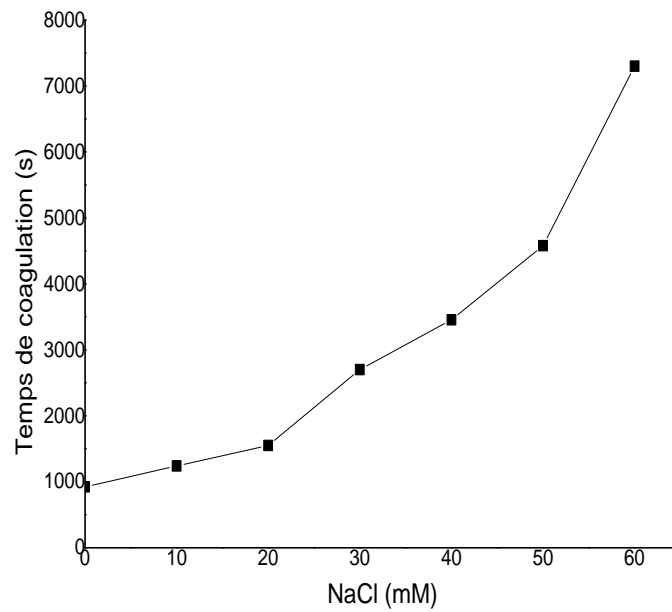
La présence de calcium ionisé est indispensable à l'accomplissement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit, après la protéolyse spécifique de la k caséine par l'enzyme, à l'agrégation des micelles pour former un réseau constituant le coagulum. La teneur en calcium a un effet important sur le temps de coagulation et sur la consistance du gel obtenu, il entraîne un raccourcissement très marqué du temps de coagulation et renforce la fermeté des gels (Ramet, 1994).

L'addition du  $\text{CaCl}_2$ , pratique courante dans l'industrie des fromages, permet également de corriger les aptitudes à la coagulation de certains laits. En effet, l'action synergique du  $\text{Ca}^{+2}$  et d'un pH bas est indispensable au déroulement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit après hydrolyse de la Cn à la coagulation par association des micelles par l'entremise des interactions hydrophobes (Lenoir *et al.*, 1997).

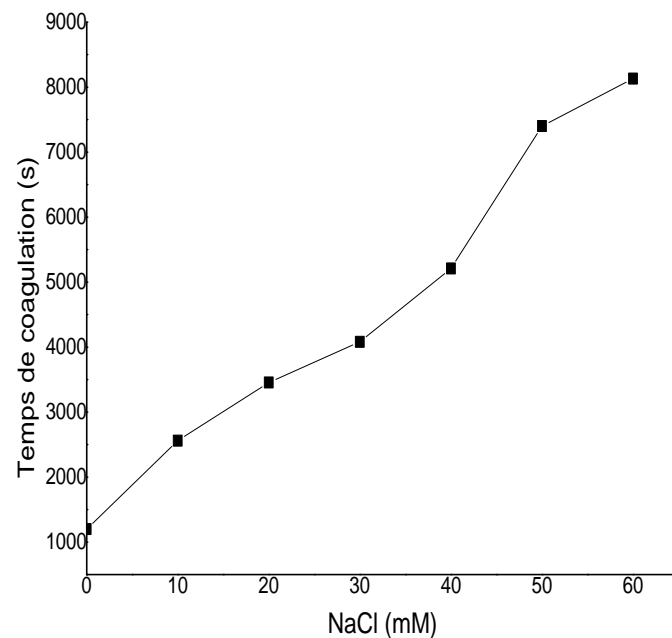
### **1.6. Influence de la concentration de NaCl sur le temps de floculation du lait**

En fromagerie, Le lait est parfois salé par le chlorure de sodium traditionnellement pour contrôler la croissance de la microflore. Le chlorure de sodium est utilisé dans la fabrication des fromages entre autre le Domiati et Gibna Bayda en Egypte.

L'effet de la concentration du chlorure de sodium sur le temps de coagulation est illustré sur les figures 39 et 40. Les graphes montrent une que le temps de coagulation est proportionnel avec la concentration du NaCl. La MCA atteint le zéro à une concentration de 60mM. L'effet de chlorure de sodium à ces concentrations sur la MCA est significatif ( $p=0,01$  pour *S. maculatus* et  $p=0,002$  pour *S. hispanicus*).



**Figure 39:** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. hispanicus* en fonction de la concentration du sodium.



**Figure 40 :** Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *S. hispanicus* en fonction de la concentration du sodium.

Ces résultats sont en accord avec ceux de la coagulation avec d'autres coagulases où le temps de coagulation augmente avec des quantités croissantes de NaCl (Vairo-Cavalli *et al.*, 2005; Awad, 2007; El-Bendary *et al.*, 2007). C'est aussi le cas des protéases coagulantes extraites d'*Onopordum turcicum* (Tamer, 1993) et de *Brassica napus* (El-Sayed *et al.*, 2013).

L'addition de NaCl au lait favorise la dissociation de calcium et du phosphate au sein de micelles de caséine et en solution (Gaucheron *et al.*, 2000) et du coup l'augmentation du temps de coagulation. Cela pourrait être un avantage pour certains types de fromage au cours de leur maturation comme aucune inactivation complète n'est effectuée, mais une faible activité protéolytique peut être maintenue pour des caractéristiques organoleptiques requises ciblées.

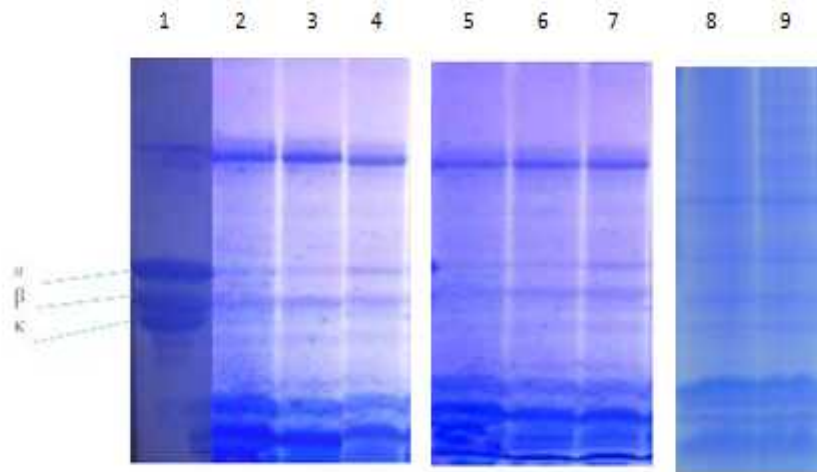
Il est bien connu que le NaCl influence l'affinage du fromage, mais il a probablement des effets plus spécifiques, tels que le contrôle de la croissance et l'activité microbiennes, le contrôle des différentes activités enzymatiques dans le fromage, la synérèse du caillé. Ces facteurs entraînent donc à une réduction de l'humidité du fromage et de ses changements physiques dans les protéines du fromage, ce qui influence la texture des fromages, la solubilité des protéines et probablement la conformation des protéines (Guinée et Fox, 2004).

### **1.7. Action des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* sur les caséines**

Après la caractérisation des protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus*, leur effet sur la dégradation des caséines, et est étudié afin d'évaluer leur potentiel d'utilisation comme substitut de la présure. L'action des enzymes a été réalisée comparativement avec la présure commerciale par les méthodes électrophorétique et HPLC.

### 1.7.1. Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse

Les résultats de la dégradation des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  par les protéases des deux plantes caractérisée par électrophorèse sont représentés dans les figures 41 et 42.

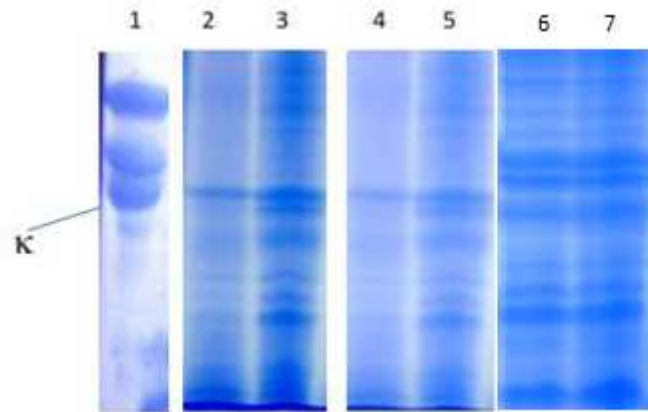


**Figure 41:** Analyse électrophorétique de la dégradation des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  par les protéases après 30,60 et 120 min de digestion.

1: caséine entière ; 2- 4 : hydrolyse par la protéase extraite à partir de *Scolymus maculatus*  
5- 7 : hydrolyse par la protéase extraite à partir de *Scolymus hispanicus* ; 8 - 9 : hydrolyse par la présure commerciale (30 et 120 min).

Les électrophorégrammes en fig. 41 montrent une plus grande mobilité de la caséine  $\kappa$ , suivie de la caséine  $\beta$ , puis de la caséine  $\alpha$ . Les résultats de l'hydrolyse des caséines par les protéases des deux plantes indiquent une hydrolyse importante de ces caséines se traduisant par une diminution de leurs teneurs et l'apparition de nouvelles bandes à mobilité élevée. Les deux enzymes montrent donc leur capacité de digestion des trois types caséine avec une dégradation complète de la fraction de  $\kappa$ . Les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  sont dégradées au bout de 30 min, tandis que la caséine  $\kappa$  n'est dégradée qu'après 60 min. Il est à noter une augmentation de l'intensité des bandes d'hydrolyse jusqu'à 120 min d'incubation. Les deux protéases donnent des profils de dégradation similaires à celui de la présure commerciale.





**Figure 42:** Dégradation de la caséine  $\kappa$  par les protéases après 5 et 120 min d'incubation.

1: caséine totale; 2- 3: hydrolyse de la caséine par la protéase de *Scolymus maculatus*; 4 - 5 : hydrolyse de la caséine par la protéase de *Scolymus hispanicus*; 6-7 : hydrolyse de la caséine par la présure commerciale.

Le profil électrophorétique de la dégradation de la  $\kappa$ -caséine (**fig. 42**) par les protéases de *S. maculatus* et de *S. hispanicus* indique un comportement de dégradation similaire à celui de la présure. La dégradation a commencé après 5 min de réaction.

La dégradation des autres fractions de caséine est relativement faible; elle permet de garantir une production et une formation de caillots stables en peu de temps; un comportement pouvant présenter un intérêt dans l'industrie fromagère.

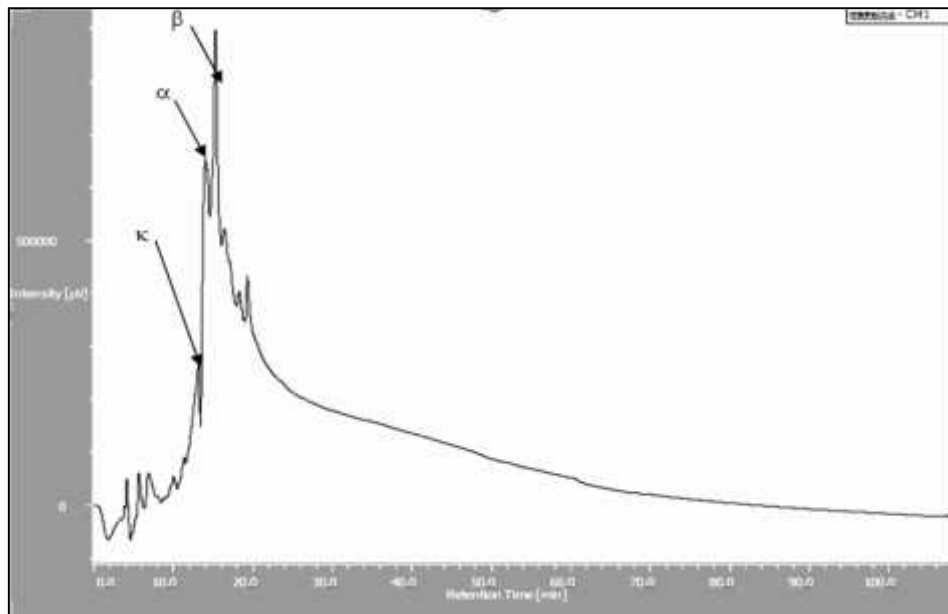
La  $\kappa$ -caséine a été moins susceptible à la protéolyse que l' $\alpha$ -caséine ; ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les extraits de *Centaurea calcitrapa* (Tavaria *et al.*, 1997) et de *Cynara cardunculus* (Silva *et al.*, 2002), la bromélaïne (Bruno *et al.*, 2010), les protéases d'*Onopordum acanthium* L. (Brutti *et al.*, 2012) et de *Cynara scolymus* (Chazarra *et al.*, 2007). Un comportement similaire a également été observé pour *T. aurantiacus*, étudié par Merheb *et al.* (2010) qui ont noté une hydrolyse importante des fractions de caséine après 60 min. Plusieurs protéases végétales utilisées dans la production de fromages traditionnels possèdent un schéma de dégradation similaire avec celui de la présure. Les extraits de *Cynara* sont utilisés principalement dans la fabrication artisanale de divers fromages espagnols et portugais préparés à partir de lait de brebis (Roseiro *et al.*, 2003).

La cinétique de l'hydrolyse des  $\alpha$  et  $\beta$ -caséines ovines par l'extrait de fleurs de *Sylibum marianum* montre que l' $\alpha$ -caséine est dégradée plus rapidement et plus largement que la  $\beta$ -caséine (Vairo Cavalli *et al.*, 2008).

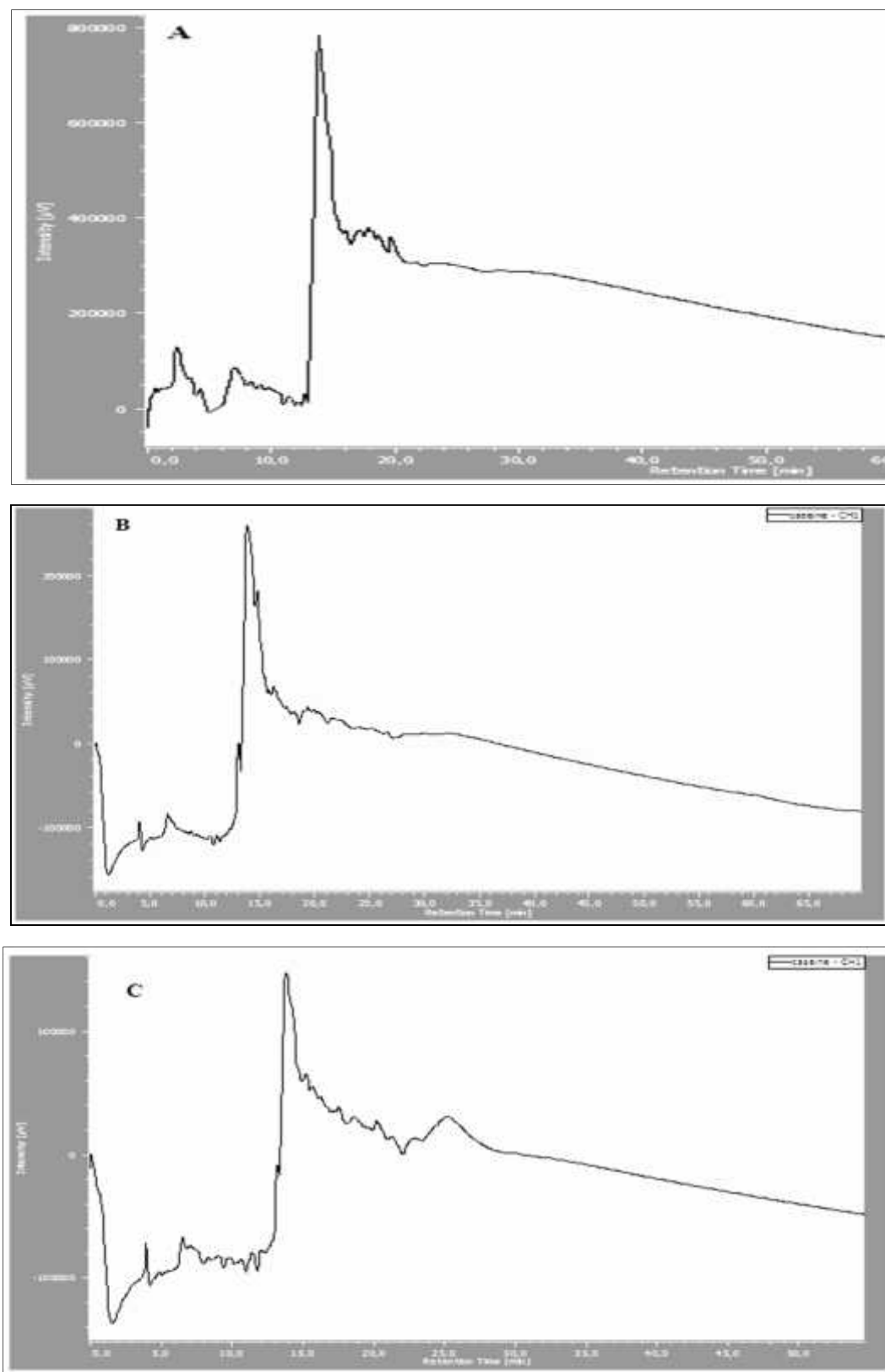
La protéase microbienne de *Rhizopus miehei* possède une faible activité sur la caséine ovine par rapport à différents types de coagulants commerciaux (Tro et al. (2000), la dégradation de la caséine ne débute qu'après 60 min d'incubation et une grande quantité de caséines reste intacte jusqu'à 24 h.

### 1.7.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC

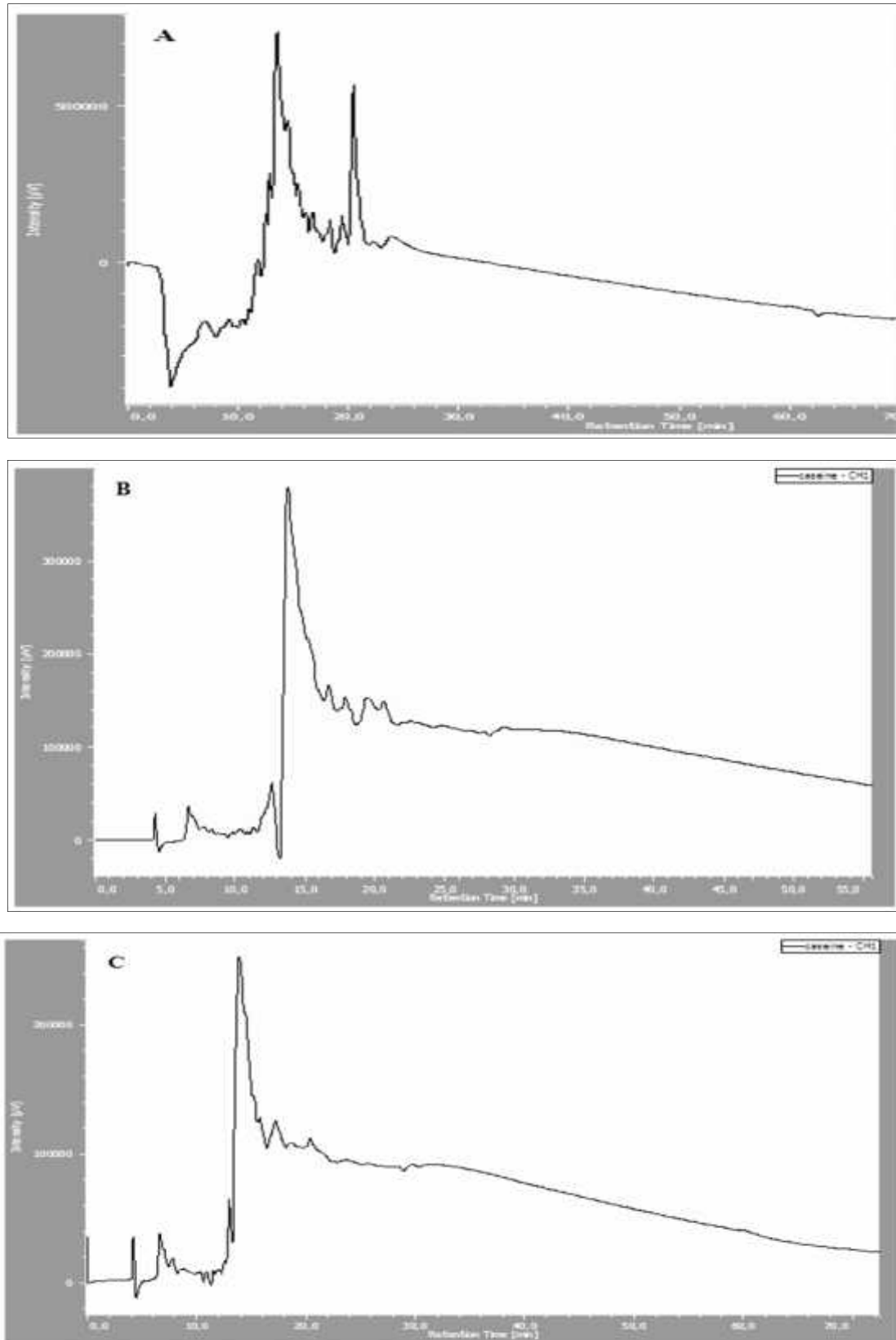
La possibilité d'application industrielle de l'enzyme peut être évaluée par la capacité d'hydrolyse des fractions de caséine. La séparation par HPLC de la caséine totale et de ses produits de dégradation par les extraits protéolytiques et la présure a permis d'obtenir les profils de chromatographie présentés dans les figures 43 à 46.



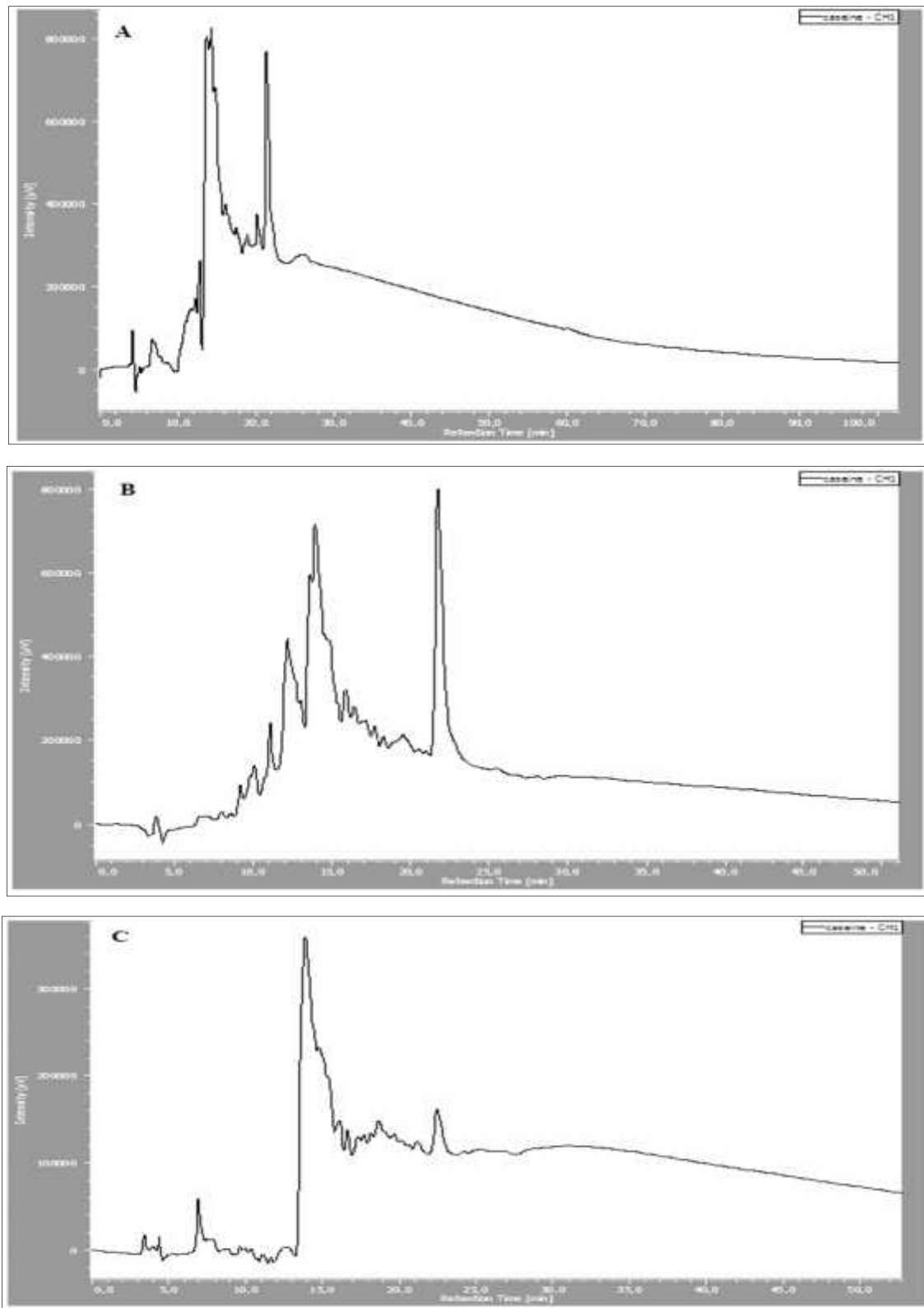
**Figure 43:** Profil d'élution des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . (20 mg/mL) par RP-HPLC. Débit de 0,7 mL/min par 0,06 % de TFA/méthanol.



**Figure 44:** Profil d'éluion des hydrolysats des différentes caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ -caséine (20 mg/ml) par RP-HPLC traitées par la présure commerciale, après 5 minutes (A), 90 minutes (B) et 24 heures (C). Débit de 0,7 mL/min par 0,06 % de TFA/méthanol.



**Figure 45:** Profil d'éluion des hydrolysats des différentes caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ -caséines (20 mg/ml) par RP-HPLC traitées par la protéase extraite à partir de *S. maculatus*, pendant 5 minutes (A), 90 minutes (B) et 24 heures (C). Débit de 0,7 mL/min par 0,06 % de TFA/méthanol



**Figure 46:** Profil d'éluion des hydrolysats des différentes caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  -caséine (20 mg/ml) par RP-HPLC traitées par la protéase extraite à partir de *S. hispanicus*, pendant 5 minutes (A), 90 minutes (B) et 24 heures (C). Débit de 0,7 mL/min par 0,06 % de TFA/méthanol

D'après les résultats, on constate que le profil de fragments peptidiques formés par l'action des extraits enzymatiques de *S. maculatus* (**fig. 45**) et de *S. hispanicus* (**fig. 46**) présentent des similarités, en particulier dans la plage 10-25 min, où un total de 5 sommets peut être observé. Par ailleurs, les enzymes ont complètement dégradé la  $\kappa$ -caséine après 5 minutes d'hydrolyse. La comparaison entre les protéases des deux plantes montre une meilleure activité de la protéase de *S. hispanicus*, ce qui se traduit par une meilleure dégradation des différentes caséines dès 5 min d'incubation. Ainsi, les deux profils représentent un bon indicateur des compositions peptidiques.

D'autre part, les caséines  $\alpha$  et  $\beta$  sont moins hydrolysées par les protéases de *S. maculatus* et *S. hispanicus* (**fig. 45B et 46B**). Ces dernières subissent une hydrolyse partielle même après 90 min. Après 24 h d'hydrolyse, des quantités infimes de  $\alpha$ -CN sont encore détectées (**fig.45C**) alors qu'une quantité importante de  $\beta$ -caséine est toujours présente.

L'activité de la présure commerciale présente de son côté des chromatogrammes similaires à ceux des autres protéases acides mais avec une différence des quantités des hydrolysats (**fig.44**). Les  $\alpha$ -CN et  $\beta$ -CN apparaissent moins sensibles à l'action de la chymosine que de celle des extraits de protéines de fleurs de *S. maculatus* et *S. hispanicus*.

Le comportement hydrolytique des protéases étudiées est similaire à celui d'autres protéases végétales, particulièrement celles de *C. cardunculus* (Sousa et Malcata, 1997) et de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Merheb-Dini *et al.*, 2010).

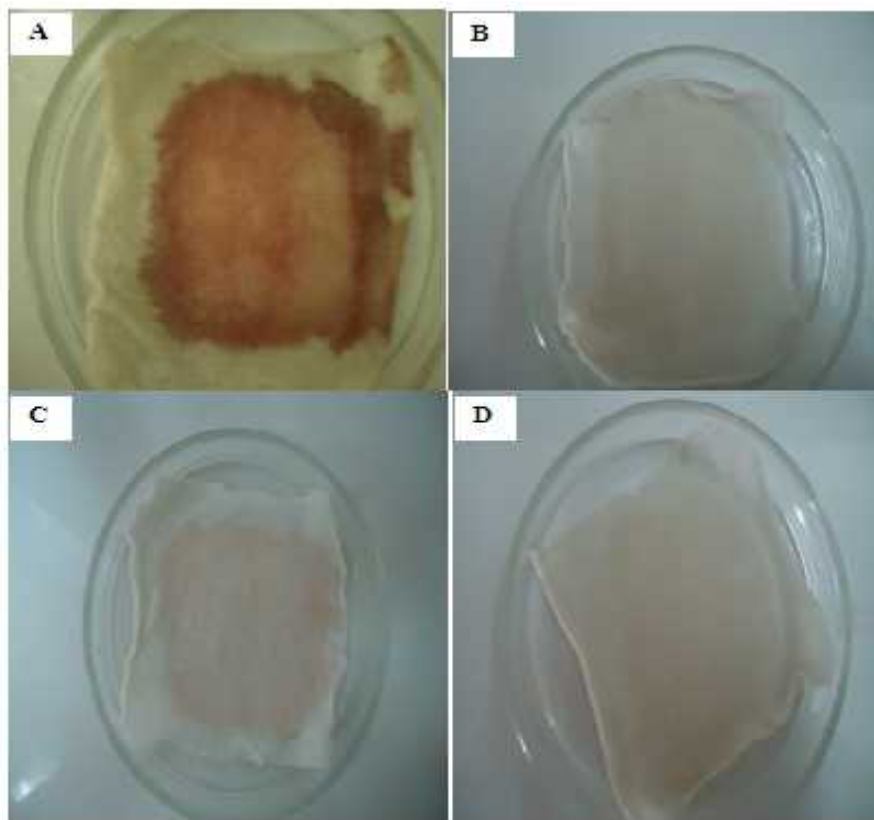
Beaucoup de protéases d'origine végétale sont étudiées comme substituts adéquats de la présure dans la fabrication du fromage, mais généralement ils présentent une forte activité protéolytique, ce qui provoque une amertume des fromages après l'affinage. Ce phénomène s'explique par une action du coagulant résiduel sur les séquences hautement hydrophobes de la caséine, principalement la fraction  $\beta$ , ce qui conduit à la formation de peptides très hydrophobes (Sousa *et al.*, 2001). Par contre, les deux protéases étudiées, agents de coagulation du lait utilisés traditionnellement en Algérie (Androuët, 2002), présentent des profils peptidiques proches de ceux de la présure, ce qui encourage à leur application comme substituts de meilleure qualité et disponibles localement.

## 2. Autres applications

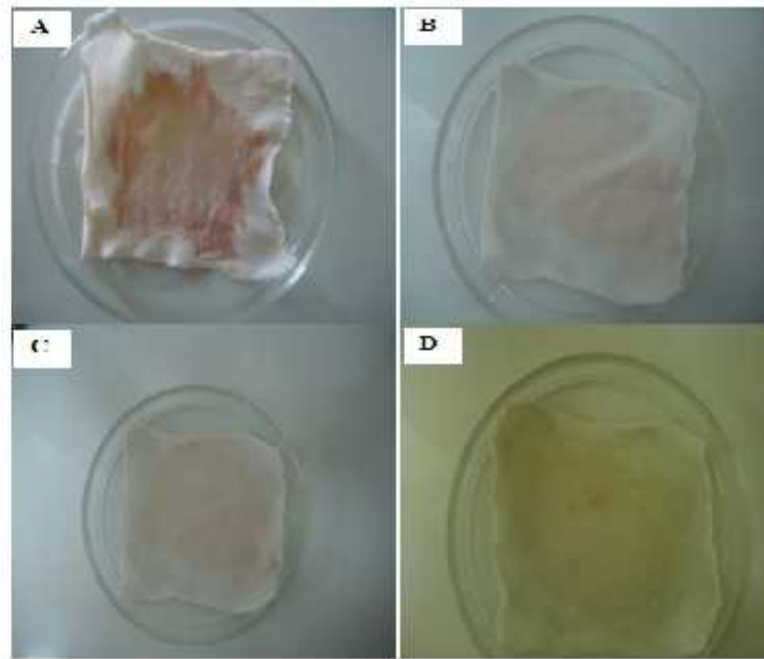
Une extraction des protéases à partir de *S. maculatus* et *S. hispanicus* à pH 8 dans le but de tester des activités protéolytiques neutres et alcalines pour des éventuelles applications autres que la coagulation du lait : activité détergente, anticoagulante et en tannerie.

### 2.1. Test de lavage

L'utilisation la plus importante industriellement est l'activité détergente. Pour cela, les extraits protéolytiques des deux plantes sont appliqués sur des morceaux de coton tachés de sang. Les résultats sont présentés dans les figures 47 et 48.



**Figure 47:** Tests de lavage par la protéase extraite à partir de *S. maculatus* .  
A : eau distillée, B : eau distillée + détergent, C : eau distillée + extrait enzymatique, D : eau distillée + détergent + extrait enzymatique.



**Figure 48:** Tests de lavage par la protéase extraite à partir de *S. hispanicus*  
A : eau distillée, B : eau distillée + détergent, C : eau distillée + extrait enzymatique, D : eau distillée + détergent + extrait enzymatique

Dans le cas où les pièces de coton sont imbibées d'eau distillée (**fig. 47A et 48A**), on observe des traces de sang légèrement diminuées par l'action de l'eau, tandis que dans le 2ème et le 3ème cas, avec l'eau distillée et le détergent (**fig. 47B et 48B**) puis l'eau distillée et l'extrait enzymatique (**fig. 47C et 48C**), la tache de sang diminue fortement. Par contre, aucune trace de sang n'est observée dans le 4ème cas où on a mis le mélange d'eau distillée plus le détergent et l'extrait enzymatique (**fig. 47D et 48D**), on obtient une disparition complète de la tache de sang, ce qui indique un nettoyage total. Cette activité indique que l'extrait enzymatique des deux plantes n'a pas été dénaturé par les mélanges utilisés.

Les mêmes résultats ont été obtenus par Najafi *et al.* (2005) ; Aftab *et al.* (2006) ; Abidi *et al.* (2008) et Nadeem *et al.* (2008).

On conclue que les extraits protéolytiques des fleurs de *S. maculatus* et *S. hispanicus* ne sont pas seulement stable en présence de détergent, mais elle donne un excellent résultat de lavage. On peut la considérer comme un candidat potentiel pour l'utilisation dans les détergents industriels (El-Hadj Ali *et al.*, 2011).

## 2.2. Digestion des protéines naturelles

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

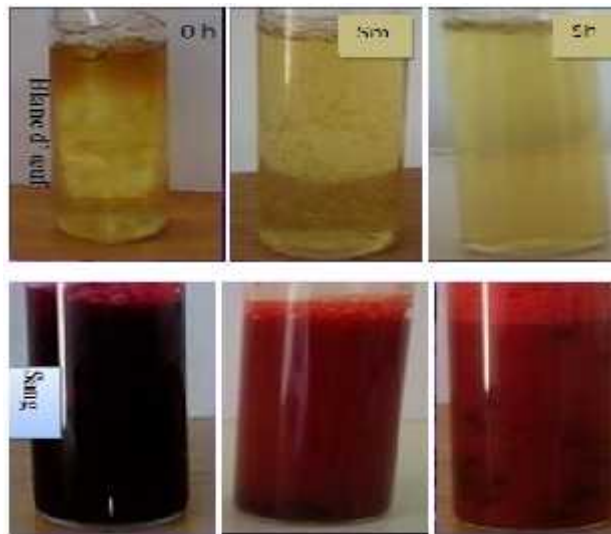


### 2.2.1. Activité digestive

Après l'incubation du blanc d'œuf avec les extraits enzymatiques des deux plantes on observe une solubilisation rapide de cette protéine. Les résultats deviennent visibles dès 2 h d'incubation ; après 12 h, la solution devient limpide (**fig. 49**). Ces protéases peuvent agir donc comme un digestif. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Abidi *et al.* (2008) et Sen *et al.* (2011).

### 2.2.2. Activité pharmaceutique

L'incubation des extraits enzymatiques des deux plantes avec du sang coagulé, on observe un éclaircissement de la couleur du mélange après 2 h, indiquant une hydrolyse du sang d'incubation qui s'accroît après 12h (**fig. 49**). Ces protéases réagissent donc comme un anticoagulant comme montré pour les protéases de *Botrytis cinerea* et *Bacillus psidofirmus* SVBI (Abidi *et al.*, 2008 et Sen *et al.*, 2011).



**Figure 49:** Digestion des protéines naturelles.

### 2.3. Test de tannerie

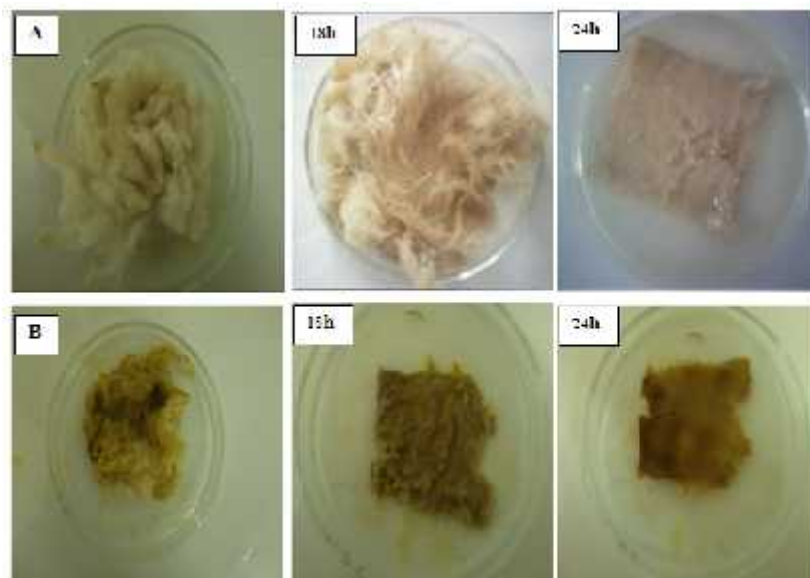
L'action des extraits enzymatiques sur des pièces de peau de brebis et de vache est présentée dans les figures 63 et 64. Après 3 h d'incubation à 45°C, on observe une épilation totale de la peau de vache dans le cas des deux extraits enzymatiques. Pour la peau de brebis; on observe peu d'épilation même après 18 h d'incubation. Un meilleur résultat a pu être obtenu seulement après 24 h d'incubation (**fig. 50, 51**). Ces activités indiquent que ces enzymes

possèdent une activité kératinolytique. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs (Sudhir *et al.*, 2009 ; Haddar *et al.*, 2011).

Les protéases étudiées pourraient donc avoir une utilisation dans le domaine de tannerie industrielle pour le délainage enzymatique.



**Figure 50** : test de délainage sur une peau de vache; A : pour *S. maculatus* ;  
B : pour *S. hispanicus*



**Figure 51**: Test de délainage sur une peau de brebis; A : pour *S. maculatus* ;  
B : pour *S. hispanicus*.

# Conclusion et perspectives

## Conclusion générale et perspectives

Dans ce travail, l'objectif est la recherche de nouvelles protéases d'origine végétale ayant un intérêt technologique. Parmi plusieurs plantes étudiées, deux espèces, *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus*, comestibles et très répandues en Algérie, ont montré une richesse en protéases, ce qui explique leur utilisation dans la fabrication de fromage artisanal.

Les travaux de la première partie ont permis la localisation et l'identification de plusieurs activités protéolytiques chez les deux espèces. Il s'agit de protéases endocellulaires localisées dans les pétales des fleurs. La purification de la fraction majeure, la protéase acide, par précipitation fractionnée, tamisage moléculaire puis chromatographie échangeuse d'ions a donné des degrés de purification de 60,51 et 57,60 et des rendements de 30,56% et 20,97% pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement.

La séparation par SDS-PAGE des protéases acides préalablement purifiées indique un poids moléculaire de 45 KDa. L'étude des propriétés physicochimiques a pour but de connaître les éventuelles applications. Elle a montré qu'il s'agit d'aspartylprotéases ayant un pH optimal de 5.0 et une température optimale comprise entre 50°C et 55°C. La stabilité thermique des enzymes est exprimée par une activité résiduelle de 47% et 42% à 60°C pendant 90 minutes pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement.

La caractérisation des enzymes par l'étude cinétique a donné des  $V_m$  de 1391 U et 1367 U et  $K_M$  de 4,76 g/L et 5,71 g/L pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement, ce qui indique une grande affinité de ces protéases vis-à-vis de la caséine. La forme michaelienne des courbes de cinétique indique que leur structure est monomérique. Ces enzymes sont activées par les ions calcium.

L'activité coagulante de 0,166 UP et 0,119 UP sur le lait UHT et la qualité des caillés formés et du lactosérum séparé révèlent une bonne aptitude technologique des deux protéases. L'optimisation des conditions de coagulation a permis d'obtenir des optima de pH 5 et une température de 60°C avec une concentration en calcium de 50 mM. Ces conditions, associées à la forme des profils électrophorétiques où la dégradation spécifique de la  $\kappa$ -caséine est observée, indiquent de grandes similitudes avec la présure commerciale. Les deux protéases caractérisées peuvent être utilisées comme succédanés de la présure.

D'autres activités protéolytiques ont été extraites à partir des fleurs des deux plantes à pH 8 afin d'évaluer d'autres applications technologiques, à savoir l'activité détergente, la digestion des protéines naturelles et le délainage. Ces tests ont montré un potentiel hydrolytique sur les différents substrats utilisés.

En résumé, les résultats de cette étude nous ont permis la purification et la caractérisation de nouvelles protéases d'origine végétale qui peuvent être valorisées comme produits locaux.

Des études complémentaires sur ces protéases, notamment en ce qui concerne les mécanismes d'action, devraient aider à la compréhension du mécanisme de la coagulation et d'évaluer les propriétés organoleptiques des fromages obtenus. Il est également nécessaire de réaliser une étude des propriétés structurales et moléculaires de ces enzymes afin de confirmer leur potentiel de coagulation du lait par rapport à la présure et leurs autres aptitudes industrielles.

# Références

## **Références**

- Abidi F., Limam F. and Marzouki MN. 2008. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, **43**: 1202–1208.
- Aftab S., Ahmed S., Saeed S. and Rasool S. 2006. Screening, Isolation and characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. *Parkisan journal of Biological Sciences*, **9 (11)**: 2122-2126.
- Alais C. 1975. Sciences du lait. Prrincipes et techniques laitières. *Masson*. Paris. P. 108-645.
- Alessandro M., Federico F. 1980. Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. *Journal of Dairy Science*, **63**:1397–402.
- Androuët P. 2002. Le Dictionnaire des fromages du monde Broché. Le Cherche-midi Editeur.
- Antao CM., and Malcata, FX. 2005. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43(7)**: 637–650.
- Arima K., Uchikoba T., Yonezawa H., Shimada M., Kaneda M. 2000. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supina*. *Phytochemistry*, **53**: 639–44.
- Asakura T., Watanabe H., Keiko A. and Soichi A. 1997. Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk-clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**:1070–5.
- Aspmo SI., Horn SJ., and Eijsink VGH. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. *Process Biochemistry*, **40(5)**, 1957–1966.
- Aviron-Violet P., Baret J.L., Bertrand C., Blazy B., Bouvier F. 1982. Les enzymes : Production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp. 23; 123; 140–153.
- Awad S., 2007. Effect of sodium chloride and pH on the rennet coagulation and gel firmness. *LWT- Food Science and Technology*, **40**: 220-224.

- Balcones E., Olano A. and Calvo MM. 1996. Factor affecting the rennet clotting properties of ewe's milk coagulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**: 1993-1996
- Barbas C. F., and Wong C H. 1987. Papain catalysed peptide synthesis: Control of amidase activity and the introduction of unusual amino acids. *Journal of the Chemical Society*, 533–534.
- Barrett A. J. 1994. Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*, **244**, 1–15.
- Beers EP., Woffenden BJ., Zhao C. 2000. Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol*, **44**:399–415.
- Ben Khaled H., Ghorbel-Bellaaj O., Hmidet N., Jellouli K., El-Hadj Ali N., Ghorbel S., Nasri M. 2011. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterization. *Food Chemistry*, **128**: 847–853.
- Benlounissi A, Mechakra-Maza A, Gheribi Z, Mahfouz M., Blum L J. and Marquette C. A. 2012. Milk-clotting fungus enzymes production: A sustainable development approach based on whey recycling. *African Journal of Biotechnology*, **11(8)** : 1997-2005.
- 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 .
- Berridge N J. 1945. The purification and crystallisation of rennin. *Biochemistry* , **39(2)**: 179-186.
- Beynon R.J. and Oliver S. 2004. Avoidence of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.*, **596**; 81–93.
- Borgoño CA., Michael IP., Shaw JLV., Lui L-Y., Ghosh MC., Soosaipillai A., et al. 2007. Expression and functional characterization of the cancer-related serine protease, human tissue kallikrein 14. *Journal of Biological Chemistry*, **282**:2405–22.
- Bruno M A., Lazza C M., Errasti M E., Lopez L M I., Caffini N O. and Pardo M F. 2010. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT- Food Science and Technology*, **43**: 695-701.



Bruno M A., Pardo M F., Caffini N O. and Lopez L M.I. 2002. Purification of a New Endopeptidase Isolated from Fruits of *Bromelia hieronymi Mez* (Bromeliaceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **21 (1)**: 51-6.

Brutti C B., Marcelo F P., Nestor OC. and Claudia L N. 2012. *Onopordum acanthium* (Asteraceae) flowers coagulating agent for cheesemaking. *Food Science and Technology*, **45**: 172-179.

Castillo M., Payne F A., Hicks C L., Laencina J. and Lopez M B. 2002. Effect of calcium and enzyme in cutting time prediction of coagulating goats' milk using a light scattering sensor. *International Dairy Journal*, **12**: 1019–1023.

Castillo M., Payne F A., Hicks C. L. and Lopez M. B. 2000a. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, **10** : 551–562.

Chabriere E. 2010. Protéases. Architecture et fonction des macromolécules.

Chao WS., Gu Y-Q., Pautot V., Bray E., Walling LL. 1999. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiology*, **120**: 979–92.

Chase M W. and Reveal J L. 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III », *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**: 122-127.

Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D. and Rodriguez-Lopez J N. 2007. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara Scolymus L.*) flowers. *International Dairy Journal*, **17(12)** : 1393–1400.

Chi Z., Ma C., Wang P., Li H.F. 2007. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Bioresource Technology*, **98** : 534–538.

Chutmanop J., Chuichulcherm S., Chisti Y. et Srinophakun P., 2008. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **83**: 1012–1018.

Cordeiro MC., Pais MS., Brodelius PE. 1994a. Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, **92**:645–53.

Corrons M A., Bertucci J I., Liggieri C S., López L M I. Bruno M.A. 2012. Milk clotting activity and production of bioactive peptides from whey using *Maclura pomifera* proteases. *LWT - Food Science and Technology*, **47**: 103-109.

Cronquist A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants, Columbia University Press, New York.

D'Hondt K., Stack S., Gutteridge S., Vandekerckhove J., Krebbers E. and Gal S. 1997. Aspartic proteinase genes in the Brassicaceae *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, **33(1)**: 187–192.

Dalev PG.1994. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of protein concentrate. *Bioresource Technology*, **48**: 265-267.

Davies DR.1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, **19**: 189–215.

De Carvalho MHC., d'Arcy-Lameta A., Roy-Macauley H., Gareil M., El Maarouf H., Pham-Thi AT., Zuily-Fodil Y. 2001. Aspartic protease in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Lett*, **492**: 242–6.

Devaraj KB., Kumar PR. and Prakash, V. 2008. Purification, characterization, and solvent-induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56(23)**: 11417–11423.

Deymié B., Multon JL. and Simon. D. 1981. Technique d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. APRIA. Paris. 238-241.

Domingos A., Cardoso P., Xue Z-T., Clemente A., Brodelius P. and Pais MS. 2000. Purification, cloning and autoprolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, **267**:6824–31.

Domsalla A, Melzig MF. 2008. Occurrence and properties of proteases in plant lattices. *Planta Med*, **74**:699–711.

Dubois T., Kleinschmidt T., Schnek A. G., Looze Y. and Braunitzer G. 1988. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. II. The primary structure of proteinase omega. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **369(8)**: 741–754.

Duke, J.A.1983. Medicinal Plants of the Bible, Trado-Medic Books, Buffalo, NY, 423-426.

Dunn BM. 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, **102**:4431–58.

Egito AS., Girardet JM., Laguna LE., Poirson C., Molle D., Miclo L. et al. 2007. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine  $\kappa$ -casein. *International Dairy Journal*, **17**: 816–825.

El-Bendary M A., Moharam M E. and Ali T H. 2007. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, **3(8)**: 695-699.

El-HadjAli N., Hmidet N., Ghorbel-Bellaaj O., Fakhfakh-Zouari N., Bougatef A. and Nasri M. 2011. Solvent-stable digestive alkaline proteinases from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: characteristics, application in the deproteinization of shrimp waste, and evaluation in laundry Commercial detergents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1096–1110.

El-Sayed ST., Elmazar M.A. and Al-Azzouny, R.A. 2013. Purification and characterization of a novel milk-clotting enzyme from *Brassica napus* Seeds. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, **7(1)**: 482-493.

Emmanuel V., Pontual I., Belany E A., Carvalho I., Ranilson S., Bezerra, et al. 2012. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, **135**:1848–1854.

Erskine P T., Coates L., Mall S., Gill R S., Wood S P., Myles D A. and Cooper J. B. 2003. Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides. *Protein Science*, **12(8)**: 1741–1749.

Estelle M. 2001. Proteases and cellular regulation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 254–60.

Faro C., Veríssimo P., Lin Y., Tang J. and Pires E. 1995. Cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of cardoon. In K. Takahashi (Ed.), *Aspartic proteinases: Structure, function, biology and biomedical implications* New York: Plenum Press, 374-377.

Fazouane-Naimi F., Mechakra A., Abdellaoui R., Nouani A., Magagi Daga S. et al. 2010. Characterization and cheese making properties of Rennet like enzyme produced by a local Algerian isolate of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, **24(3)**: 279-302.

Fonseca K C., Morais N C., Queiroz M R., Silva, M. C., Gomes M S., Costa J O., et al. 2010. Purification and biochemical characterization of Eumiliin from *Euphorbia milii* var. hislopilii latex. *Phytochemistry*, **71(7)**: 708–715.

Font Quer, P. 1990. *Plantas medicinales*, 12th ed. Barcelona, Spain Editorial Labor, S.A.

Foroughi F., Keshavarz T. and Evans CS. 2006. Specificities of proteases for use in leather manufacture. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , **81**: 257–61.

Frazier W.C. 1967. *Food microbiology*. Academic presse. London. P. 3-429.

García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O., Prado-Barragán L.A., 2009. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry*, **112**: 604–608.

Gaucheron F., Le Graet Y. and Briard V. 2000. Effect of NaCl addition on the mineral equilibrium of concentrated and acidified casein micelles. *Milchwissenschaft*, **55**: 82–86.

Golovkin B N., et al. 1998. Taraxalisin—A serine proteinase from dandelion *Taraxacum officinale* Webb s.l. *FEBS Letters*, **437(3)**: 237–240.

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Varradas, J.S., Oliver-Salvador, M.C., 2011. Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology Advances* **6**, 983–996

Graham JS., Xiong J., Gillikin JW. 1991. Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the leaves of *Glycine max.* *Plant Physiology*, **97**:786–92.

Green M.L., Valler M.J. and Kay J. 1984. Assessment of the suitability for cheddar cheese making of purified and commercial chicken pepsin preparations. *Journal of Dairy Research*, **51**: 331-340.

Grudkowska M, Zagdanska B. 2004. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, **51**:609–24.

Guevara M G., Verissimo P., Pires E., Faro C., Daleo GR. 2004. Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *Journal of Plant Pathology*, **86**: 233–8.

Guevara M G., Daleo G R. and Oliva C R. 2001. Purification and characterization of an aspartic protease from potato leaves. *Physiologia Plantarum*, **112(3)**: 321–326.

Guimaraes-Ferreira CA., Rodrigues EG., Mortara RA., Cabral H., Serrano FA., Ribeiro-dos-Santos R., et al. 2007. Antitumor effects in vitro and in vivo and mechanisms of protection against melanoma B16F10-Nex2 cells by fastuosain, a cysteine proteinase from *Bromelia fastuosa*. *Neoplasia*, **9**:723–33.

Guinee T P. and Fox P F. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (3<sup>rd</sup> ed.). General aspects, Vol. 1 (pp. 207–259) London, UK: Chapman and Hall.

Gupta R., Beg Q.K. and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**: 15–32.

Haddar A., Hmidet N., Ghorbel-Bellaaj O., Fakhfakh-Zouari N., Sellami- Kamoun A. et 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**: 669-678

Haileselassie S S, Lee B H and Gibs B F. 1999. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *Journal of Dairy Science*, **82** : 1612-1617.

Hainque B., Baudin B. et Lefebvre P. 2008. Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Ed Flammarion. Paris. 34- 46.

Hajji M., Kanoun S., Nasri M., Gharsallah N., 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*, **42**: 791–797.

Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, **29**, 45–72.

Hashem AM. 1999. Optimization of milk clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, **70**: 203–7.

Hashim M M., Mingsheng D., Iqbal M F. and Xiaohong C. 2011. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, **72**: 458–464.

Heimgartner U., Pietrzak M., Geertsen R., Brodelius P., Figueiredo AC., Pais MSS. 1990. Purification and partial characterization of milk-clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, **29**:1405–10.

Heywood V.H., Harbone. 1977. An overture to the compositae, In : Heywood V.H., Harbone J.B and Turner B.L : *The biology and chemistry of the compositae*. 1<sup>er</sup> éd. Academic press Inc., Londre, 1-17.

Hiraiwa N, Kondo M, Nishimura M. and Hara-Nishimura I. 1997. An aspartic endopeptidase is involved in the breakdown of propeptides of storage proteins in protein-storage vacuoles of plants. *European Journal of Biochemistry*, **246**:133–41.

Huang T-K. and McDonald KA. 2009. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*, **45**:168–84.

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.

Jacquet, A., Kleinschmidt, T., Schnek, A. G., Looze, Y., & Braunitzer, G. 1989. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. III. The primary structure of chymopapain. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, **370(5)**: 425–434.

Jollès P., Alais C. and Jollès J. 1963. Study of k-casein form cows. Characterization of the linkage sensitive to the action of rennin. *Biochimica and Biophysica Acta*, **69**, 511–517.

Kaneda M. and Tominaga N. 1975. Isolation and characterization of a proteinase from the sarcocarp of melon fruit. *Journal of Biochemistry*, **78(6)** : 1287–1296.

Kerguélen, 1993. Liste synonymique de la flore de France.

Kim M., Hamilton S E., Guddat L W. and Overall C. M. 2007. Plant collagenase: unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects*, **1770(12)**: 1627–1635.

Kinmer N., Tunalier Z., Baser K. H. C. and Cingi I. 1997. Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparations. *Planta medica* .**63**: 6, pp. 556-558.

Kleef R, Delohery T, Boubjerg D. 1996. Selective modulation of cell adhesion molecules on lymphocytes by bromelain protease 5. *Pathobiology*, **64**:339–46.

Kortt A A., Burns J. E., Vaughan J. A. and Stewart D. J. 1994. Purification of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. *Biochemistry and molecular biology international*. **34 (6)**: 1157-1166.

Kudrya V A. and Simonenko I A. 1994. Alkaline serine proteinase and lectin isolation from from the culture fluid of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**: 505–509.

Kumar D., Savitri., Thakur N., Verma R. and Bhalla T.C., 2008. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, **3(12)**: 661–672.

Kumar S., Sharma NS., Saharan M. and Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, **40**: 1701–5.

Kumari M., Sharma A., Jagannadham M.V. 2012. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, **131**: 1295–1303

La Valle J, Krinsky D, Hawkins E. 2000. Natural therapeutics pocket guide. Hudson, Ohio: Lexi- Comp.

Laemmli U K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680–685.

Laplaze L., Ribeiro A., Franche C., Duhoux E., Auguy F., Bogusz D., et al. 2000. Characterization of a *Casuarina glauca* nodule-specific subtilisin-like protease gene, a homolog of *Alnus glutinosa* ag12. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**:113–7.

Leary D, Vierros M, Hamon G, Arico S, Monagle C. 2009. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest. *Mar Polic*, **33**:183–94.

Lee, K. L., Albee, K. L., Bernasconi, R. J. and Edmunds, T. 1997. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases. *The Biochemical Journal*, **327(1)** : 199–202.

Lenoir J., Remeuf F. et Schneid N. 1997. L'aptitude du lait à la coagulation par la présure ; in : "Le fromage" ed. Eck et Gillis, Tec. Doc., 3ème Ed., Lavoisier, Paris.

Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B. 2000. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, **12**:419–431.

Lindahl M., Spetea C., Hundal T., Oppenheim AB., Adam Z. and Andersson B. 2000. The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, **12**:419–31.

Llorente B., Brutti C., Caffini N. 2004. Purification and characterization of a milk clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**: 8182–9.

Lo Piero AR., Puglisi I., Petrone G. 2002. Characterization of ‘‘Lettucine’’, a serinelike protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 2439–2443.

Lo Piero, A. R. and Petrone, G. 1999. Purification and partial characterization of an ATP-hydrolyzing serine protease from lettuce leaves. *Phytochemistry*, **51(3)**: 349–356.



lópez L.K. 2008. Détermination du rôle de certaines peptidases bactériennes par inférence à partir de données hétérogènes et incomplètes. L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).

Lourenco PML., Castro S., Martins TM., Clemente A., Domingos A. 2002. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, **31**:242–9.

Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL. and Randall R.J.1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265–75.

Lucey J.K. 2002. Rennet coagulation of milk, in: Encyclopedia of Dairy Science. Elsevier, New York.

Mechakra A., Auburger B., Remeuf F., Lenoir J. 1999. Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Science des Aliments*, **19**:663–75.

Mello VJ., Gomes MTR., Lemos FO., Delfino JL., Andrade SP., Lopes MTP., et al. 2008. The gastric ulcer protective and healing role of cysteine proteinases from *Carica candamarcensis*. *Phytomedicine*, **15**: 237–44.

Merheb-Dini C, Gomes E, Boscolo M and Silva R. 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). *Food Chemistry*, **120** : 87–93

Meunier N., 1999. Évaluation du potentiel de production de protéases bactériennes à partir des boues d'épuration municipales. Mémoire de maîtrise. INRS-Eau, Université du Québec, Canada. 168-173.

Mitchel R E J., Chaiken I M., and Smith E. 1970. The complete amino acid sequence of papain. Additions and corrections. *The Journal of Biological Chemistry*, **245(14)**, 3485–3492.

Mohanty A K., Mukhopadhyay U.K, Aushik J K K., Grover S. and Batish V K. 2003. Isolation, purification and characterization of chymosin from riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Dairy Research*, **70**: 37-43.

Mutlu A., Pfeil JE. and Gal S.A. 1998. Probarley lectin processing enzyme purified from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, **47**: 1453–9.

- Nadeem M., Qazi JI., Baig S. and Syed Q A. 2008. Effect of Medium Composition on Commercially Important Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technology and Biotechnology*, **46(4)**: 388–394.
- Najafi MF., Deobagkar D. and Deobagkar D. 2005. Potential application of Protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic Journal of Biotechnology*, **8**: 197-203.
- Najera A.I., Renobales M., and Barron L. J. R. 2003. Effects of pH, temperature, CaCl<sub>2</sub> and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: A multifactorial study. *Food Chemistry*, **80**: 345–352.
- Napper, A. D., Bennett, S. P., Borowski, M., Holdridge, M. B., Leonard, M. J., Rogers, E. E., et al. 1994. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *The Biochemical Journal*, **301(3)**: 727–735.
- Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., et al. 2009. Characterization of the purified extracts from artichoke flowers ( *Cynara scolymus* ) and from fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *Journal of Food technology*, **7(1)**: 20- 29.
- Otsuki N., Dang N.H., Kumagai E., Kondo A., Iwata S. and Morimoto C. 2010. Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacol*, **127**:760–7.
- Palma JM., Sandalio LM., Corpas FJ., Romero-Puertas MC., McCarthy I., Del Rio LA. 2002. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**:521–30.
- Pardo M.F., Lopez M.I., Canals F., Zviles F.X., Natalucci CL., Caffini N.O. 2000. Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**:3795–800.
- Park, H., Kusakabe, I., Sakakibara, Y., and Kobayashi, H. 2001. Autoproteolytic processing of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65(3)**, 702–705.
- Patel R., Dodia M., Singh S.P., 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* : Production and optimization. *Process Biochemistry*, **40**: 3569–3575.

- Pautot V., Holzer F.M., Chaufaux J. and Walling LL. 2001. The induction of tomato aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. Tomato infection is primarily a wound response triggered by coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 214–24.
- Pelmont J. 1995. Enzymes catalyseurs du monde vivant. Presses Universitaire de Grenoble. Sciences Technologie Médecine, Grenoble. Paris. P. 619-655.
- Penasse. L. 1974. Les enzymes: cinétiques et mécanisme d'action. Masson. Paris. P. 58-86.
- Polaina, J., and MacCabe, A. P. (2007). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. New York: Springer.
- Polanowski A., Wilusz T., Kolaczowska M.K., Wieczorek M., Wilimowska-Pele A. 1985. Purification and characterization of aspartic proteinases from *Cucumis sativus* and *Curcubita maxima* seeds. In: Kosta V, editor. *Aspartic proteinases and their inhibitors*. Berlin, Germany: Walter de Gruyter; 49–52.
- Popovic T., Puizdar V. and Brzin J. 2002. A novel subtilase from common bean leaves. *FEBS Lett*, **530**:163–168.
- Priest F G., and Stewart G G. 2006. *Handbook of Brewing* (2<sup>nd</sup> ed.). New York: CRC.
- Radlowski M., Kalinowski A., Adamczyk J., Krolkowski Z., Bartkowiak S. 1996. Proteolytic activity in the maize pollen wall. *Plant Physiology*, **98**:172–8.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., et al. 1997. Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 203(2), 204–212.
- Ramet J.P. 1994. Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", Nouakchott, Mauritanie.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Molecular Biology Review*, **62** (3): 597- 635.

- Rao S., Mizutani O., Hirano T., Masaki K. and Iefuji H. 2011. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112(5)**: 441–446.
- Raposo S. and Domingos A. 2008. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, **43**: 139–144.
- Rawlings N.D. and Barrett A.J. 2004. Families of serine peptidases. *Methods Enzymology*, **244**: 19–61.
- Rawlings N.D., Barrett A.J. and Bateman A. 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*; **38**:D227–33.
- Richardson GG., Nelson JH., Lubnow RE. and Schwarberg R L. 1967. Rennin-like enzyme from *Mucor pusillus* for cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, **50**:1066–1072.
- Ritonja, A., Buttle, D. J., Rawlings, N. D., Turk, V., & Barrett, A. J.1989. Papaya proteinase IV amino acid sequence. *FEBS Letters*, **258(1)**: 109–112.
- Rodrigo I., Vera P., Van Loon L.C. and Conejero V. 1991. Degradation of tobacco pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*, **95**:616–22.
- Rodrigo, I., Vera, P., and Conejero, V. 1989. Degradation of tomato pathogenesis-related proteins by an endogenous 37-kDa aspartyl endoproteinase. *European Journal of Biochemistry*, **184(3)**: 663– 669.
- Rookard L E., Edmondson O. and Greenwell P. 2009. ABO reverse grouping: effect of varying concentrations of the enzyme bromelain. *British Journal of Biomedical Science*, **66(2)**: 93–97.
- Roseiro L B., Barbosa M., Ames J M. and Wilbey A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants, The use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheese. *International Journal of Dairy Technology*, **56**: 76–85.
- Rubio B., Villaescusa L., Diaz AM., Fernandez L. and Martin T. 1995. Flavonol glycosides from *Scolymus hispanicus* and *Jasonia glutinosa*. *Planta Medica* , **61(6)**:583.

Rudenskaya G N., Bogdanova E A., Revina L P., Golovkin B N. and Stepanov, V. M. 1995. Macluralisin—A serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. *Planta*, **196(1)**: 174–179.

Salas CE, Gomes MTR, Hernandez M, Lopes MTP. 2008. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, **69**: 2263–9.

Salvador SM., Novo C., Domingos A. 2006. Evaluation of the presence of aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**: 893–898.

Sarmiento A C., Lopes H., Oliveira C S., Vitorino R., Samyn B., Sergeant K., et al. 2009. Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, **230(2)**: 429–439.

Sathya R., Pradeep B.V., Angayarkanni J. and Palaniswamy M., 2009. Production of milk clotting protease by a local isolate of *Mucor circinelloides* under SSF using agro-industrial wastes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**: 765-794.

Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*; **220**:183–97.

Scriban R. 1993. Biotechnologie. 4eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 30-695.

Scriban R. 1999. Biotechnologie. 5eme édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. P. 149-159.

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.

Sharma, S., Giri, S. and Khuller, G.K., 1998. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin dependent protein kinase from *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *Molecular and Cellular Biology*, **183** : 183–191.

Shehata, A.E., A.E. Fayed, A.A. Ismail and M.M. Salim, 1996. Production and characterization of bacterial coagulants as calf rennet replacer for Egyptian cheese making. *Egyptian Journal of Food Science*, **24**: 417-449.

Sidrach L, Garcia-Ca'novas F., Tudela J., Rodríguez-Lo'pez J. N. 2005. Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, **66**: 41–49.

Silva S V., Barros R M. and Malcata F X. 2002. Hydrolysis of caseins by extracts of *Cynara cardunculus* precipitated by ammonium sulfate. *Journal of Food Science*, **67**: 1746–1751.

Silva SV. and Malcata FX. 2005a. Partial identification of watersoluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *Journal of Dairy Science*, **88**:1947–54.

Silva SV. and Malcata FX. 2005b. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, **89**:19–26.

Simões I. and Faro C., 2004. Structure and function of plant aspartic proteinases. *European journal of biochemistry*, **271**: 2067–2075.

Soares V F., Castilho L R., Bon E P S. and Freire D M G., 2005. High-yield *Bacillus subtilis* protease production by solid-state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121–124.

St. Angelo AJ, Ory RL, Hansen HJ. 1970. Properties of a purified proteinase from hempseed. *Phytochemistry*, **9**:1933–1938.

St. Angelo AJ., Ory RL. and Hansen HJ. 1969. Localization of an acid proteinase in hempseed. *Phytochemistry*; **8**:1135–1138.

Sternberg MJ. 1970. Crystalline milk clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *Journal of Dairy Science*, **54**:159–67.

Sudhir K R., Ashis K., and Mukherjee. 2009. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. *Biochemical Engineering Journal*, 5039-5047.

Sullivan G A., and Calkins C R. 2010. Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat science* ;27 .

Sumantha A., Larroche C. and Pandey A. 2006. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technol. Biotechnol.*, **244**: 211–220.

Takahashi K., Matsumoto K., Nishii W., Muramatsu M., Kubota K., Shibata C., et al. 2009. Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Cephalotus*, *Dionaea*, and *Drosera*. *Carniv Pl Newsl*, **38**:75–82.

Tamer I M. 1993. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, **15(4)**: 427-432.

Targoni O., Tary L. and Lehmann P. 1999. Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment. *Journal of Autoimmun*, **12**:191–8.

Tavaria F K., Souza M J., Domingos A., Malcata F X., Brodelius P. et al. 1997. Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, **45(10)**: 3760–3765.

Thomás G.E., Rodolfo H.G., Juan M.D., Georgina S.F., Luis C.G., Ingrid R.B. and Santiago G.T., 2009. Proteolytic activity in enzymatic extracts from *Carica papaya L.* cv. Maradol harvest by-products. *Process Biochem*, **44 (1)**: 77–82.

Tian RH., Zhang GY., Yan CH. and Dai YR. 2000. Involvement of poly (AND-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells. *FEBS Lett*, **474**:11–5.

Timotijevic GS., Radovic SR. and Maksimovic VR. 2003. Characterization of aspartic proteinase activity in buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) seeds. *J Agric Food Chem*, **51**: 2100–4.

Tokes Z A., Woon W C. and Chambers S M. 1974. Digestive enzymes secreted by carnivorous plant *Nepenthes macferlanei L.* *Planta*, **119(1)**: 39–46.

Torres MJ., Trejo SA., Martin MI, Natalucci CL, Aviles FX, Lopez LMI. 2010. Purification and characterization of a cysteine endopeptidase from *Vasconcellea quercifolia A. St.- Hil.* latex displaying high substrate specificity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **58**: 11027–35.

- Trap C. and Boireau P. 2000. Les protéases chez les helminthes. *Vet. Res.* **31** : 461-471.
- Trujillo, A. J., Guamis, B., Laencina, J. and López, M. B. 2000. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. *Food Chemistry*, **71**: 449–457.
- Ueda T, Seo S, Ohashi Y. and Hashimoto J. 2000. Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Molecular Biology*, **44**:649–57.
- Uhlig H. 1998. Industrial enzymes and their applications. New York: Willey & Sons.
- Vairo Cavalli S., Claver S., Priolo N. and Natalucci C L. 2005. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Research*, **72(3)**: 271-275.
- Van der Hoorn RAL. 2008. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, **59**:191–223.
- Verissimo P., Faro C., Moir A. J., Lin Y., Tang J., & Pires, E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers. *European Journal of Biochemistry*, **235** : 762–768.
- Verissimo P., Faro C., Moir A. J., Lin Y., Tang J., & Pires, E. 1996. Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers. *European Journal of Biochemistry*, **235**, 762–768.
- Vieira M., Pissarra J., Verissimo P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., et al. 2001. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Molecular Biology*, **45(5)**: 529–539.
- Vincent J L., and Brewin N J. 2000. Immunolocalization of a cysteine protease in vacuoles, vesicles, and symbiosomes of pea nodule cells. *Plant Physiology*, **123(2)**: 521–530.
- Viratelle O. 1993. Enzymologie, Hermann. Collection Méthotes. Paris.
- Vishwanatha K.S., AppuRao A.G., Sridevi Annapurna Singh. 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, **114**: 402–407.



Walsh G. 2002. Proteins, Biochemistry and Biotechnology. West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.; pp 420.

Whitehurst R J. and Van Oort, M. (Eds.). 2010. Enzymes in food technology. West Sussex: Wiley-Blackwell.

Yadav S C. and Jagannadham, M V. 2008. Physiological changes and molluscicidal effects of crude latex and milin on *Biomphalaria glabrata*. *Chemosphere*, **71(7)**: 1295–1300.

Yamagata H., Ueno S., Iwasaki T., 1989. Isolation and characterization of a possible native cucumisin from developing melon fruits and its limited autolysis to cucumisin. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53 (4)**: 1009–1017.

Yoshida-Yamamoto S., Nishimura S., Okuno T., Rakuman M. and Takii, Y. (2010) Efficient DNA Extraction from Nail Clippings Using the Protease Solution from *Cucumis melo*. *Molecular biotechnology*, **20**: 1073–6085.

#### **Sites internet**

1. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> visité le 15 /09/2013
2. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/> visité le 15 /09/2013
3. <http://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-61831-synthese> visité le 18 /07/2013
4. [http://www.telabotanica.org/eflore/consultation/index\\_mobile.php?module=mobile&referentiel=bdtfx&num\\_nom=61833](http://www.telabotanica.org/eflore/consultation/index_mobile.php?module=mobile&referentiel=bdtfx&num_nom=61833) visité le 18 /07/2013

# 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 citrate / citrate de sodium 0.05 M pH 5.5.
- Solution mère de la tyrosine avec une concentration de 80µg/ml pour l'étalonnage.
- Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.
- Solution de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub> 2% (w/v) dans du NaOH 0.1N.
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à ½.

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 citrate / sodium 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 lecture se fait à 750 nm.

## 2. Protocole de dosage des protéines

- **Solutions nécessaires**

- **Solution A:** réactif du Folin-ciocalteu dilué à  $\frac{1}{2}$  dans du NaOH (0.1N).
- **Solution B:** 2% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans de NaOH 0.1N.
- **Solution C<sub>1</sub> :** 0.5 % de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dans l'eau distillée.
- **Solution C<sub>2</sub> :** 1% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillé.
- **Solution M :** c'est un mélange de 100 $\mu\text{l}$  de la solution C<sub>1</sub>, 100 $\mu\text{l}$  de la solution C<sub>2</sub> et 10ml de la solution B
- **Solution mère de BSA (bovine sérum albumine)** à 1000 $\mu\text{g/ml}$  pour l'étalonnage.

- **Dosage**

- 200  $\mu\text{l}$  de l'extrait enzymatique
- 2 ml de la solution M. Agiter et laisser reposer 15min
- 200  $\mu\text{l}$  du réactif Folin-Ciocalteu. Agiter juste après et incuber 45 min à température ambiante à l'obscurité. La lecture de l'absorbance est réalisée à 700 nm au spectrophotomètre.

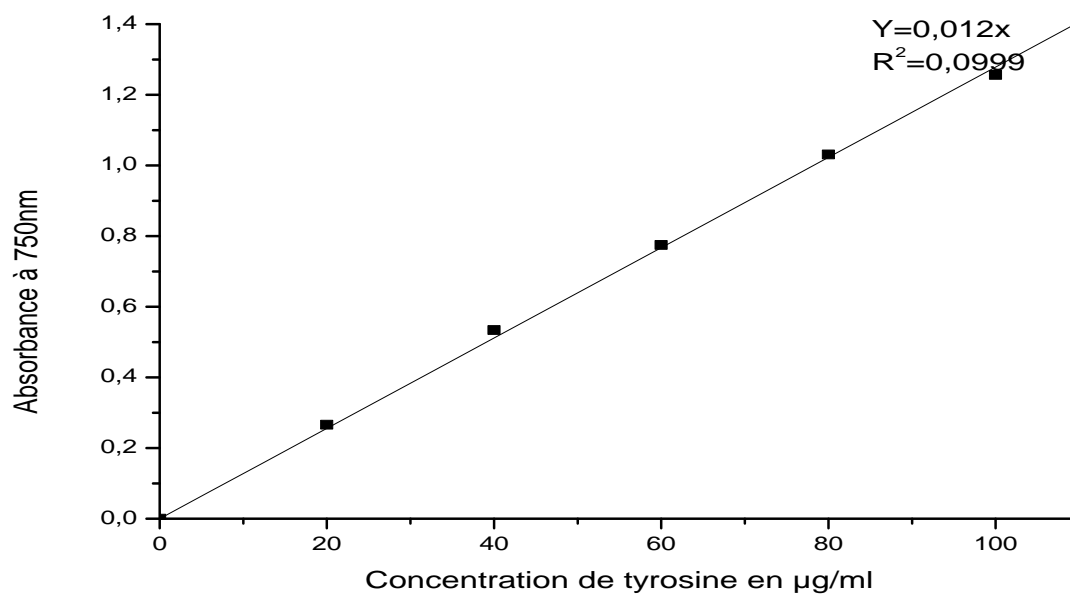
## ANNEXE 2

- **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 :

Concentration de Tyr (µg /ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de Tyr(ml)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
T.C.A(ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-Ciocalteu dilué au 1/4.	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

L'absorbance lue à 750nm permet de tracer la courbe (fig.15).

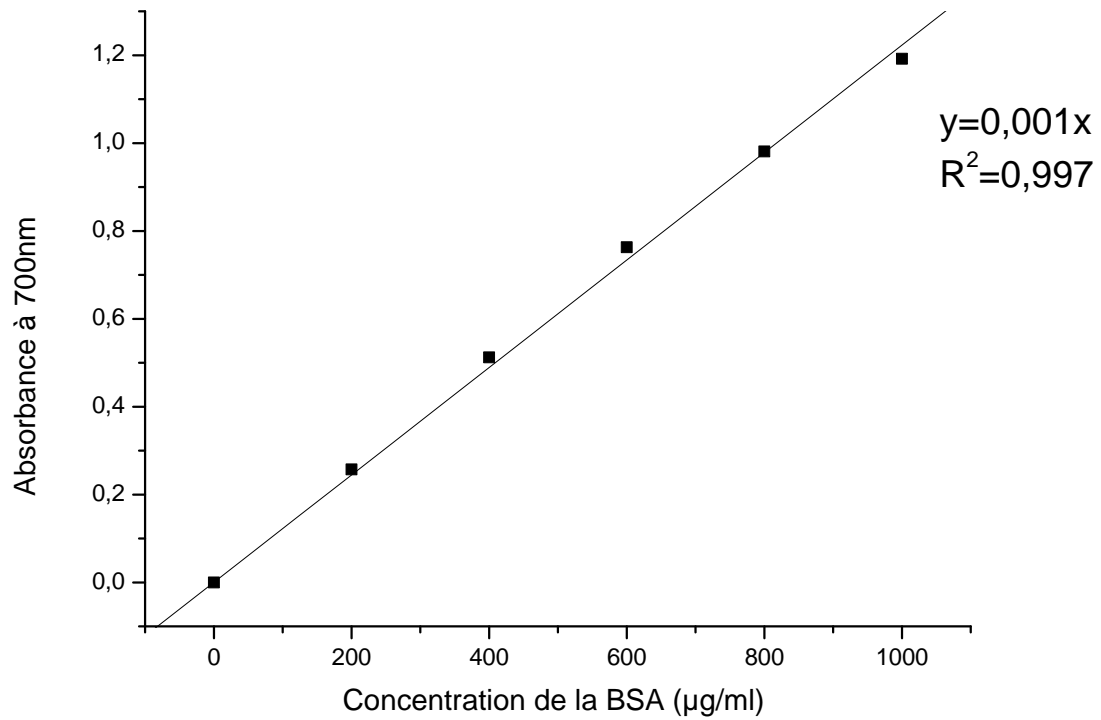


**Figure 1:** courbe étalon de la Tyrosine

- **La courbe d'étalonnage de la BSA**

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 1000µg/ml selon le tableau suivant :

Dilution	0	1/5	2/5	3/5	4/5	1/5
Solution mère (ml)	0	40	80	120	160	200
Eau distillée (ml)	200	160	120	80	40	0
Mélange M (ml)	2	2	2	2	2	2



**Figure 2** : courbe étalon de la BSA.

## ANNEXE 3

### Analyse de la variance de l'effet de la température sur l'activité protéolytique pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet32)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	p
<b>temp</b>	1725,641	1058,665	13	293,6209	0,00	5,877105	12	0,000075

Univariate Tests of Significance for act (Spreadsheet8) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of – Freedom	MS	F	p
<b>Intercept</b>	36254207	1	36254207	133,8148	0,000000
<b>temp</b>	18692840	12	1557737	5,7496	0,004711
<b>Error</b>	2709283	10	270928		

### Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet32)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference – Constant	t-value	df	p
<b>ph</b>	557,9010	165,1475	10	52,22421	0,00	10,68280	9	0,000002

Univariate Tests of Significance for act (Spreadsheet8) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of – Freedom	MS	F	P
<b>Intercept</b>	9180733	1	9180733	11,87095	0,001499
<b>Ph</b>	14393201	9	1599245	2,06787	0,060340
<b>Error</b>	27068240	35	773378		

### Analyse de la variance de l'effet du calcium sur l'activité protéolytique pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet8)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference – Constant	t-value	df	p
<b>Ca</b>	2305,227	256,4512	11	77,32296	0,00	29,81297	10	0,000000

## Analyse de la variance de l'effet de la température sur l'activité protéolytique pour

*S. hispanicus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet32)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference – Constant	t-value	df	P
temp	1685,948	1026,445	13	284,6845	0,00	5,922164	12	0,000070

Univariate Tests of Significance for act (Spreadsheet8) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of – Freedom	MS	F	P
Intercept	34580575	1	34580575	132,3236	0,000000
Temp	17694591	12	1474549	5,6424	0,005065
Error	2613333	10	261333		

## Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour

*S. hispanicus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet32)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference – Constant	t-value	df	p
temp	539,6350	162,5184	10	51,39283	0,00	10,50020	9	0,000002

Univariate Tests of Significance for act (Spreadsheet8) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
	SS	Degr. of – Freedom	MS	F	P
Intercept	4392856	1	4392856	4,215406	0,060751
Ph	6760682	9	751187	0,720843	0,683635
Error	13547242	13	1042096		

## Analyse de la variance de l'effet du calcium sur l'activité protéolytique pour

*S. hispanicus* ( $p < 0,05$ )

Test of means against reference constant (value) (Spreadsheet8)								
	Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference – Constant	t-value	df	p
Ca	2199,242	257,3558	11	77,59569	0,00	28,34233	10	0,000000



## ANNEXE 4

Analyse de la variance de l'effet de la température sur la MCA pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	p
1004,857	1027,151	7	388,2268	0,00	2,58833	6	0,041305

Analyse de la variance de l'effet de la température sur la MCA pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	p
1196,714	1215,407	7	459,3806	0,00	2,60506	6	0,040387

Analyse de la variance de l'effet du pH sur la MCA pour *S. maculatus*

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	P
1443,800	2007,062	5	897,5856	0,00	1,60854	4	0,183000

Analyse de la variance de l'effet du pH sur la MCA pour *S. hispanicus*

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	P
1610,600	2203,565	5	985,4643	0,00	1,63436	4	0,177523

Analyse de la variance de l'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sur la MCA pour

*S. maculatus* ( $p < 0,05$ )

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	P
616,1667	316,8207	6	129,3415	0,00	4,763874	5	0,005042

Analyse de la variance de l'effet de la concentration du  $\text{CaCl}_2$  sur la MCA pour

*S. hispanicus* ( $p < 0,05$ )

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	P
783,8333	292,7937	6	119,5325	0,00	6,557489	5	0,001236

**Analyse de la variance de l'effet de la concentration du NaCl<sub>2</sub> sur la MCA pour**

***S. maculatus* (p < 0,05)**

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	p
3106,857	2262,298	7	855,0685	0,00	3,633460	6	0,010920

**Analyse de la variance de l'effet de la concentration du NaCl<sub>2</sub> sur la MCA pour**

***S. hispanicus* (p < 0,05)**

Mean	Std.Dv.	N	Std.Err.	Reference - Constant	t-value	df	p
4576,571	2515,614	7	950,8129	0,00	4,813325	6	0,002960

# Résumés

# **Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques.**

## **Résumé**

Une étude est réalisée sur deux plantes épineuses locales du genre *Scolymus* dans le but d'extraire des enzymes à intérêt technologique. Pour cela, des protéases acides sont purifiées à partir de fleurs de *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus* en trois étapes, précipitation fractionnée par l'AS, tamisage moléculaire et chromatographie échangeuse d'ions. Les rendements en activité récupérés sont de 30,56% et 20,97%, soit des degrés de purification de 60,51 et 57,60 pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement. La séparation des protéases acides par électrophorèse SDS-PAGE a donné un poids moléculaire de 45 KDa pour les deux enzymes. L'étude des propriétés physicochimiques a permis d'obtenir un pH optimal de 5, une température optimale de 55°C et une stabilité de 1h et demi. Ces enzymes sont inhibées par la pepstatine A indiquant qu'il s'agit d'aspartylprotéases ; elles sont activées par  $Ca^{+2}$ . Les paramètres cinétiques de ces protéases sont des  $V_m$  de 1391 U et 1367 U et des  $K_M$  de 4,76 g/L et 5,71 g/L pour *S. maculatus* et *S. hispanicus* respectivement. Ces enzymes entraînent une coagulation très rapide du lait de vache frais en des temps très courts : 7 min pour l'enzyme de *S. maculatus* et 10 min pour celle de *S. hispanicus*. L'activité coagulante de ces protéases est optimale à 60°C et à pH 5, soit une concentration de 50mM en calcium. Ces coagulases possèdent la capacité d'hydrolyser les caséines  $\beta$ ,  $\alpha$  et  $\kappa$ . Ces résultats indiquent que ces enzymes peuvent être utilisées comme succédanés de la présure. D'autres propriétés testées avec les protéases alcalines extraites des mêmes plantes ont montré différents potentiels technologiques. Ainsi ces enzymes capables d'agir comme anticoagulants, détergents et comme kératinases. Ce qui permet une utilisation d'éventuelles applications industrielles.

**Mots-clés :** Protéases, *Scolymus maculatus*, *Scolymus hispanicus*, purification, applications technologiques.

## **Study of proteases of some endemic plants. Purification, properties, mechanism of action and technological applications.**

### **Abstract**

A study was carried out on two local spinous plants of the genus *Scolymus* in order to extract enzymes having a technological interest. For this, acid proteases were purified from flowers *Scolymus maculatus* and *Scolymus hispanicus* in three steps, fractional precipitation with AS, molecular sifting and ion exchange chromatography. The yields activity recovered are 30.56% and 20.97%, with purification degrees of 60.51 and 57.60 for *S. maculatus* and *S. hispanicus* respectively. The separation of acid proteases by SDS-PAGE gave a molecular weight of 45 kDa for both enzymes. The study of physicochemical properties allows obtaining an optimum pH of 5, an optimum temperature of 55°C and a stability of 1 hour and a half. These enzymes are inhibited by pepstatin A indicating that it is aspartylprotease; they are activated by Ca<sup>+2</sup>. The kinetic parameters of these proteases are V<sub>m</sub> 1391 U and 1367 U, K<sub>M</sub> 4.76 g/L and 5.71 g/L for *S. maculatus* and *S. hispanicus* respectively. These enzymes cause a very rapid coagulation of fresh cow's milk in very short times: 7 min for the enzyme of *S. maculatus* and 10 min to that of *S. hispanicus*. The coagulant activity of these proteases is optimum at 60 ° C and pH 5, at a concentration of 50 mM in calcium. These coagulases have the ability to hydrolyze α, β and κ-casein. These results indicate that these enzymes can be used as substitutes for rennet. Other properties tested with alkaline proteases extracted from the same plants showed different technological potential. Thus, these enzymes can act as anticoagulants, detergents and keratinase. Which allows the use in industrial applications.

**Keywords:** Proteases, *Scolymus maculatus*, *Scolymus hispanicus*, purification, technological applications.

## البروتي . تنقية آلية والتطبيقات نولوجية

تم إجراء هذه الدراسة على نوعين من الأشواك البرية من نوع *Scolymus*. لقد تمت تنقية اثنين من البروتياز الحمضي من زهور النبتتين *Scolymus hispanicus* و *Scolymus maculatus*. الأنزيمي المتحصل عليه بعد من التنقية، الجزئي الإقصاء اللوني والتبادل الأيوني اللوني، هو 30.56 20.97 تنقية على درجة من تنقية 57.60 60.51 *S. hispanicus* *S. maculatus*. أعطى فصل الأنزيمات النقية بواسطة SDS PAGE الوزن الجزئي لكل من الأنزيمين 45 KDa وقد سمحت دراسة الخصائص الفيزيائية تحديد درجة الحموضة 55 درجة مئوية. كما أثبتت هذه الدراسة ان النشاط الانزيمي مستقر جدا حوالي ساعة و نصف في درجة الحرارة المثلى. قد تم تثبيط هذه الأنزيمات باستعمال pepstatine-A من جهة و تم تنشيطه الايون ثنائي  $Ca^{+2}$  من جهة أخرى مما يؤكد أن الأنزيم من نوع pepstatine-A عابير الحركية هذه البروتياز هي Vm 1367 U 1391 U  $K_M$  5,71 4,76g/L . هذه الأنزيمات سريع جدا من حليب البقر و في وقت قصير جدا 7 *Scolymus maculatus* 10 *Scolymus hispanicus* البروتيني 60 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 5، بتركيز 50 mM الكالسيوم. هذه المخثرات لها القدرة على تحليل ا ب ك كازيين. هذه النتائج تشير إلى انه يمكن استخدام هذه الأنزيمات كبدايل للمخثرات المستعملة في صناعة الجبن. من ناحية أخرى، البروتياز القلوي من هذه الأشواك، تخثر . هذه البروتياز يمكن أن تستخدم في صناعة المنظفات، لقدرتها على ي وتينات طبيعية. إنها كذلك يتفاعل كيراتيناز التي يمكن استخدامها صيدلانيا الأنزيمية أو في مجال الدباغة .

### الكلمات المفتاحية

البروتياز الحمضي التنقية التطبيقات التكنولوجية *Scolymus hispanicus* *Scolymus maculatus*

# Production scientifique

## Publications et Communications

Les travaux réalisés ont été valorisés par la publication de deux articles dans des revues internationales impactées, et des communications dans différents congrès.

### Publications:

1) **Benchiheub M., Benkahoul M., Bellil I. and Mechakra Maza Aicha. 2014.** Milk-clotting properties and specific hydrolysis of caseins of the acid protease extracted from *Scolymus maculatus* flowers. *Int.J. Adven. Research*, **2(1): 357-365.**

### Communications:

- 1- **BENCHIHEUB M<sup>1\*</sup>., BENHAMDI A<sup>1</sup>., BENKAHOUL M<sup>1</sup>. & Mechakra A<sup>1</sup>.** **2013.** Extraction and characterization of a coagulant preparation from *Scolymus maculatus* flowers. 4th International Workshop on Industrial Biotechnology Tlemcen, Algeria, April, 10-11.
- 2- **BENCHIHEUB M., BENHAMDI A., BENKAHOUL M. & Mechakra A. 2013.** Purification partielle et étude des propriétés d'une protéase acide de fleurs de *Scolymus hispanicus*. 1<sup>er</sup> congrès de biotechnologie et valorisation des bio-ressources 05-06 Mars 2013, Hôtel
- 3- **BENCHIHEUB M., BENKAHOUL M. & Mechakra A. 2013.** Extraction et étude des propriétés de la protéase acide de fleurs de *Scolymus maculatus*. Quatrième Journées Scientifiques sur la Valorisation des Bioressources 04 - 05 mai 2013 Hôtel Tour Khalef (Tunisie)
- 4- **BENCHIHEUB M., BENKAHOUL M. & Mechakra A. 2013.** *Scolymus hispanicus* L. (Asteraceae) comme agent coagulant le lait; action spécifique sur les caséines bovines. Journées internationales de Biotechnologie. 21-24 décembre 2013, Hammamat, Tunisie.