

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'Ordre : 39/DS/2016
N° de Série : 01/MicBio/2016

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN SCIENCES
Option : Génie enzymatique

**Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité
coagulante des protéases de deux chardons endémiques,
Galactites tomentosa et *Onopordum acanthium*.**

par : BENKAHOUL MALIKA

présenté le : 8 mai 2016

Jury composé de :

Présidente : Mme. AMEDAH S.	Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine
Encadreur : Mme. MECHAKRA A.	Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine
Examineurs : Mme. FAZOUANE F	Professeur, Université Boumerdès
Mr. NOUANI A.	M.C, Université Boumerdès
Mr. OULDJAOUI A.	M.C, Université d'Oum El Bouaghi
Mr. NOUADRI T.	M.C, Université des Frères Mentouri Constantine

Année Universitaire : 2015- 2016

Remerciements

Je tiens particulièrement à exprimer ma profonde gratitude à Madame MECHAKRA-MAZA Aicha, ma directrice de thèse, pour ses orientations et sa patience, tout au long de ce parcours scientifique. Je lui suis reconnaissante.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mme Amedah, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider la commission d'examen de cette thèse.

Je suis également très sensible à l'honneur que me font Mme Fazouane et Mr Nouani. de l'université de Boumerdess

Je voudrais exprimer également mes sincères remerciements à Mr.Ouldjaoui de l'université d'Oum El Bouaghi d'avoir accepté de juger ce modeste travail, qu'il trouve ici ma très profonde gratitude.

C'est avec un très grand plaisir que je remercie infiniment Mr. Nouadri de l'université de Constantine1 d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

J'exprime mes respectueux dévouements à Mr. KHELILFI Douadi pour ses orientations et de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Cette thèse est dédiée à :

A la mémoire de mes grands parents que je garderais toujours dans mon cœur

A mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse

- Mon cher époux et mes enfants
- Mes frères, sœurs, nièces et neveux;
- 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 : Activité Coagulante du lait

SMCA : Activité Coagulante spécifique

MM : masse molaire

pH: potentiel d'Hydrogene.

RP: reversed-phase

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SP: sérylprotéase

TCA: TriChloroacetic Acid.

P: Protéine

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

UHT : Ultra Haute Température

UP: Unité Présure

LISTE DES TABELAUX

Tableau 1 :	Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties d' <i>Onopordon Acanthium</i> et de <i>Galactites tomentosa</i>	35
Tableau 2 :	Résultats de l'activité protéolytique dans les pétales et le reste des fleurs d' <i>Onopordum acanthium</i> et de <i>Galactites tomentosa</i>	36
Tableau 3 :	L'activité protéolytique avant et après séchage des échantillons par le Ca Cl ₂	38
Tableau 4 :	Résultats de précipitation fractionnée par sulfate d'ammoniums de l'extrait brut d' <i>Onopordum acanthium</i>	39
Tableau 5 :	Résultats de précipitation fractionnée par sulfate d'ammoniums de l'extrait brut de <i>Galactites tomentosa</i>	40
Tableau 6 :	Tableau de purification de la protéase extraite à partir des fleurs d' <i>O. acanthium</i>	42
Tableau 7 :	Tableau de purification de la protéase extraite à partir de <i>Galactites tomentosa</i>	44
Tableau 8 :	Affinité des deux protéases végétales aux différents substrats.....	46
Tableau 9 :	Effet de quelques inhibiteurs sur les protéases d' <i>O. acanthium</i> et de <i>G.tomentosa</i>	54
Tableau 10 :	Effet de quelques ions sur les protéases d' <i>O. acanthium</i> et de <i>G.tomentosa</i>	56
Tableau 11 :	Comparaison entre le temps de coagulation du lait de vache frais et du lait écrémé UHT	56
Tableau 12 :	Activité coagulante et force de coagulation des protéases d' <i>Onopordum acanthium</i> et de <i>Galactites tomentosa</i> sur le lait.....	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Distribution des ventes des enzymes.....	03
Figure 2 :	Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine	08
Figure 3 :	Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine.....	09
Figure 4 :	Mécanisme réactionnel des protéases acides.....	10
Figure 5 :	Mécanisme réactionnel des métalloprotéases	11
Figure 6 :	<i>Onopordum acanthium</i>	16
Figure 7 :	<i>Galactites tomentosa</i>	18
Figure 8 :	Modèle d'une micelle de caséine et d'une sous-unité	21
Figure 9 :	Phases du processus de coagulation enzymatique du lait	23
Figure 10 :	Profil d'élution de la protéase acide d' <i>O.acanthium</i> sur Sephadex G-100.....	41
Figure 11 :	Profil d'élution de la protéase acide de <i>Galactites tomentosa</i> sur le Sephadex G-100.....	43
Figure 12 :	Profil électrophorétique de la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	45
Figure 13 :	Profil électrophorétique de la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	45
Figure 14 :	Effet de la concentration du substrat sur la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	47
Figure 15 :	Effet de la concentration du substrat sur la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	47
Figure 16 :	Cinétique de la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i> selon la représentation de Lineweaver-Burk	48
Figure 17 :	Cinétique de la protéase acide de <i>Galactites tomentosa</i> selon la représentation de Lineweaver et Burk	48
Figure 18 :	Effet du pH sur l'activité de la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	49
Figure 19 :	Effet du pH sur l'activité de la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	49
Figure 20 :	Effet de la température sur l'activité de la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	51
Figure 21 :	Effet de la température sur l'activité de la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	51
Figure 22 :	Stabilité thermique de la protéase issue des fleurs d' <i>Onopordum acanthium</i>	52
Figure 23 :	Stabilité thermique de la protéase issue des pétales de <i>Galactites tomentosa</i>	52
Figure 24 :	Cinétique de la stabilité thermique de la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	53
Figure 25 :	Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	53
Figure 26 :	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir d' <i>O. acanthium</i> en fonction du pH.....	59
Figure 27 :	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir de <i>Galactites tomentosa</i> en fonction du Ph.....	59
Figure 28 :	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i> en fonction de la température	61
Figure 29 :	Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de	

	<i>Galactites tomentosa</i> en fonction de la température.....	61
Figure 30 :	Variation de l'activité coagulante du lait de vache UHT traité par la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i> en fonction de la concentration des ions calcium.....	62
Figure 31 :	Variation de l'activité coagulante du lait de vache UHT traité par la protéase de <i>Galactites tomentosa</i> en fonction de la concentration des ions calcium.....	63
Figure 32 :	Analyse électrophorétique de la dégradation des caséines α , β et κ par la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	65
Figure 33 :	Analyse électrophorétique de la dégradation des caséines α , β et κ par la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	65
Figure 34 :	Dégradation de la caséine κ par la protéase d' <i>Onopordum acanthium</i>	66
Figure 35 :	Dégradation de la caséine κ par la protéase de <i>Galactites tomentosa</i>	66
Figure 36 :	Profil d'élution des caséines α , β et κ par RP-HPLC avant hydrolyse.....	68
Figure 37, 38,39:	Profil d'élution des hydrolysats des différentes caséines après 30 min, 120 min et 24h de digestion par RP-HPLC traitées par la présure et les deux protéases végétales.....	69-71

SOMMAIRE

Introduction	01
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
1. Enzymes protéolytique.....	03
1.1. Définition des protéases.....	03
1.2. Classification des protéases.....	04
1.3. Sources des protéases	04
1.3.1. Protéases d'origine animale.....	04
1.3.2. Protéases d'origine microbienne	05
1.3.3. Protéases d'origine végétale	05
2. Protéases végétales.....	07
2.1. Protéases végétales à sérine.....	07
2.2. Protéases végétales à cystéine.....	08
2.3. Protéases végétales acides	10
2.4. Métalloprotéases végétales.....	11
2.5. Applications des protéases végétales	12
2.5.1. Dans l'industrie laitière	12
2.5.2. Dans l'industrie alimentaire.....	13
2.5.3. Dans le domaine de la santé.....	13
2.5.4. Dans la chimie organique.....	14
2.5.5. Dans les détergents.....	14
3. Astéracées	14
3.1. Généralités	14
3.2. <i>Onopordum acanthium</i>	15
3.2.1. Description	15
3.2.2. Nomenclature et classification.....	17
3.2.3. Ecologie et habitat	17
3.3. <i>Galactites tomentosa</i>	17
3.3.1. Description.....	17
3.3.2. Nomenclature et classification.....	19
3.3.3. Ecologie et habitat.....	19
3.4. Utilisations des asteracées.....	19
3.4.1. Dans la médecine.....	19
3.4.2. Dans l'agriculture.....	20
3.4.3. Autres utilisations.....	20

4. Coagulation du lait par les protéases.....	20
4.1. Les micelles de caséine.....	21
4.2. Stabilité des micelles de caséines	22
4.3. Phases de coagulation.....	22
4.3.1. Phases primaire.....	22
4.3.2. Phase secondaire.....	23
4.3.3. Phase tertiaire.....	24
4.4. Facteurs influençant la coagulation.....	24
4.4.1. Concentration en enzyme.....	24
4.4.2. Température.....	24
4.4.3. pH.....	24
4.4.3. Concentrations en calcium.....	24
4.4.4. Diamètre micellaire.....	24
5. Méthodes d'extraction, de purification et de caractérisation des protéases	25
5.1. Extraction	25
5.2. Précipitation.....	25
5.3. Méthodes chromatographiques.....	26
5.3.1. Tamisage moléculaire	26
5.3.2. Chromatographie d'échange d'ions	27
5.3.3. Chromatographie liquide à haute pression.....	27
5.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	28
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique.....	29
2. Purification	29
2.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium.....	29
2.2. Dialyse.....	29
2.3. Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100	30
3. Méthodes de dosages.....	30
3. 1. Dosage de l'activité protéolytique	30
3. 2. Dosage des protéines selon la méthode le LOWRY (1951).....	30
4. Caractérisation des protéases	31
4.1. Effet de la température.....	31
4. 2. La stabilité thermique	31

4. 3. Effet du pH.....	31
4. 3. Action de quelques effecteurs.....	32
4.5. Affinité des protéases vis-à-vis de différents substrats naturels.....	32
4.6. Détermination des paramètres cinétiques.....	32
4.7. Electrophorèse sur SDS PAGE et zymogramme	32
5. Evaluation des activités coagulantes.....	32
5.1. Comparaison de la coagulation des deux protéases avec celle de la présure.....	33
5.2. Effet du pH sur l'activité coagulante.....	33
5.3. Effet de la température sur l'activité coagulante.....	33
5.4. Effet des ions de calcium sur l'activité coagulante.....	33
6. Action des protéases et de la présure sur les caséines.....	33
6.1. Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse.....	33
6.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC.....	34
Chapitre 3 : Résultats et discussion des résultats	
1. Localisation de l'activité protéolytique chez <i>Onopordum acanthium</i> et <i>Galactites tomentosa</i>.....	35
1.1. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des plantes	35
1.2. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des fleurs	36
1.3. Séchage des échantillons par le CaCl ₂	37
2. Purification des protéases extraites à partir d'<i>Onopordum acanthium</i> et de <i>Galactites tomentosa</i>.....	38
2.1. Résultats de la précipitation par le sulfate d'ammonium.....	38
2.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	41
2.3. SDS-PAGE et zymogramme.....	44
3. Caractérisation des protéases purifiées.....	45
3.1. Affinité des protéases vis-à-vis de quelques substrats.....	45
3.2. Mesure des paramètres cinétiques	46
3.3. Effet du pH sur l'activité protéolytique.....	48
3.4. Effet de la température sur l'activité protéolytique.....	50
3.5. Stabilité thermique des protéases	51
3.6. Effet de quelques effecteurs sur l'activité des protéases d' <i>Onopordum acanthium</i> et de <i>Galactites tomentosa</i>	54
3.6.1. Effet des inhibiteurs.....	54

3.6.2. Effet des inhibiteurs	55
4. Application des protéases acides dans la coagulation du lait.....	56
4.1. Mesure de l'activité coagulante.....	56
4.2. Influence du pH sur le temps de floculation du lait.....	59
4.3. Influence de la température sur le temps de floculation du lait.....	60
4.4. Influence de la concentration du CaCl ₂ sur la MCA.....	62
5. Action des protéases d'<i>O acanthium</i> et de <i>G tomentosa</i> sur les caséines	64
5.1. Suivi par électrophorèse de la dégradation des caséines par les protéases.....	64
5.2. Suivi par RP- HPLC de la dégradation des caséines par les protéases.....	67
Conclusion générale et perspectives.....	73
Références bibliographiques.....	75
Annexes	
Production scientifique	
Résumés	

Introduction

Introduction

Les enzymes sont responsables des transformations biochimiques (catalyse) des molécules du vivant. De ce fait, la catalyse possède un fort potentiel pour des applications industrielles diverses et variées.

L'emploi des enzymes connaît un succès remarquable et ouvre des perspectives nouvelles ; les protéases en particulier possèdent un rôle important en biotechnologie. Celles-ci occupent la première place dans le marché mondial des enzymes (Leary *et al.*, 2009).

Les protéases entraînent de nombreux changements des propriétés tant immunologiques, que chimiques ou physiques ou biologiques des protéines. Elles sont utilisées dans plusieurs domaines: alimentaire, pharmaceutique, détergents, tannerie et traitement des eaux usées. L'hydrolyse des protéines alimentaires, par exemple, est mise en œuvre pour diverses fonctions: amélioration des caractéristiques nutritionnelles, retarder la détérioration, la modification des propriétés fonctionnelles différentes (solubilité, le moussage, la coagulation, et des capacités d'émulsifiants), prévention des interactions indésirables, changement de saveurs et d'odeurs et l'élimination des facteurs toxiques ou inhibiteurs (Pardo *et al.*, 2000).

Les protéases végétales sont impliquées dans de nombreux aspects de la physiologie et du développement des plantes (Van der Hoorn, 2008). Certaines protéases végétales sont utilisées bien avant que soient connues leur nature et leurs propriétés et certaines d'entre elles ont bien été identifiées et étudiées par de nombreux travaux tels que les protéases appartenant aux *Asteraceae*, les *Caricaceae*, les *Moraceae*, les *Asclepiadaceae*, les *Apocynaceae* et les *Euphorbiaceae* (Domsalla et Melzig, 2008). En effet, les protéases végétales sont l'objet d'une attention renouvelée de l'industrie pharmaceutique et de la biotechnologie, non seulement en raison de leur activité protéolytique sur une large variété de protéines, mais également parce que souvent elles sont actives sur un large intervalle de températures et de pH (Dubey *et al.*, 2007 ; Feijoo-Siota et Villa, 2010).

La coagulation du lait est traditionnellement obtenue par action de la présure extraite des caillettes provenant de veaux non sevrés. Le caractère irrégulier de l'approvisionnement en présure a conduit les industries à utiliser des préparations enzymatiques coagulant le lait dans

lesquelles la chymosine est remplacée plus ou moins totalement par d'autres enzymes à mode d'action analogue, et ce, parallèlement à l'usage traditionnel de la présure de veau qui assurait encore la coagulation de 90 % des fromages en 1980 (Desmazeaud, 1983).

En fromagerie, plusieurs plantes de la famille des *Asteraceae* ont été utilisées comme agent coagulant. En effet, 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 *Bouhezza*, *Aghoughlou*, *Djbenet Kemaria* sont réalisées en utilisant des plantes, particulièrement des fleurs de chardons et de figuier (Androuët, 2002).

Contrairement aux aspartyl protéases d'origine microbiennes et animales, les AP végétales ont reçu peu d'attention scientifique jusqu'à maintenant. Actuellement ces protéases suscitent un regain d'intérêt et peuvent avoir une application industrielle. En effet, Certaines aspartyl protéases de plantes ont montré des propriétés coagulantes similaires à la présure de veau et ont donc attiré l'attention dans l'industrie alimentaire.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles sources de protéase disponibles à moindre coût à partir de plantes endémiques du sol algérien. Pour cela, nous avons réalisé une étude en trois parties :

1. Extraction et purification des protéases à partir des deux chardons.
2. Caractérisation physicochimiques et étude cinétique des protéases préalablement séparées.
3. Evaluation des activités coagulante du lait,

Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1. Enzymes protéolytiques

Les enzymes sont des catalyseurs qui augmentent fortement les vitesses des réactions chimiques ; celles-ci sont multipliées par un facteur de 10^{12} à 10^{20} comparativement à une réaction non catalysée. Le pouvoir catalytique des enzymes permet de produire de nouvelles substances et de l'énergie indispensables au bon fonctionnement des organismes vivants. Les enzymes se caractérisent par une spécificité d'action permettant au technologues d'agir sélectivement sur un constituant d'un produit alimentaire sans en modifier les autres (Cerning *et al.*, 1984). Les protéases possèdent un grand intérêt pour les différentes industries ; actuellement, elles constituent le groupe le plus important d'enzymes industrielles (Figure 1). En effet, elles représentent 60% du total des ventes des enzymes (García-Gómez *et al.*, 2009), elles sont utilisées essentiellement dans les détergents (Gupta *et al.*, 2002) et les industries alimentaires (Sullivan et Calkins, 2010).

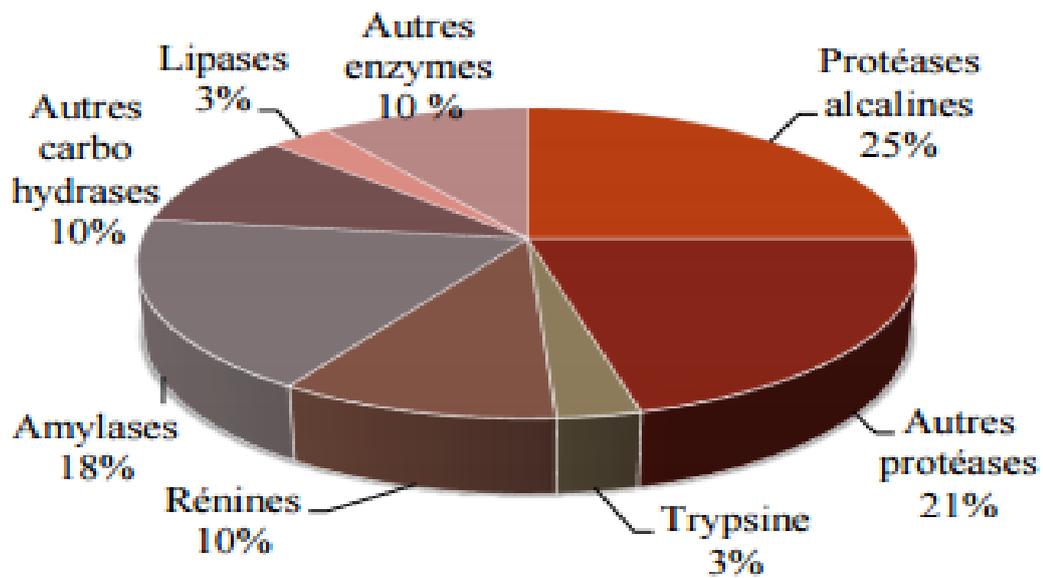


Fig1 : Distribution des ventes des enzymes (Rao *et al.*, 1998).

1.1. Définition des protéases

Les protéases peuvent être définies comme étant des enzymes capables d'hydrolyser les protéines par coupure d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques. Elles sont dénommées *peptidase* par l'union internationale de biochimie et biologie moléculaire (IUBMB), mais elles portent d'autres noms, comme *protéinases* ou *enzymes protéolytiques*.

1.2. Classification des protéases

Les enzymes sont classées par la commission des enzymes (C.E.) de l'IUBMB en six classes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases). Les protéases appartiennent à la sous-classe 4 des hydrolases (code E.C : 3.4.X.X).

Les protéases peuvent être classées elles-mêmes en protéases acides, neutres et alcalines, selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale (Kumar *et al.*, 2008a) ou en exopeptidases et endopeptidases, selon leur mode d'action; les premières hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités, les secondes agissent en divers points de la séquence (Pelmont, 1995 ; Palma *et al.*, 2002). Les protéases peuvent être classées également selon les acides aminés du site actif, ce qui permet de les regrouper en protéases à sérine (EC 3.4.21.X), les protéases à cystéine (EC 3.4.22.X), protéases à aspartate (EC 3.4.23.X), métalloprotéases (EC 3.4.24.X), etc. Cette dernière classification traduit les mécanismes catalytiques différents de chaque groupe.

1.3. Sources des protéases

la vaste distribution des protéases chez les plantes, les animaux, et les microorganismes démontre que ces enzymes sont nécessaires à la survie des organismes ; les protéases jouent des rôles physiologiques importants dans les différents processus biologiques (Rao *et al.*, 1998) .

1.3.1. Protéases d'origine animale

Les protéases d'origine animale sont utilisées dans le domaine alimentaire comme la présure ou dans le domaine médical tel que la trypsine et la chymotrypsine. Ces dernières sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (Rao *et al.*, 1998).

- **Présure** est un coagulant du lait d'origine animale extrait de la caillette (le quatrième estomac) de veaux non sevrés. La préparation est constituée de 80% de chymosine et de 20% de pepsine. Elle est employée pour la coagulation du lait dans la fabrication des fromages (Alais, 1975).

- **Trypsine** (EC 3.4.21.4) est une protéase digestive à sérine, l'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (Rao *et al.*, 1998). Cette enzyme est très utilisée pour des approches de recherche en protéomique, spécialement pour la caractérisation et le séquençage de protéines (Lehninger, 1982, Lee *et al.*, 2009).

En culture cellulaire la trypsine est utilisée pour détacher des cellules adhérant à d'autres cellules ou à une matrice. En effet, la trypsine clive les protéines membranaires d'adhésion, et les cellules se retrouvent alors en suspension (Lodish *et al.*, 2000)

- **Chymotrypsine** (EC 3.4.21.1) est une protéase digestive à sérine, elle est utilisée essentiellement dans les applications de diagnostic et d'analyse (Lehninger, 1982).

1.3.2. Protéases d'origine microbienne

Les protéases microbiennes peuvent être produites par les bactéries, les moisissures et les levures. Dès que le développement de la microbiologie a permis de mieux comprendre les systèmes qui président à la synthèse des enzymes chez les microorganismes, la production industrielle d'enzymes s'est orientée vers les processus fermentaires (Scriban, 1993). Les protéases d'origine microbiennes représentent 40% des enzymes du marché mondial (Sandhya *et al.*, 2005).

1.3.3. Protéases d'origine végétale

Les protéases végétales les plus connues sont extraites du papayer (*Carica papaya*), figuier (*Ficus glabrata*), ananas (*Ananas comosus*), sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*). Elles sont appliquées essentiellement dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (la papaïne, la ficine, la bromélaïne et cucumisine). D'autres protéases extraites de chardons (*Cynara scolymus*, *Cynara cardunculus*, *Silybum marianum*) permettent la fabrication de fromages traditionnels ; c'est le cas des cardosines et des cynarases.

- Papaïne

La papaïne est une cystéylprotéase extraite de latex des fruits d'une plante appelée *Carica papaya*. Le papayer est largement cultivé dans les régions équatoriales et tropicales. Cette protéase est souvent utilisée comme modèle dans les études de structure pour d'autres cystéylprotéases (CP). Elle est utilisée dans le domaine médical (Otsuki *et al.*, 2010) ainsi que le domaine alimentaire (Sullivan et Calkins, 2010).

- Ficine

La ficine est une cystéylprotéase extraite de la figue, elle est semblable à la papaïne dans la séquence d'acides aminés des résidus du site actif (Devaraj *et al.*, 2008). Cette protéase végétale est isolée à partir du latex séché de *Ficus glabrata*. Elle est également présente dans d'autres espèces de *Ficus*, comme *Ficus carica*. Une figue verte pesant entre 10 et 15 g contient environ 100 à 150 mg de protéases (Uhlig, 1998). Cette protéase est utilisée dans

l'industrie alimentaire pour améliorer l'attendrissement des viandes (Sullivan et Calkins, 2010).

- **Bromélaïne**

Elle fait parti des cystéylprotéases. Elle est découverte dès 1876. La présence de cette enzyme protéolytique dans d'ananas (*Ananas comosus*) confère à ce dernier des qualités diététiques remarquables. Les bromélaïnes sont extraites aussi bien des fruits que des tiges d'ananas, elles ressemblent à la papaine et à la ficine ; elles existent sous plusieurs formes, la fraction majeure se trouve dans les fruits et se nomme "bromélaïne de fruits"(EC.3.4.22.33) de 23KDa. Les autres fractions sont, la " bromélaïne de tige " ou ananase (EC. 3.4.22.32) de 23,8 KDa, l'ananaïne (EC 3.4.22.31) et la comosaïne (Napper *et al.*, 1994).

La bromélaïne de fruits possède une plus grande activité protéolytique que la bromélaïne de la tige (Polaina et Mac Cabe, 2007). Ces protéases sont très utilisées dans le domaine alimentaire comme la brasserie et l'attendrissement de la viande (Sullivan et Calkins, 2010) et aussi dans le domaine thérapeutique (Mueller et Mechler, 2005).

- **Cucumisine**

La cucumisine est une séréylprotéase de sarcocarpe de melon (*Cucumis melo*), elle 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 séréylprotéase (SP) microbienne. Elle possède une activité kératinolytique (Yoshida-Yamamoto *et al.*, 2010).

- **Cardosines**

Les cardosines sont des protéases à aspartate, elles sont utilisées dans la fabrication du fromage particulièrement dans les pays méditerranéens. 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). La cardosine B s'accumule dans la paroi cellulaire et dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission (Vieira *et al.*, 2001). 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. scolymus* (Sarmiento *et al.*, 2009).

- Cynarases

Les cynarases sont également des aspartylprotéases (AP). 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 est la cynarase A. Elle est utilisée comme agent coagulant du lait (Sidrach *et al.*, 2005).

2. Protéases végétales

Les protéases végétales sont regroupées selon leur action catalytique en protéases à sérine, à cystéine, à aspartate et en métalloprotéases (Bruno *et al.*, 2006). 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).

Les protéases végétales sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques des plantes, elles interviennent dans le renouvellement des protéines, la dégradation des protéines mal repliées, la sénescence (Beers *et al.*, 2000) et dans divers processus cellulaires, y compris les mécanismes de défense. En effet, ces protéases sont impliquées dans tous les aspects du cycle de vie allant du stockage des protéines pendant la germination des graines à l'initiation de programmes de sénescence et la mort cellulaire (Schaller, 2004).

2.1. Protéases végétales à sérine

Les protéases à sérine ont en commun le mécanisme de coupure, basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine. Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus comprenant en plus de la sérine, un aspartate et une histidine formant ainsi une triade pour que le groupement OH de la sérine soit très fortement polarisé. 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 se forme, puis, le produit d'hydrolyse est libéré (Kraut, 1977) (Figure 2).

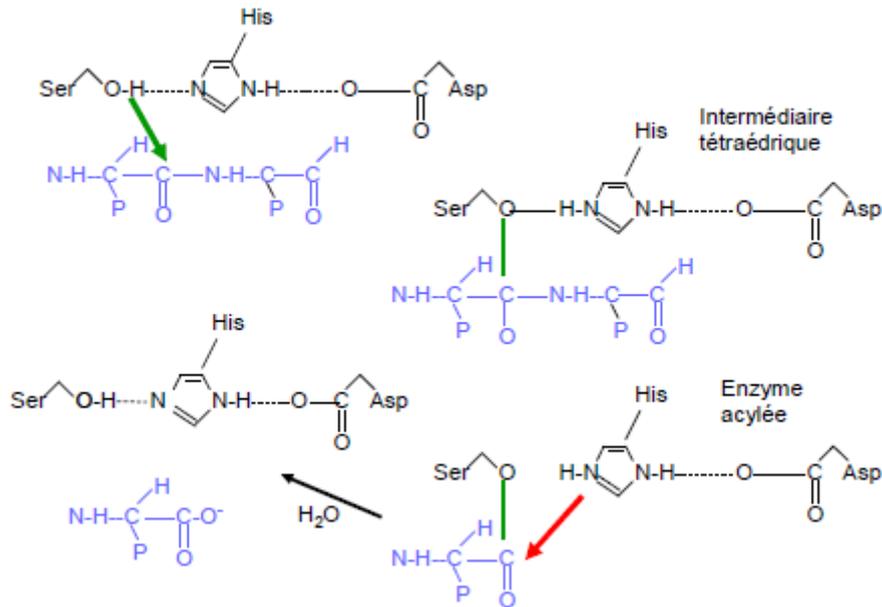


Fig2 : Mécanisme réactionnel des peptidases à sérine (Kraut, 1977).

Les protéases à sérine sont extraites d'un bon nombre d'espèces végétales ; elles sont répandues dans presque toutes les plantes (les arbres, les légumes et les herbes) mais beaucoup plus abondantes dans les fruits (Feijoo-Siota et Villa, 2010).

Les plus connues possèdent une masse molaire (MM) de 19 à 110 kDa ; la majorité a une MM comprise entre 60 et 80 kDa. Ces protéases possèdent en majorité un pH optimal alcalin (7-11), et une température optimale se situant entre 20°C-50°C (Antao et Malcata, 2005).

Ces protéases sont impliquées dans beaucoup de processus physiologiques tels que la microsporogénèse (Kobayashi *et al.*, 1994), la symbiose (Takeda *et al.*, 2007), la différenciation et la spécialisation des tissus des organes végétales (Berger et Altman, 2000), le stockage des protéines au début de la germination (Muntz *et al.*, 2001; Sutoh *et al.*, 1999) et la sénescence (Wang *et al.*, 2004; Distefano *et al.*, 1999). Les protéases végétales à sérine peuvent être induites par une attaque pathogène qui provoque une hypersensibilité causant la nécrose et la mort du tissu ((Tornero *et al.*, 1996).

2.2. Protéases végétales à cystéine

Les protéases à thiol ou cystéylprotéases sont des protéases dans lesquelles le nucléophile est le soufre de la cystéine (Barrett et Rawlings, 2001). Le premier pas du mécanisme catalytique est la déprotonisation du groupement thiol réalisée par un acide aminé adjacent possédant une chaîne latérale basique (souvent 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 3). L'histidine dans la protéase est restaurée sous sa forme déprotonisée et un intermédiaire thioester lie l'extrémité carboxy terminale du substrat à la cystéine. La liaison thioester est hydrolysée pour générer un acide carboxy-terminal et l'enzyme est restaurée (Storer et Ménard, 1994) (Figure 3).

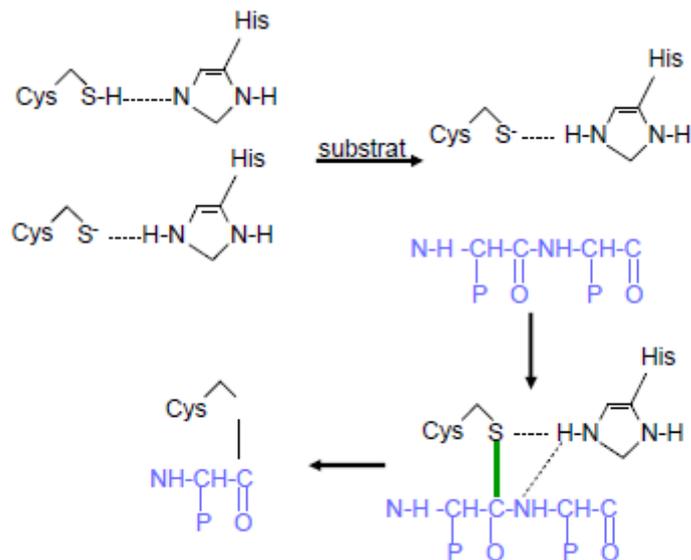


Fig3 : Mécanisme réactionnel des peptidases à cystéine (Storer et Ménard, 1994).

Ces protéases se retrouvent particulièrement dans les plantes tropicales comme *Carica papaya* (papaine, chymopapaine, caricaine et glycil endopeptidases), *Ananas comosus* (bromélaïne, ananaine et comosaine) et *Ficus glabrata* (ficine). Elles possèdent une importance considérable liée à leur capacité à hydrolyser différents substrats et à leur activité dans de larges intervalles de pH et de température (Feijoo-siota et Villa, 2010). Elles se ressemblent dans leurs structures et possèdent le même mécanisme catalytique, elles peuvent par contre se différencier dans la spécificité vis-à-vis des différents substrats (Storer et Ménard, 1994). La majorité des protéases de ce groupe présente un pH optimal compris entre 5 et 8 et une MM variant de 25 à 30 kDa, à l'exception d'une minorité dont la MM se situe entre 50 et 75 kDa (Dubey *et al.*, 2007).

Le rôle physiologique attribué à ces protéases par les plantes comprend non seulement leur implication dans la croissance et le développement, mais aussi dans la sénescence et le programme de la mort cellulaire (Martínez *et al.*, 2007). En plus de leur contribution dans la maturation des protéines, ces protéases dégradent et reconstituent les protéines lors de l'exposition de la plante aux différents *stimulus* externes (Grudkowska et Zagdanska, 2004).

Elles ont également un rôle à jouer dans l'accumulation et l'emmagasinage des protéines dans les graines (Okamoto et Minamikawa, 1995) et dans la défense des plantes contre les insectes. Il a été montré qu'une protéase à thiol de 33 kDa était capable d'inhiber la croissance des larves d'un parasite du maïs (Jiang *et al.*, 1995; Pechan *et al.*, 2000).

2.3. Protéases végétales acides

Les protéases acides possèdent deux acides aspartique dans leur site actif. Elles agissent selon un mécanisme général acide-base où 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 (carbone avec double liaison à une molécule d'oxygène) du substrat dans la liaison à cliver générant un oxyanion intermédiaire. C'est le réarrangement de cet oxyanion qui permet le clivage (Suguna *et al.*, 1987) (Figure 4).

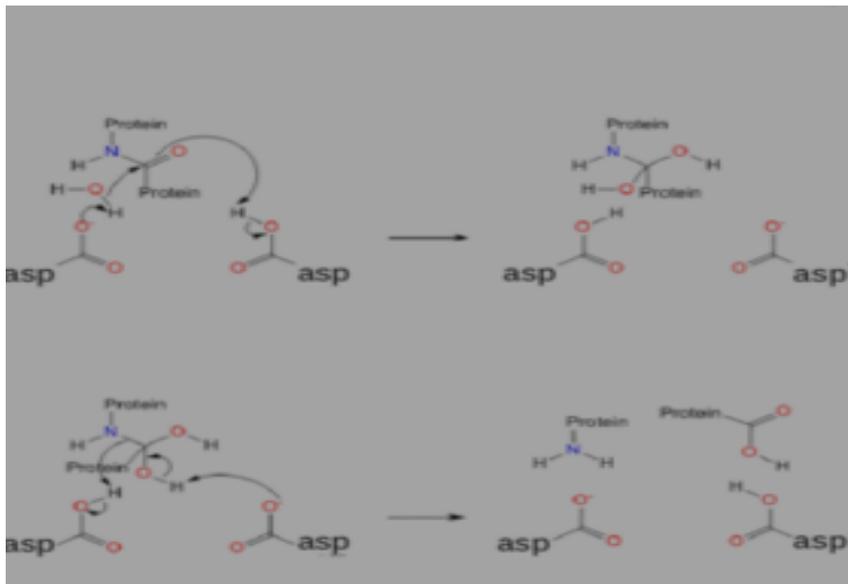


Fig4 : Mécanisme réactionnel des protéases acides (Chabriere, 2010) (1).

Ces protéases ont été détectées chez les monocotylédones comme l'orge, le riz et le blé (Asakura *et al.*, 1997) et aussi chez les dicotylédones comme le tournesol, le cacao, la tomate, *Cynara cardunculus* et *Centaurea calcitrapa* (Park *et al.*, 2001; Domingos *et al.*, 2000). Elles ont été caractérisées et purifiées à partir d'une variété de tissus tels que les graines et les fleurs (Mutlu *et al.*, 1998 ; Verissimo *et al.*, 1996). Ces protéases sont regroupées par le comité international de biochimie et biologie moléculaire (NC-IUBMB) sous l'appellation de « phytepsines » (3.4.23.40).

La majorité de ces enzymes sont hétérodimériques avec une MM comprise entre 28 et 35 kDa pour la plupart, et entre 11 et 16 kDa pour le reste. Un nombre réduit de ces enzymes sont monomériques avec une MM allant de 36 à 60 kDa (Mutlu et Gal, 1999). Physiologiquement, les protéases acides sont impliquées dans les processus du développement (Asakura *et al.*, 1997), le stockage des protéines (Hiraiwa *et al.*, 1997), la préparation de la mort cellulaire (Simoes et Faro, 2004) et lors d'un stress (Guevara *et al.*, 1999). Elles sont également impliquées dans la digestion des insectes chez les plantes carnivores (Takahashi *et al.*, 2009), de même qu'elles possèdent une fonction antimicrobienne ((Mendieta *et al.*, 2006).

2.4. Métalloprotéases végétales

Les métalloprotéases (MP) sont le plus grand groupe des protéases. La majorité de ces enzymes contient un ion Zn^{2+} dans leur structure qui active une molécule d'eau. L'ion est maintenu en place par trois acides aminés (His, Glu, Asp ou Lys) (Rawlings et Barrett, 1995).

L'atome de zinc participe à la catalyse en polarisant fortement la liaison carbonyle appartenant à la liaison peptidique coupée. Le carbone du carbonyle devient alors beaucoup plus électrophile, permettant une attaque par l'eau pour donner un intermédiaire instable bi anionique qui se coupe en libérant ainsi un acide aminé terminal ou un peptide. Leur spécificité est assez large, quoique dirigée vers les liaisons voisines d'un acide aminé hydrophobe (Collin et Delecourt, 1988). (Figure 5).

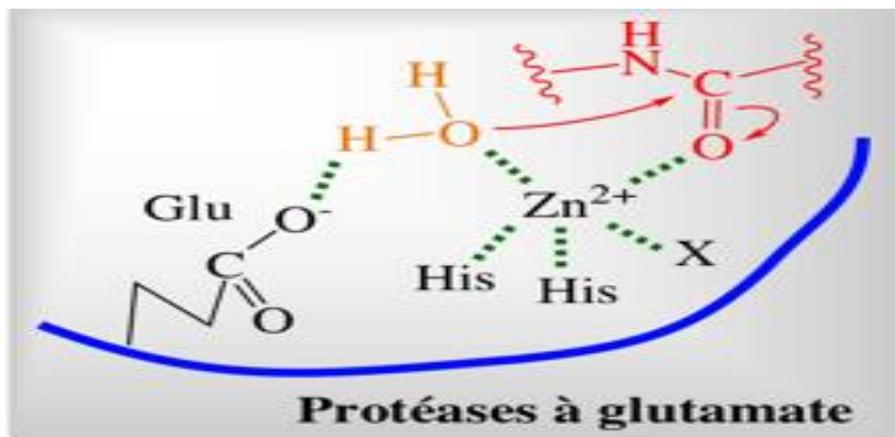


Fig5: Mécanisme réactionnel des métalloprotéases (Jaspard, 2013) (2)

En comparaison avec les autres protéases végétales, les MP d'origine végétale sont peu connues. Elles sont les plus diverses en termes de structure et de fonction et se regroupent en exo- et endoprotéases. Elles sont localisées dans différentes parties de la cellule végétale où elles sont dotées d'une grande spécificité enzymatique, mais peu d'entre elles ont été

caractérisées (Schaller, 2004). Ces protéases ont un rôle à jouer dans la physiologie ; en effet, la leucine aminopeptidase (LAP) qui est constitutivement présente dans toutes les espèces végétales (Bartling et Nosek, 1994; Chao *et al.*, 2000), est impliquée dans la régulation de la demi-vie de la protéine dans les plantes (Varshavsky, 1996). Certaines plantes de la famille des solanacées (Solanaceae) possèdent une LAP supplémentaire exprimée dans les organes reproducteurs jouant un rôle dans les conditions de stress, les blessures et les infections pathogènes (Chao *et al.*, 1999 ; Gu *et al.*, 1999 ; Hildmann *et al.*, 1992 ; Pautot *et al.*, 1993 ; 2001 ; Schaller *et al.*, 1995).

2.5. Applications des protéases végétales

Les protéases végétales intéressent de plus en plus les chercheurs et les industriels. La mesure de l'activité hydrolytique sur les substrats synthétiques est un moyen simple de connaître la spécificité de clivage de ces enzymes, ceci fournit des informations importantes pour les applications dans la biotechnologie (Silva et Malcata, 2005a) .

2.5.1. Dans l'industrie laitière

Durant longtemps l'homme a utilisé les extraits végétaux dans la coagulation du lait en remplaçant ainsi la présure animale. Parmi les espèces végétales utilisées on retrouve *Galium verum*, *Withania coagulans*, *Cynara cardunculus*, *Cynara scolymus*, *Cayduus nutans*, *Cnicus benedictus*, *Drosera peltata*, *Datura stramonium*, *Pisum sativum*, *Lupinus hirsutus*, *Ricinushirsutus*, *Pinguicula vulgaris*, *Leucas cephalotes*, *Crotalaria burhia*, *Rhazya stricta*, et *Streblus asper* (Wallace, 1922). Cependant l'utilisation des extraits végétaux dans l'industrie fromagère est limitée à cause de leur grande activité protéolytique (Lo Piero *et al.*, 2002).

La fabrication du fromage avec les coagulants de nature végétale est localisée dans les pays du bassin méditerranéen aussi bien dans le nord de l'Afrique que dans les pays situés dans le sud de l'Europe. L'Espagne et le Portugal produisent une grande variété de fromages traditionnels en utilisant des espèces végétales qui donnent une satisfaction du produit final, parmi ces espèces on retrouve : *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, et *Cynara scolymus* (Roseiro *et al.*, 2003). Les fromages sont fabriqués à partir de laits de caprins ou d'ovins en utilisant des extraits de fleurs séchés. Le produit issu est doux et crémeux et très apprécié mais parfois légèrement amer quand il est très affiné (Galan *et al.*, 2008). Les Espagnols ont le brevet pour la production d'extraits en poudre séchée de fleurs appartenant à l'espèce *Cynara* (Cáceres Arriba et Fernández, 2000).

Les espèces appartenant au genre *Cynara* contiennent le plus souvent plusieurs formes d'enzymes ce qui complique la purification et la caractérisation des protéases pour la recherche fondamentale. Pour cette raison, plusieurs aspartylprotéases (AP) de *Cynara sp* ont été clonées et exprimées avec succès dans des systèmes d'expression bactériens et eucaryotes comme cela a été le cas pour la cyprosinase B (cynarase 3) exprimée par la levure (Soares *et al.*, 2000) qui fut la première protéase de coagulation d'origine végétale produite par fermentation (Sampaio *et al.*, 2008). L'enzyme recombinante présente une protéolyse similaire à celle obtenue avec des enzymes naturelles présentes dans l'extrait brut à partir de *C. cardunculus* (Fernández - Salguero *et al.*, 2003).

2.5.2. Dans l'industrie alimentaire

Les protéases végétales sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. C'est le cas des protéases de type papaïne, ces dernières sont utilisées dans la brasserie, la fabrication des boissons industrielles, dans l'attendrissement de la viande et dans la préparation d'hydrolysats de protéines, considérés comme complément alimentaire (La Valle *et al.*, 2000).

- Panification

Les protéases végétales sont utilisées par l'industrie boulangère pour l'hydrolyse du gluten. Dans ce cas, la pâte est plus facilement manipulée et les produits issus à la suite de l'hydrolyse sont d'une plus grande qualité (Wang *et al.*, 2007a, b). L'hydrolyse par la bromélaïne entraîne des produits hypoallergiques car elle peut dégrader le gluten de la farine de blé (Tanabe *et al.*, 1996).

- Viande

L'attendrissement et le ramollissement de la viande ont été identifiés comme étant les facteurs les plus importants qui influent sur la satisfaction des consommateurs et la perception du goût (Miller *et al.*, 2001). Les études réalisées avec des enzymes végétales ont révélé que la papaïne présente une grande capacité à améliorer l'attendrissement de la viande, mais les changements dans la texture peuvent être affectés négativement. La bromélaïne augmente l'attendrissement de la viande en dégradant le collagène et les protéines contractiles, tandis que la ficine donne une dégradation plus équilibrée (Sullivan et Calkins, 2010).

2.5.3. Dans le domaine de la santé

Les études réalisées sur les AP de *Solanum tuberosum* ont révélé leur activité antimicrobienne (Guevara *et al.*, 2002) y compris l'activité antifongique (Mendieta *et al.*,

2006). Des clones ont été réalisés, exprimés et purifiés ; les résultats ont montré que la protéine recombinante produite maintient toujours son activité cytotoxique (Muñoz *et al.*, 2010). Ces protéines sont capables de tuer les bactéries pathogènes pour l'homme à une dose qui n'est pas toxique pour le sang humain dans les conditions expérimentales testées. Ces résultats pourraient contribuer à la génération de nouveaux outils pour résoudre le problème croissant de la résistance aux antibiotiques classiques (Zasloff, 2002).

2.5.4. Dans la chimie organique

La ficine, la papaïne et, à un degré moindre, la bromélaïne sont largement utilisées dans la synthèse des acides aminés et des peptides (Rai et Taneja, 1998 ; Theppakorn *et al.*, 2004 ; Lang *et al.*, 2009). Aussi, de nombreuses protéases à cystéines appartenant à *Araujia hortorum*, *Asclepias curassavica* et *Funastrum clausum* ont été testés avec de bons résultats pour la synthèse d'agents tensioactifs à base d'arginine (Morcelle *et al.*, 2009) .

2.5.5. Dans les détergents

L'utilisation des protéases alcalines modifiées chimiquement par l'industrie des détergents est étudiée mais peu d'informations sont publiées. Afin de pouvoir l'utiliser dans les détergents la papaïne a été modifiée chimiquement de sorte que le pH optimum change à une valeur plus basique (pH 9) et la température optimale devient 80°C (Khaparde et Singhal, 2001). La stabilité de la papaïne modifiée augmente par immobilisation. Cette enzyme peut être une alternative peu coûteuse pour les protéases alcalines qui sont utilisés dans les détergents (Roy *et al.*, 2005; Sangeetha et Abraham, 2006).

3. Astéracées

3.1. Généralités

La famille des astéracées fait partie de l'ordre des Asterales et se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme et sa grande variété écologique. Elle comprend au moins 23 000 espèces et 1 530 genres. Les asteraceae peuvent se rencontrer sur toute la surface du globe. Néanmoins, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique et le Sud-Ouest des Etats-Unis, les régions arides d'Amérique du Sud (Botineau, 2010). La plupart des espèces sont surtout des plantes herbacées vivaces ou annuelles, elles préfèrent les régions tempérées, subtropicales et tropicales, particulièrement les régions boisées (Heywood *et al.*, 1977).

Une étude effectuée dans la région de Ouargla dans le sud algérien a permis d'inventorier 37 espèces dont, 27 ont pu être échantillonnées sur terrain. Les familles les plus importantes sont les composées (13,51%), les graminées (10,81%), les cénopodiacées (8,10 %) et les labiées (8,10%). (Ould El Hadj *et al.*, 2003).

Ces plantes ont été longtemps utilisées pour traiter divers maladies grâce à leurs effets bienfaisants et thérapeutiques sur l'organisme (Benarous, 2006).

En raison de la présence des aspartylprotéases dans les fleurs de *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis* et *Cynara scolymus*, ces dernières sont traditionnellement employé comme présure végétale pour la fabrication du fromage (Reis *et al.*, 2000). L'activité coagulante du lait a également été démontrée chez les fleurs de *Centaurea calcitrapa*, *Onopordum turcicum* et *Onopordum acanthium* (Tamer, 1993 ; Domingos *et al.*, 1998 ; Brutti *et al.*, 2012) . Toutes ces espèces sont incluses dans la famille des Asteraceae (Ariza Espinar et Delucchi, 1998).

3.2. *Onopordum acanthium*

3.2.1. Description

Onopordum acanthium (acanthii Braun-Blanquet 1926) est une plante calcicole vigoureuse (0,30 à 1,80 m) muni d'une tige portant des ailes épineuses avec des feuilles divisées, à dents acérées. Les surfaces inférieures des feuilles sont recouvertes d'une couche épaisse de poils de coton ou de laine qui donne au feuillage un aspect gris-vert. Les capitules solitaires de 3 à 5cm, dont l'involucre globuleux possède de nombreuses écailles pointues, les extérieures renversées et des fleurs tubuleuses purpurines. Akènes grisâtre mouchetés de noir, tétragones et ridés, munis d'une aigrette rousse (Haldon *et al.*, 1975 ; Koochek *et al.*, 2000) (Figure 6)



Fig6: *Onopordum acanthium* (3)

3.2. 2. Nomenclature et classification

O. acanthium, appelé aussi chardon écossais, acanthe sauvage ou chardon des ânes (Bezanger *et al.*, 1990) se classe comme suit :

Règne	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Genre	<i>Onopordum</i>
Espèce	<i>Onopordum acanthium</i> L

3. 2.3. Ecologie et habitat

Originnaire d'une vaste zone d'Europe, *Onopordum* est largement répandu dans la région méditerranéenne où se retrouve la plupart des espèces. L'espèce *O. acanthium* est présente dans les zones habitées, notamment dans les lieux ensoleillés où le sol est riche (Mucina, 1989). Aux États-Unis, il est considéré comme plante envahissante (Haldon *et al.*, 1975) ; dans l'ouest américain, le chardon écossais infeste les prairies humides et les pâturages (Jack *et al.*, 1970). En Europe, il est bien établi dans les zones continentales en été quand le climat est sec (Mucina, 1989). Il est souvent associé à des lieux de déchets, les rivières, les ruisseaux, les canaux ou autres cours d'eau. Il peut être également abondant dans les pâturages secs, les champs et les parcours (Dewey, 1991). La plante se développe dans la lumière et les sols sablonneux ou rocailloux (Piper, 1984). La température, l'humidité, plutôt que les concentrations de nutriments du sol, déterminent la performance écologique des espèces *Onopordum* (Austin *et al.*, 1985).

3.3. *Galactites tomentosa*

3.3.1. Description

Galactites tomentosa (Moench, 1794) est très épineuse et d'une hauteur, très variable qui va de 20 à 80 cm, sa tige est très ramifiée en haut, tomenteuse. Les feuilles sont longues, étroites, profondément dentées, presque ailées, épineuses, cotonneuses en dessous et vertes en dessus, mais chargées de taches laiteuses (De Monet *et al.*, 1805). Les capitules des fleurs de *G. tomentosa* sont assez grands (3 cm de diamètre environ), avec un involucre formé de

nombreuses bractées érigées, terminées par de longues épines, souvent entourées d'un voile arachnéen. Toutes les fleurs sont tubulées. Les extérieures sont grandes et rayonnantes, de couleur pourprée ou violacée (il existe aussi des spécimens à fleurs presque blanches), stériles, profondément découpées en cinq lanières rigides alors que les intérieures sont plus petites. Les fruits sont des akènes bruns et glabres, à peu près cylindriques, portant des aigrettes à soies plumeuses <http://ephytia.inra.fr> (4) (Figure 7).



Fig7: *Galactites tomentosa* (3)

3.3.2. Nomenclature et classification

Appelé aussi le Chardon laiteux, *Galactite* cotonneux ou encore *Galactites* est une espèce de plante herbacée d'origine méditerranéenne de la famille des *Asteraceae*. Le nom scientifique du genre évoque en grec le lait, allusion à la couleur laiteuse des tiges et surtout aux nervures blanchâtres des feuilles des *Galactites*. L'espèce la plus connue est *Galactites tomentosa* Moench découverte pour la première fois en 1794 par le botaniste allemand Conard Moench. La plante se classe comme suit.

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

3.3.3. Ecologie et habitat

Cette plante est présente beaucoup plus dans l'ouest du bassin méditerranéen ; elle est moins fréquente le long des côtes atlantiques. Elle préfère les terrains sablonneux et secs, avec une légère appréciation des sols acides. La floraison a lieu au mois d'avril à août. <http://www.tela-botanica.org/> (3)

3.4. Utilisations des asteracées

3.4.1. Dans la médecine

Onopordum acanthium est une plante connue depuis longtemps pour de nombreux effets de ses extraits. Des études ont montré l'action cardiostimulante et hypotensive des fleurs fraîches (Haldon *et al.*, 1975) ; c'est ainsi qu'un produit constitué d'une composition d'extraits de fleurs d'*Onopordum acanthium* et de *Primula officinalis* a permis d'obtenir un médicament, le « Caridiodoron® », utilisé pour traiter les perturbations fonctionnelles du système cardiovasculaire et régler le système rythmique (Cyzar *et al.*, 2002 ; Jeschke *et al.*, 2009).

Les extraits des fleurs de la plante sont utilisés par la médecine traditionnelle iranienne dans le traitement des plaies ; ils permettent de réduire les ulcères de la peau (Koochek *et al.*, 2000).

Une préparation appelée « Gatuline-Skin-Repair-Bio® » est utilisée pour la régénération, la restructuration et la protection de la peau (Moyrand, 2010).

3.4.2. Dans l'agriculture

Les plantes spontanées ont très vraisemblablement un rôle écologique à jouer dans le contrôle des populations de ravageurs tels que la mouche de l'olive. Etant elles-mêmes parasitées par un diptère, de nombreuses composées semblent présenter des intérêts écologiques (Ricci et Ciricifolo, 1983 ; White, 1991). Parmi ces plantes, on retrouve des composées (*Carthamus oxyacantha* Bieberstein, *C. glaucus* Bieberstein, *Cnicus benedictus* L., *Silybum marianum* L., *Sonchus oleraceus* L., *Cynara cardunculus* L., *Galactites tomentosa* Moench, *Atractylis carduus* Forsskal) et des centaurees (*Centaurea cyanus* L., *C. moschata* L., *C. americana* Nuttal, *C. iberica* Sprengle, *C. calcitrapa* L.) (Viggiani, 1963).

Ces différentes espèces herbacées, souvent négligées, voire considérées comme des adventices, se retrouvent rarement aujourd'hui dans les vergers. Leur reconnaissance est un préalable à leur sauvegarde, et à leur réhabilitation pour aider l'oléiculteur (Warlop, 2006).

3.4.3. Autres utilisations

Une série d'expériences réalisées sur une bio huile a montré que l'huile obtenue à partir d'*Onopordum acanthium* pourrait être utilisée comme un des carburants renouvelables. En effet, la bio-production de pétrole est réalisée à partir d'*Onopordum acanthium* par pyrolyse lente (Garcel, 2011).

Ce chardon est parfois cultivé et vendu comme plante ornementale, pour le caractère très décoratif du feuillage et des capitules.

4. Coagulation du lait par les protéases

La coagulation du lait est provoquée par la dénaturation de la caséine, protéine majoritaire du lait. Les différentes caséines sont organisées en micelles. C'est un complexe de protéines phosphorées précipitant à pH 4,6, ou bien sous l'action d'enzymes spécifiques. Un grand nombre d'enzymes protéolytiques d'origine animale, végétales, microbiennes et de synthèse présente la capacité à coaguler le lait (Dalglish, 1997). La plus connue de ces enzymes et la plus utilisée est la présure animale. Le mode d'action de cette protéase a été largement étudié ; il est le résultat de l'activité de deux enzymes, la chymosine et la pepsine. La coagulation du lait se déroule en trois phases : primaire, secondaire et tertiaire.

4.1. Les micelles de caséine

Les micelles sont des particules sphériques d'un diamètre compris entre 20 et 300 nm constituées à 92 % des caséines α_{s1} , α_{s2} , β , κ . Les caséines γ sont, pour leur part, des fragments peptidiques issus de la dégradation de la β -caséine par la plasmine. Le 8 % restant de la micelle correspond aux composants salins dont les deux plus importants sont le calcium et le phosphore (Ribadeau Dumas, 1991). Les micelles sont fortement hydratées.

La caséine κ joue un rôle majeur dans la stabilité des micelles, elle se trouve principalement à la surface des micelles en position facilement accessible aux enzymes protéolytiques du milieu. Les micelles sont constituées de submicelles. Ces dernières sont reliées entre elles par des ponts phosphate de calcium. La composition des sous-micelles au centre et en périphérie est différente. En effet, les caséines β et α_{s1} sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe alors que la partie externe, davantage hydrophile, est formée de caséine α_{s1} , α_{s2} et κ (Amiot *et al.*, 2002) (Figure8).

Les autres protéines du lait sont présentes dans la phase aqueuse et constituent les protéines du lactosérum ; ce sont les albumines, les globulines et les protéines mineures.

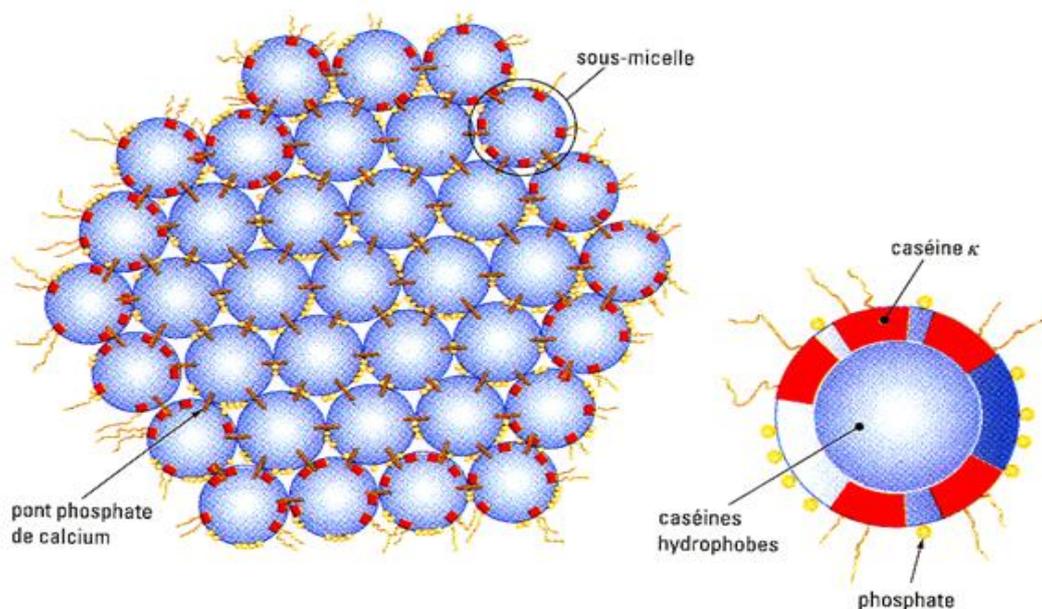


Fig8 : Modèle d'une micelle de caséine et d'une sous-unité (Amiot *et al.*, 2002).

4.2. Stabilité des micelles de caséines

La formation de micelles grâce à la caséine kappa, ou κ -caséine, permet une homogénéité du lait et donc une stabilisation de son émulsion. La stabilité de l'édifice micellaire est due à deux facteurs, la charge électronégative des caséines qui crée une barrière énergétique empêchant toute agrégation et le degré d'hydratation où l'eau forme autour de chaque micelle une enveloppe d'hydratation protectrice. Tout facteur susceptible de rompre cet état provoquera la coagulation. C'est ce que réalise la présure en hydrolysant la caséine κ , localisée en grande partie en surface de micelles (Figure 8), au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆. En effet, cette protéolyse limitée conduit à la libération dans le lactosérum d'un peptide, le cséinomacropéptide (CMP) aux caractères hydrophile et anionique marqués. L'autre partie de la molécule de caséine κ , la para-caséine κ reste associée aux autres caséines dans la micelle. La surface de cette dernière devient beaucoup moins électronégative et plus hydrophobe. Ces changements bouleversent l'équilibre entre les forces attractives et répulsives et conduisent à la formation du gel par l'agrégation des micelles (Mouranche et Costes, 1984).

4.3. Phases de coagulation

La coagulation du lait est divisée en trois étapes : la phase d'hydrolyse enzymatique (phase primaire), la phase d'agrégation (phase secondaire) et la phase de formation du gel (phase tertiaire) (Fox, 1981 et Lucey, 2002) (Figure 9)

4.3.1. Phases primaire

Lors de la phase primaire de l'hydrolyse enzymatique, l'enzyme coupe le lien peptidique Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la caséine κ et la protéine est scindée en deux peptides, le CMP et la para-caséine κ . L'hydrolyse progressive de la caséine κ durant la phase primaire altère les propriétés des micelles (Lucey, 1995).

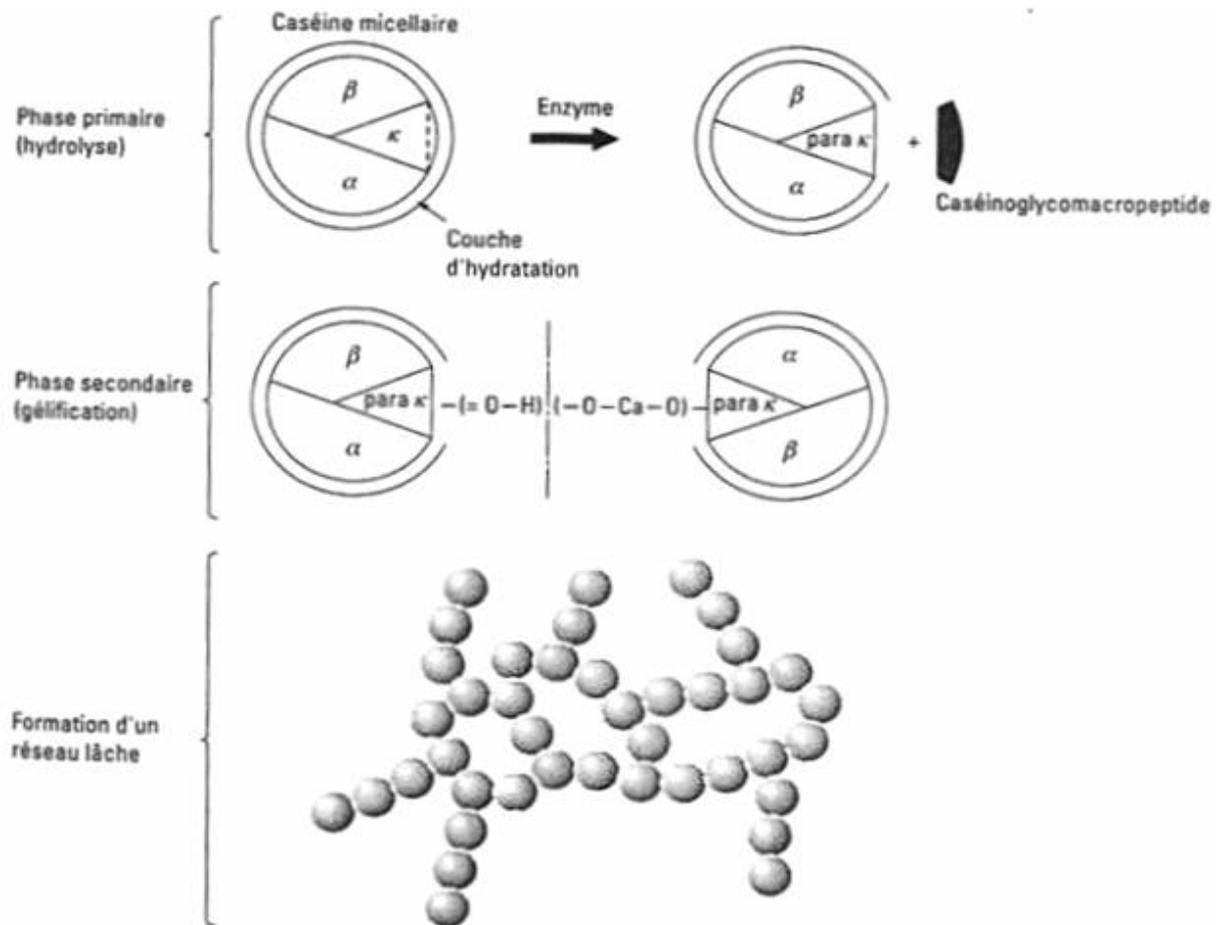


Fig9 : Phases du processus de coagulation enzymatique du lait (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

4.3.2. Phase secondaire

La phase secondaire correspond à la phase physique, au cours de laquelle les micelles déstabilisées peuvent se rapprocher et former des liens hydrophobes. L'agrégation devient possible lorsqu'un certain degré d'hydrolyse est atteint puisqu'il existe un niveau minimum de caséine κ nécessaire à la stabilisation de la micelle (Horne *et al.*, 1993). La phase secondaire ou coagulation proprement dite ne débute que lorsque la phase enzymatique est presque terminée, environ 85 % de la caséine κ est alors hydrolysée (Green *et al.*, 1978).

4.3.3. Phase tertiaire

La troisième phase mène à la formation d'un réseau tridimensionnel continu nommé gel. Les agrégats augmentent d'abord de taille. Par la suite, la réticulation entre les chaînes et la fusion des particules transforment le lait en gel (Ruettiman et Ladisch, 1987). Le caillé se raffermi

4.4. Facteurs influençant la coagulation

De nombreux facteurs influencent la coagulation du lait. Ce sont principalement la concentration en enzyme, la température, le pH, la teneur en calcium et la dimension des micelles (Li et Dalgleish, 2006).

4.4.1. Concentration en enzyme

La concentration en enzyme est inversement proportionnelle au temps de coagulation (Horne et Muir, 1994), la fermeté du gel augmente avec la concentration en présure (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

4.4.2. Température

L'agrégation des micelles dépend de la température et n'a pas lieu à des basses températures (Mouranche et Costes, 1984). L'activité enzymatique est influencée par la température. La présure montre une activité maximale entre 30 et 42 °C et est inhibée à des températures supérieures à 55 °C (St-Gelais et Tirard-Collet, 2002).

4.4.3. pH

L'influence du pH sur la coagulation du lait est double. Tout d'abord, le pH optimal de l'action enzymatique, la chymosine par exemple est plus active à des valeurs de pH entre 5,3 et 5,5 (Lenoir *et al.*, 1997; Fox, 1993). Ensuite, l'acidification mène à la neutralisation des charges de répulsion puisque le nombre de charges positives augmente, ce qui déstabilise la micelle et permet davantage d'attraction électrostatique entre les micelles (Renault *et al.*, 2000). La diminution du pH mène également à la solubilisation du phosphate de calcium micellaire et fait augmenter le calcium soluble. Le calcium qui se lie à la surface des micelles contribue à modifier leur charge nette en plus d'accroître l'efficacité des collisions entre l'enzyme et le substrat (Roupyas, 2001).

4.4.4. Concentrations en calcium

Le calcium est essentiel à l'agrégation des micelles, l'ajout de CaCl₂ en fromagerie stimule la coagulation. De faibles variations de la teneur du lait en calcium influent sur la phase secondaire et modifie nettement la vitesse de coagulation. Les laits pauvre en Ca⁺⁺ coagulent

plus difficilement et sont qualifiés de laits « lents » par les fromagers. Le défaut peut être corrigé par l'ajout de CaCl_2 (Mouranche et Costes, 1984).

4.4.5. Diamètre micellaire

Le rayon de la micelle de caséine est inversement proportionnel au contenu en caséine κ (Horne *et al.*, 1997). Les micelles de petites tailles fusionnent plus étroitement entre elles et sont donc caractérisées par la formation d'un réseau protéique plus dense, plus cohérent et plus ferme que celles de grande taille (Delacroix-Buchet *et al.*, 1993 ; Lenoir *et al.*, 1997 ; Roupas, 2001).

5. Méthodes d'extraction, de purification et de caractérisation des protéases

Le but de la purification est d'éliminer sélectivement les autres composants du mélange afin de pouvoir caractériser l'enzyme. Les méthodes de séparation et de caractérisation sont réalisées en plusieurs étapes : extraction, tamisage moléculaire, et détermination de la masse moléculaire. En utilisant essentiellement les méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

5.1. Extraction

L'extraction des protéases permet la libération du contenu cellulaire. Une des approches qui a été développée la première est celle du broyage mécanique, essentiellement dérivé des mortiers et des pilons utilisés en chimie ou en pharmacie. Cependant, cette technique est utilisée pour certaines applications spécifiques où le matériel est sous forme solide, sèche ou congelée, cette approche se prête mal au matériel biologique en milieu liquide.

Le broyage par le biais d'un mortier en présence de l'azote liquide est un exemple de techniques simple d'utilisation. Cette méthode d'extraction n'est pas coûteuse et permet de conserver l'activité des enzymes. Etant donné la disponibilité du matériel et des produits utilisés dans le protocole ainsi que sa simplicité et sa fiabilité. Cette technique est utilisée particulièrement pour l'extraction des protéases végétales, c'est le cas des protéases de *Cynara Scolymus*, de *Cynara cardunculus*, de *Centaurea calcitrapa*, de *Sylibum marianum* (Lorente *et al.*, 2004; Silva et Malcata, 2005b; Salvador *et al.*, 2006; Vairo Cavalli *et al.*, 2005).

5.2. Précipitation

La précipitation sélective des protéines comme première étape d'une purification est obtenue par addition de solvants organiques ou de sels minéraux. L'utilisation du sulfate d'ammonium

permet de précipiter les protéines présentes dans une solution aqueuse dans un certain intervalle de concentration en sel selon la nature de la protéine à extraire. La solubilité en solution aqueuse d'une protéine globulaire est liée à ses groupements chimiques de surface. Les zones de surface au contact de l'eau d'une protéine sont soit hydrophobes ou hydrophiles; Les motifs de surface responsables de la solubilité dans l'eau sont évidemment les motifs hydrophiles (par interactions électrostatiques avec l'eau et/ou par liaisons hydrogène avec l'eau). Les zones hydrophobes au contact avec l'eau sont "défavorables" à la solubilisation. Si on élève fortement la concentration en sulfate d'ammonium, l'eau disponible pour la solubilisation d'une protéine va diminuer, elle est "détournée" vers la solvatisation du sulfate et de l'ammonium et la protéine va former des agrégats protéiques, essentiellement par interactions hydrophobes entre les zones hydrophobes de surface (Kamoun, 1987).

Selon Kent (1999), l'utilisation du sulfate d'ammonium dans la concentration des protéines présente des avantages, c'est une méthode rapide et peu coûteuse, elle ne modifie pas la structure et la fonction des protéines et le sel peut être facilement retiré de la solution de protéine par simple dialyse.

Cette méthode a été utilisée comme première étape pour la purification des protéases de *Centaurea calcitrapa*, *Synergistes sp.*, *Aspergillus niger*, (Raposo et Domingos, 2008 ; Kumar *et al.*, 2008b; Fazouane *et al.*, 2010). Des extraits coagulants le lait de graines de *Solanum dubium* sont concentrés par l'AS (Ahmed *et al.*, 2010).

Le précipité enzymatique est séparé par centrifugation réfrigérée afin d'éviter les risques de dénaturation (Hainque *et al.*, 2008). La centrifugation permet de séparer les molécules selon leur densité. Les vitesses utilisées varient de 400 à 10 000 g et dépendent du rayon des rotors de l'appareil.

5.3. Méthodes chromatographiques

5.3.1. Tamisage moléculaire

Le principe du tamisage moléculaire ou exclusion stérique ou par *gel filtration* vise à séparer les molécules en fonction de leur taille. Les molécules de grande taille sont exclues. Les plus petites molécules sont retenues par le gel qu'elles quittent dans l'ordre inverse de leurs masses moléculaires (Kamoun, 1987). Plusieurs supports sont utilisés pour la purification des protéases, en particulier le Sephadex G100 et G75. La gel filtration sur G100 est utilisée

comme seule étape de purification de la protéase de *Synergistes sp.* (Kumar *et al.*, 2008b) et de de *Sardinella aurita* (Ben Khaled *et al.*, 2011).

Pour la protéase issue du gingembre le tamisage moléculaire sur Sephadex G 75 est aussi utilisée (Hashim *et al.*, 2011). Kumar *et al.* (2005) ; Fazouane *et al.* (2010) ont également employés une exclusion moléculaire afin de purifier des protéases de *Rizopus oryzae* et d'*Aspergillus niger* respectivement.

5.3.2. Chromatographie d'échange d'ions

Les méthodes d'échange d'ions dépendent des charges portées par les molécules protéiques à séparer. A son point isoélectrique, la protéine n'est pas chargée, mais à des pH au-dessous de cette valeur, la protéine sera chargée négativement. A des pH au dessus du pH isoélectrique la protéine se chargera négativement (Ferdinand, 1976)

Les échangeurs d'ions sont des substances hautement polymérisées constituant un réseau tridimensionnel et portant des fonctions ionisables, ayant les propriétés d'échanger les molécules chargées de façon réversible (Audigie *et al.*, 1995). La chromatographie d'échange d'ions permet la purification des enzymes et en particulier les protéases. Plusieurs auteurs ont utilisés cette méthode dans la séparation des protéases végétales, c'est le cas de Sidrach *et al.* (2005) et Salvador *et al.* (2006).

5.3.3. Chromatographie liquide à haute pression

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP ou HPLC) est une méthodologie qui permet de réaliser au maximum les qualités de la méthode chromatographique : très petite quantité de l'échantillon à analyser, extrême sensibilité et grand pouvoir séparateur (Kamoun, 1987).

Selon la polarité de la phase stationnaire on distingue deux situations de principe :

- si la phase stationnaire est polaire, on utilisera une phase mobile peu polaire la chromatographie est dite en phase normale ; l'inconvénient dans ce cas est une détérioration rapide au cours du temps du gel de silice, ce qui entraîne un manque de reproductibilité des séparations.
- si la phase stationnaire est très peu polaire, on choisira une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau), c'est la chromatographie en phase inverse ; contrairement à une phase normale, il n'y a pas d'évolution de la phase stationnaire au cours du temps, et la qualité de la séparation est donc maintenue constante.

Avec une phase inversée, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec la phase normale. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. En modifiant la polarité de la phase mobile, on agit sur la rétention des composés.

Pour la séparation des protéines, la technique utilisée est la phase inverse. Elle a été utilisée pour la séparation des différentes caséines hydrolysées (Vairo Cavalli *et al.*, 2005 ; Egito *et al.*, 2007 ; Merheb-Dini *et al.*, 2010 ; Bruno *et al.*, 2010).

5.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est l'une des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie, mais elle est principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques. Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur charge électrique et pour des charges identiques, en fonction de leur taille.

L'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, ou SDS-PAGE, est une technique utilisée dans la séparation des protéines ; elle se base uniquement sur la taille des molécules (Laemmli, 1970). En milieu basique (pH8,8), le SDS est adsorbé sur les protéines, les chargeant négativement. La matrice est créée par polymérisation d'acrylamide et du bis-acrylamide. C'est une technique qui permet de vérifier la pureté de l'enzyme au cours de la purification et d'identifier si l'enzyme possède une structure monomérique ou oligomérique, elle permet aussi de déterminer le poids moléculaire. Associée à un zymogramme, cette technique a permis d'étudier l'homogénéité et d'estimer la MM de plusieurs protéases (Salvador *et al.*, 2006; Hashim *et al.*, 2011 ; Raposo et Domingos, 2008).

Matériel et Méthodes

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

Les plantes étudiées appartiennent à la famille des composées, il s'agit d'*Onopordon acanthium* et de *Galactites tomentosa*. Elles ont été récoltées en mai pour la première et en avril pour la seconde entre 2010 et 2012. L'estimation du poids est réalisée sur un échantillon de 30 plantes par la pesée de chaque partie des plantes (les feuilles, les tiges et les fleurs) et le calcul des moyennes.

L'extrait brut est préparé en suivant les étapes suivantes : séchage de l'échantillon végétal, broyage et clarification

Le séchage est réalisé par dessiccation en présence du CaCl_2 dans des flacons en verre fermés. Le broyage des fleurs séchées est effectué à l'aide d'un mortier en présence d'azote liquide. La poudre obtenue est solubilisée dans du tampon citrate/sodium 0,05 M, pH 5,5 (1 g pour 7 ml) et conservée au réfrigérateur toute la nuit ; la solution est alors filtrée sur de la gaze puis centrifugée à 15000 g pendant 20 min à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse Sigma216KL.

2. Purification

La purification est réalisée en deux étapes successives : la précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium suivie d'une dialyse et la chromatographie d'exclusion moléculaire. Après chaque étape, l'activité protéolytique totale, la concentration en protéines totales et l'activité spécifique sont dosées.

2.1. Précipitation par le sulfate d'ammonium

Une précipitation fractionnée de 30% à 80% de saturation est effectuée sur l'extrait brut sous agitation durant une heure dans un bain de glace. Elle est suivie par une centrifugation à 15000 g pendant 30 min à 4°C. Le culot récupéré est dissout dans du tampon citrate/sodium (0,05 M, pH 5,5) quand au surnageant, il subit une autre précipitation. A la fin, on obtient 4 fractions : 3 culots 30%, 60%, 80% et le surnageant de 80% de saturation. Chaque fraction subit des dosages de l'activité protéolytique et des protéines afin de déterminer la fraction qui donne la meilleure activité protéolytique.

2. 2. Dialyse

Les fractions obtenues après chaque précipitation sont dialysées dans des sacs de cellophane (bag 260CT de 2 cm de diamètre) contre du tampon citrate/sodium 0,05 M, pH 5,5 (500 ml de

tampon/10 ml d'échantillon) à 4°C pendant 24 h sous agitation modérée. Les membranes de dialyse sont préalablement « nettoyées » par trempage dans différentes solutions (Annexe 1).

2. 3. Chromatographie d'exclusion sur Sephadex G100

La séparation de la protéase est réalisée par chromatographie sur une colonne (50 cm x 1,5 cm) avec du gel Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) préalablement gonflé à l'aide du tampon de citrate/sodium (0,05 M, pH 5,5). Un volume de 1 ml de l'extrait enzymatique concentré et dialysé (issu de la précipitation à 30% de saturation) est déposé au sommet de la colonne équilibrée par le même tampon ; l'éluât est collecté par fractions de 2 ml. Sur chaque fraction sont mesurés l'activité protéolytique et l'absorbance à 280 nm. Les fractions correspondant au pic d'activité subissent un dosage des protéines afin de déterminer l'activité spécifique et sont rassemblées et lyophilisées pour les études ultérieures.

3. Méthodes de dosages

3. 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 ; conformément à la technique décrite par Mechakra et al. (1999). Les solutions nécessaires et le mode opératoire sont détaillés en **annexe 1**.

L'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 80 µg /ml (**Annexe 2**). L'unité de l'activité protéolytique correspond à 1µg de la tyrosine libéré par 1ml d'extrait enzymatique en une heure d'incubation. La concentration de la tyrosine contenue dans le filtrat est déduite par référence à une courbe d'étalonnage de la tyrosine (**Annexe 2**).

3. 2. Dosage des protéines selon la méthode le LOWRY (1951)

Le réactif de Folin-ciocalteu réagit avec les acides aminés aromatiques présents dans les protéines. L'absorbance du produit coloré est lue à 750 nm. La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution de BSA (Sigma Aldrich) avec des concentrations comprises entre 0 et 500 µg/ml (**voir annexe 2**). Les solutions nécessaires au dosage et le mode opératoire sont décrits en **annexe 1**

4. Caractérisation des protéases

La fraction préalablement purifiée est utilisée pour déterminer les propriétés suivantes: le pH optimal, la température optimale, la stabilité thermique, l'effet de différents substrats protéiques naturels, l'effet de quelques effecteurs, la cinétique enzymatique et la masse molaire.

4. 1. Effet de la température

L'influence de la température sur l'activité protéolytique est mesurée de 20 à 70°C à pH 5,5 avec des intervalles de 5°C. L'optimum est déterminé en traçant la courbe de l'activité protéolytique en fonction de la température.

4. 2. La stabilité thermique

Les essais de la stabilité thermique sont réalisés à 60°C à pH 5,5 dans un bain-marie (memmert) pendant des temps variant de 10 à 60 minutes. Après chauffage, les tubes sont immédiatement refroidis par immersion dans l'eau glacée.

Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) qui correspond à la perte de la moitié de l'activité enzymatique totale est déterminé par la représentation graphique linéaire selon l'équation suivante :

$$\log.v = -k_{in} / 2,3 + \log.v_0$$

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 $\ln 2 / k$

4. 3. Effet du pH

Le pH optimal est mesuré par dosage de l'activité protéolytique à des pH variant de 2 à 7. Sachant que la caséine précipite aux pH inférieurs à 4,6, celle-ci est remplacée par l'hémoglobine dénaturée (Vairo Cavalli *et al.*, 2005) . L'optimum est déterminé en traçant l'activité protéolytique de chaque protéase en fonction des pH. La préparation de l'hémoglobine dénaturée se trouve en **annexe 1**.

4.4. Action de quelques effecteurs

L'effet de trois effecteurs (pepstatine-A à 1 et 10 mM, l'EDTA à 10 mM et l'iodoacétamide à 10 mM) et des ions métalliques à 10 mM (CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂, ZnCl₂ et HgCl₂) sur l'activité des protéases purifiées à partir d'*Onopordum acanthium* et *Galactires tomentosa* est évalué. Le mélange enzyme-effecteur est incubé pendant 2h à température ambiante. L'activité protéolytique résiduelle des échantillons est calculée par rapport au contrôle.

4.5. Affinité des protéases vis-à-vis de différents substrats naturels

Le dosage de l'activité protéolytique sur différents substrats : BSA, hémoglobine, ovalbumine et caséine (Sigma) est réalisé afin de déterminer le meilleur substrat. Les protéines utilisées sont dissoutes à une concentration de 2,5 % (w/v) dans du citrate de sodium à 0,02 M, pH 5,5.

4.6. Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques (V_m et K_M) des protéases sont déterminés à partir de la représentation graphique de Lineweaver-Burk en utilisant des concentrations de substrat de 0,25 à 2,5 % avec un intervalle de variation de 0,25 %.

4.7. Electrophorèse sur SDS PAGE et zymogramme

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 charge, 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 des laboratoires *Bio-Rad*. La migration est menée à une intensité de 40 mA. La révélation des protéines séparées est réalisée par la coloration du gel au bleu de Coomassie (R-250) pendant toute la nuit. Le gel est ensuite décoloré par un mélange d'acide acétique (5%), méthanol (5%) et d'eau. L'activité protéolytique est détectée par la réalisation d'un zymogramme selon la méthode de Westergaard (Westergaard *et al.*, 1980) avec quelques modifications. Après migration des échantillons, le gel est immergé dans 2% de caséine dans du tampon citrate (w/v) pH 5,5 pendant une heure à 40 °C. Le gel est ensuite 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 d'une activité enzymatique.

5. Evaluation des activités coagulantes

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de Berridge (1945). La technique consiste à ajouter 1ml d'extrait enzymatique à 10 ml de lait écrémé préparé par addition de 0,01 M de

CaCl₂ avec ajustement du pH à 6,5. Le temps de coagulation est mesuré à 30°C ; cela correspond au temps nécessaire à l'apparition des premiers flocons dans un mince film de lait s'écoulant sur la paroi du tube. L'activité est exprimée en unité présure (UP) et calculée d'après l'équation 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_c = temps de coagulation.

L'activité coagulante peut être également exprimée en « force coagulante de SOXHLET », selon la relation suivante :

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

5.1. Comparaison de la coagulation des deux protéases avec celle de la présure

L'activité coagulante par les protéases des deux plantes est comparée à celle de la présure commerciale microbienne par mesure des temps de floculation de lait bovin frais et de lait UHT écrémé.

5.2. 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.

5.3. Effet de la température sur l'activité coagulante

L'effet de la température sur la coagulation du lait par les protéases végétales est déterminé par mesure du temps de floculation à des températures variant de 30 à 60 °C.

5.4. Effet des ions de calcium sur l'activité coagulante

L'effet du calcium sur l'activité coagulante du lait UHT écrémé par les protéases purifiées est étudié à pH 6,5 avec des concentrations de CaCl₂ variant de 10 à 60 mM.

6. Action des protéases et de la présure sur les caséines

6.1. Suivi de la dégradation des caséines par électrophorèse

L'action des protéases végétales et de la présure sur les caséines α , β et κ (Sigma Aldrich Co.) est étudiée à différents temps (30, 60, 90 et 120 min) puis les produits de l'hydrolyse

sont suivis par électrophorèse. Les caséines sont dissoutes dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 6,5) contenant de l'azide de sodium à 0,1 % (w/v) jusqu'à une concentration finale de 1% (w/v). La réaction est déclenchée par le mélange de 45 µl d'enzyme et de 450 µl du substrat à 40°C. La réaction est stoppée par addition de 500 µl de TCA à 5% (w/v).

Les échantillons sont laissés précipiter pendant une nuit à 4°C puis centrifugés à 10 000 g pendant 15 min. Les précipités sont récupérés par addition de 450 µl d'une solution d'extraction composée de tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8 contenant 2% de SDS, 0,5 % de β- 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 (caséines non hydrolysées par l'enzyme) sont réalisés dans les mêmes conditions. 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 par le bleu de Coomassie R-250 à 0,1 % (w/v) dans de l'éthanol. La décoloration se fait dans un mélange eau/acide acétique 6: 4 (v/v).

6.2. Suivi de la dégradation des caséines par HPLC

L'appareil HPLC utilisé comporte un système de pompage PU-2089 quaternary gradient pump, un injecteur manuel, une colonne C18 ODS2 avec un diamètre de 5 µm en phase inverse (4,6 X 250 mm) et 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. Le système d'élution se fait en gradient de solvant formé par l'eau ultra pure (solvant A) et le méthanol spécial HPLC (solvant B). L'analyse d'hydrolyse des caséines par l'RP-HPLC est effectuée selon la méthode décrite par Gallagher et al. (1994) avec quelques modifications.

Les caséines α, β et κ sont dissoutes à 1 % dans le tampon citrate 50 mM pH 5,5. L'hydrolyse des caséines est réalisée à différents temps (30 min, 90 min et 24 h) à 40°C. Chaque réaction est initiée par l'addition de 100 µl de l'extrait enzymatique et de 900 µl du substrat. Les solutions enzymatiques utilisées sont normalisées à la même activité coagulante. Les réactions sont arrêtées par chauffage des hydrolysats à 100°C pendant 6 min. Un aliquote de chaque échantillon est filtré à travers des filtres Millipore de 0.45 µm. Chaque échantillon est injecté avec un volume de 20 µl puis élué à un débit de 0,7 ml/min par 0,06% du mélange trifluoroacetic acid TFA/méthanol de qualité HPLC. La concentration de la phase mobile (0.056% TFA/HPLC grade méthanol) a été augmentée linéairement de 0 à 91 %.

Résultats et Discussion

Chapitre 3 : Résultats et discussion des résultats

1. Localisation de l'activité protéolytique chez *Onopordum acanthium* et *Galactites tomentosa*

1.1. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des plantes

Les activités protéolytiques ont été dosées pour les feuilles, les tiges et les fleurs des deux plantes. Les résultats regroupés dans le tableau 1 montrent une activité enzymatique plus importante au niveau des fleurs. Des mesures ont été effectuées sur les pétales et le reste des fleurs afin de localiser les protéases.

Tableau 1 : Résultats de l'activité protéolytique dans les différentes parties d'*Onopordon Acanthium* et de *Galactites tomentosa*

		Plante entière	feuilles	tiges	fleurs
<i>Onopordon acanthium</i>	Poids moyen (gr)	510	143	85,75	281 (nombre moyen des fleurs par plante=16)
	Activité protéolytique (U)	1229,14	140,43	31,71	1057
<i>Galactites tomentosa</i>	Poids moyen (gr)	138,63	35,90	75,45	27,27 (nombre moyen des fleurs par plante=14)
	Activité protéolytique (U)	707,13	66,12	42,33	598,68

Ces résultats confirment la richesse des fleurs en protéases. En effet, des travaux antérieurs sur les fleurs d'autres chardons (*Silybum marianum*) réalisés dans le cadre d'un mémoire de magistère montrent leurs richesses en protéases.

Des observations identiques sont rapportées par la bibliographie par rapport aux fleurs d'autres espèces de chardons considérées comme une bonne source de protéases coagulant le lait (Versimo *et al.*, 1996 ; Cordeiro *et al.*, 1994 ; Lorente *et al.*, 2004).

1.2. Localisation de l'activité protéolytique au niveau des fleurs

Le tableau 2 englobe les valeurs des activités protéolytiques des pétales et du reste des fleurs.

Tableau 2 : Résultats de l'activité protéolytique dans les pétales et le reste des fleurs d'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa*

	Partie de la plante	Poids (g)	Activité totale (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement %
<i>Onopordum acanthium</i>	Fleur entière	14,728	996,20	2,94	338,84	100
	Pétales	4,25	626,90	1,38	452,30	63
	Le reste de la fleur	10,18	399,76	1,45	275,69	40
<i>Galactites tomentosa</i>	Fleur entière	2,71	576,98	14,85	38,85	100
	Pétales	0,98	504,23	9,11	55,34	87
	Le reste de la fleur	1,52	64,12	4,88	13,13	11,13

L'activité protéolytique mesurée au niveau des fleurs d'*Onopordum acanthium* a permis de localiser une plus grande teneur dans les pétales (63%) par rapport au reste de la fleur (40%), cependant l'activité enzymatique totale reste importante même si elle est inférieure à celle des pétales ; c'est donc toute la fleur qui sera utilisée pour la suite du travail. Etant donné les activités présentes dans les pétales et le reste de la fleur ; il est plus rentable d'utiliser la fleur entière cela permet d'économiser le temps et de conserver le rendement. En effet, dans les applications à l'échelle industrielle, les facteurs temps et rendements sont essentiels.

D'autre part, les valeurs obtenues pour les fleurs de *Galactites tomentosa* montrent que les pétales contiennent une activité protéolytique égale à 87% contre une activité enzymatique bien plus faible dans le reste de la fleur (11,13%) (Tableau 2). Etant donné ces résultats, seules les pétales sont retenues. Les mêmes observations ont été notées Chez *Cynara cardunculus* où trois protéases, les cynarases 1, 2, et 3 sont localisées uniquement dans la

partie violette de la fleur (Heimgartner *et al.*, 1990). Deux autres protéases, les cardosines A et B, se retrouvent au niveau des stigmates des fleurs (Verissimo *et al.*, 1996). La même localisation est notée pour les trois fractions de protéases de *Cynara scolymus*, les cynarases A, B et C (Sidrach *et al.*, 2005). Des résultats similaires sont également notés par Vairo Cavalli *et al.* (2005) concernant les fleurs de *Silybum marianum*.

L'effet du Tween 20 sur l'extraction de la protéase à partir des pétales a montré une amélioration en protéines mais avec une faible diminution des protéases. En effet, les valeurs des protéines dans les broyats des pétales fraîches augmentent fortement en présence de Tween 20 à 1% où elles passent de 0,719 à 1,456 mg/ml chez *Onopordon acanthium*, soit une augmentation de 100%. En parallèle, les activités protéolytiques diminuent de façon significative ; elles passent de 860,43 U à 689,6 U, soit une diminution de 19,85%. La perte d'activité peut être due à la dénaturation partielle de l'enzyme par le Tween 20. La même observation est notée concernant les pétales de *Galactites tomentosa*.

1.3. Séchage des échantillons par le CaCl₂

Afin de remédier aux problèmes liés à l'approvisionnement saisonnier en plantes, les échantillons sont séchés par absorption de leur contenu en eau par le Ca Cl₂ ; l'échantillon devient sec, avec un poids constant en une durée de 5 jours. En effet, les pétales fraîches d'*Onopordon acanthium* perdent un taux d'humidité très important soit 70,78%. Quand aux pétales de *Galactites tomentosa*, la perte d'eau est de 58,63%. Les activités protéolytiques des pétales fraîches et des pétales séchées des deux plantes sont regroupées dans le tableau 3. Ce dernier montre une légère perte dans l'activité totale mais elle est récupérée en activité spécifique. Un résultat similaire est rapporté par Chaiwut *et al.* (2010) montrant une augmentation de l'activité protéolytique après séchage des pelures de papaye

Ces résultats nous permettent d'utiliser le séchage et de pouvoir donc travailler à tout moment de l'année. La bibliographie rapporte l'utilisation de préparations protéolytiques coagulantes extraites à partir de fleurs séchées de *Cynara scolymus*, L. (Chazarra *et al.*, 2007) et de *Centaurea calcitrapa* (Salvador *et al.*, 2006).

Tableau 3 : L'activité protéolytique avant et après séchage des échantillons par le Ca Cl₂

<i>Onopordon acanthium</i>				<i>Galactites tomentosa</i>		
	Activité totale (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Activité totale (U)	Protéines (mg)	Activité spécifique (U/mg)
pétales fraîches	631,56	1,77	356,81	482,96	9,79	49,33
Pétales séchées	564,11	1,27	444,18	378,97	6,01	63,05

2. Purification des protéases extraites à partir d'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa*

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

Les extraits bruts des plantes *O.acanthium* et *G.tomentosa* sont précipités par l'AS en 3 étapes, 30, 60 et 80%.

- *Onopordum acanthium*

Les résultats des activités protéolytiques après précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium de la plante *Onopordum acanthium* sont regroupés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Résultats de précipitation fractionnée par sulfate d'ammoniums de l'extrait brut d'*Onopordum acanthium*.

% de saturation	Activité protéolytique (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	807	3.887	207.61	1	100
Le précipité à 30% de saturation	476	1.241	383.56	1.84	58.98
Le précipité à 60% de saturation	327	1.019	320.61	1.54	40.52
Le précipité à 80% de saturation	5	0.428	11.665	0.05	0.62
Le surnageant	29	0.798	36.331	0.17	3.59

D'après ces résultats, les protéases d'*Onopordum acanthium* sont séparées des autres composants de l'extrait brut avec un rendement de 58.98% pour la fraction à 30% d'AS et de 40.52%, pour la fraction à 60%. Ainsi, la majorité des protéases d'*O acanthium* sont extraites à 30% et 60% d'AS. Cela indique le caractère hydrophobe des protéases séparées à des concentrations faibles (30%) en AS. En effet, plus la surface d'une protéine présente de résidus hydrophiles par rapport aux zones de surface hydrophobes, plus la concentration en sulfate d'ammonium nécessaire pour sa précipitation sera élevée (Kamoun, 1987).

L'extrait protéolytique choisi pour la suite des travaux est la fraction majeure (précipité à 30%). Celle-ci est solubilisée dans un faible volume de tampon et dialysée avant de subir une chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel Sephadex G100.

- *Galactites tomentosa*

Les résultats des activités protéolytiques de la plante *Galactites tomentosa* après précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de précipitation fractionnée par sulfate d'ammoniums de l'extrait brut de *Galactites tomentosa*

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

Comme pour *Onopordum acanthium*, les résultats de *Galactites tomentosa* montrent une activité totale majeure dans la fraction 30% (213,31U) suivie d'une activité de 169,29U considérée aussi importante dans le précipité à 60%. Cependant, on note une meilleure activité spécifique et donc un meilleur degré de purification dans la dernière fraction.

L'extrait protéolytique choisi pour la suite des travaux est là aussi la fraction précipitée à 30%.

L'utilisation d'AS (40-70%) dans la séparation des protéases acides des fleurs d'*Albizia lebbek* et des fleurs du tourne sol, permet de noter une purification avec des rendement de

49,5% et 68,4% et des degrés de purifications de 3,8 et 6,7 respectivement (Egito *et al.*, 2007).

2.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire

Le tamisage moléculaire des échantillons sur Sephadex G100 donne les profils d'élution représentés par les figures 10 et 11.

- *Onopordum acanthium*

Le profil d'élution (figure 10) de l'échantillon d'*Onopordum acanthium* révèle deux pics d'activité. Le premier constitue la forme majeure, éluée dans les fractions 17 à 27 et le deuxième, la forme mineure, élué dans la fraction 50.

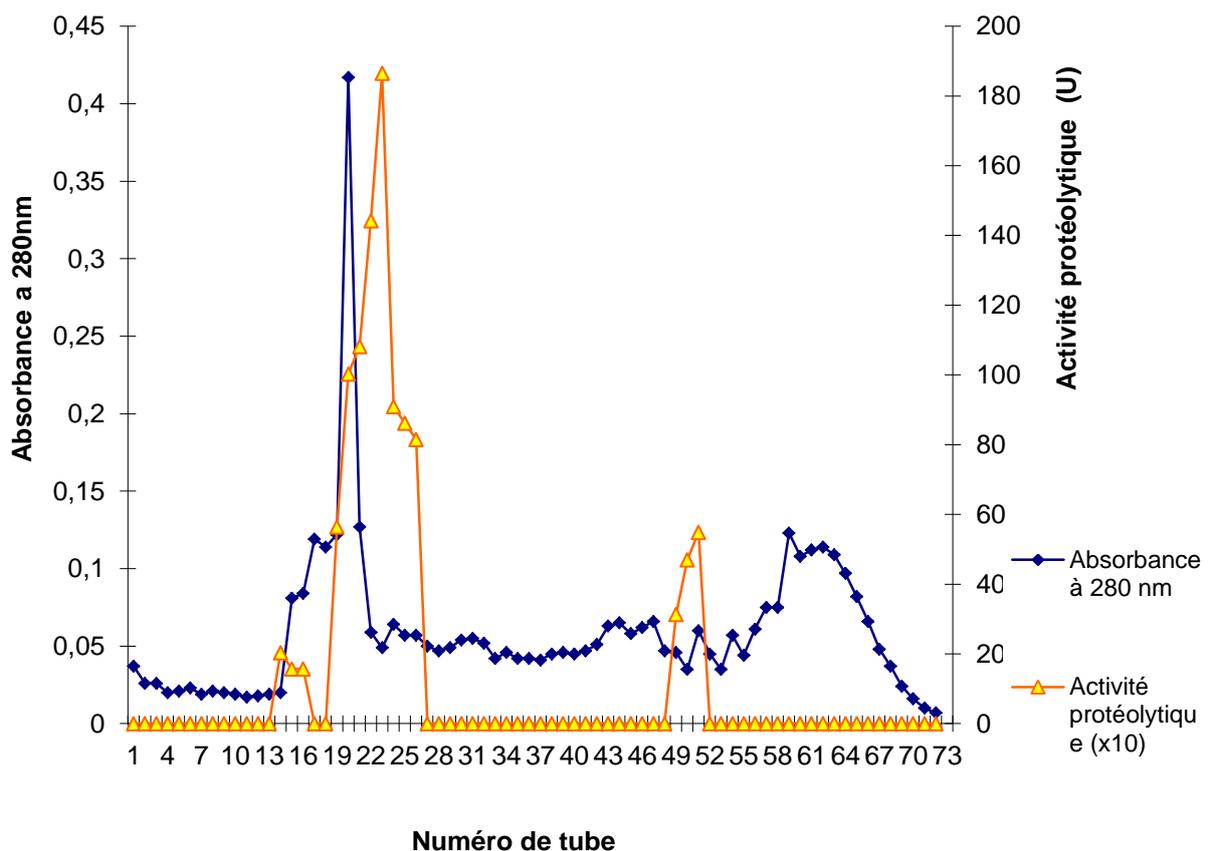


Fig10: Profil d'élution de la protéase acide d'*O. acanthium* sur Sephadex G-100. Elution par le tampon citrate 0,05 M, pH 5 ; volume des fractions : 2ml.

Le tableau 6 résume les paramètres de purification des deux fractions protéolytiques obtenues. La fraction majeure est séparée avec un rendement en activité de 30%, une activité spécifique de 5145,51 U/mg et un degré de purification de 26,65 ; la fraction mineure est purifiée avec un rendement en activité de 4.64% et un degré de purification de 23,79.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Hashim et al. (2011) pour la protéase de gingembre en utilisant le même gel (34.9%). Par contre, des rendements et des degrés de purification plus faibles sont rapportés pour les protéases microbiennes ; la protéase acide de *Synergistes sp* (Kumar et al., 2008b) et la protéase acide d'*Aspergillus Niger* (Fazouane et al., 2010).

Tableau 6: Tableau de purification de la protéase extraite à partir des fleurs d'*O. acanthium*

	Volume (ml)	Activité protéolytique (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	55	28681.01	148.55	193.07	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	5	16456.32	42.27	389.31	2.01	57.37
dialyse	6.5	23226.92	35.55	656.45	3.40	80.98
Sephadex G100 Fraction majeure	16	8541.55	1.66	5145.51	26.65	29.78
Sephadex G100 Fraction mineure	6	1332.17	0,290	4593.68	23.79	4,64

- *Galactites tomentosa*

Le profil d'élution de l'extrait de *Galactites tomentosa* sur Sephadex G100 a permis d'obtenir un seul pic (figure 11).

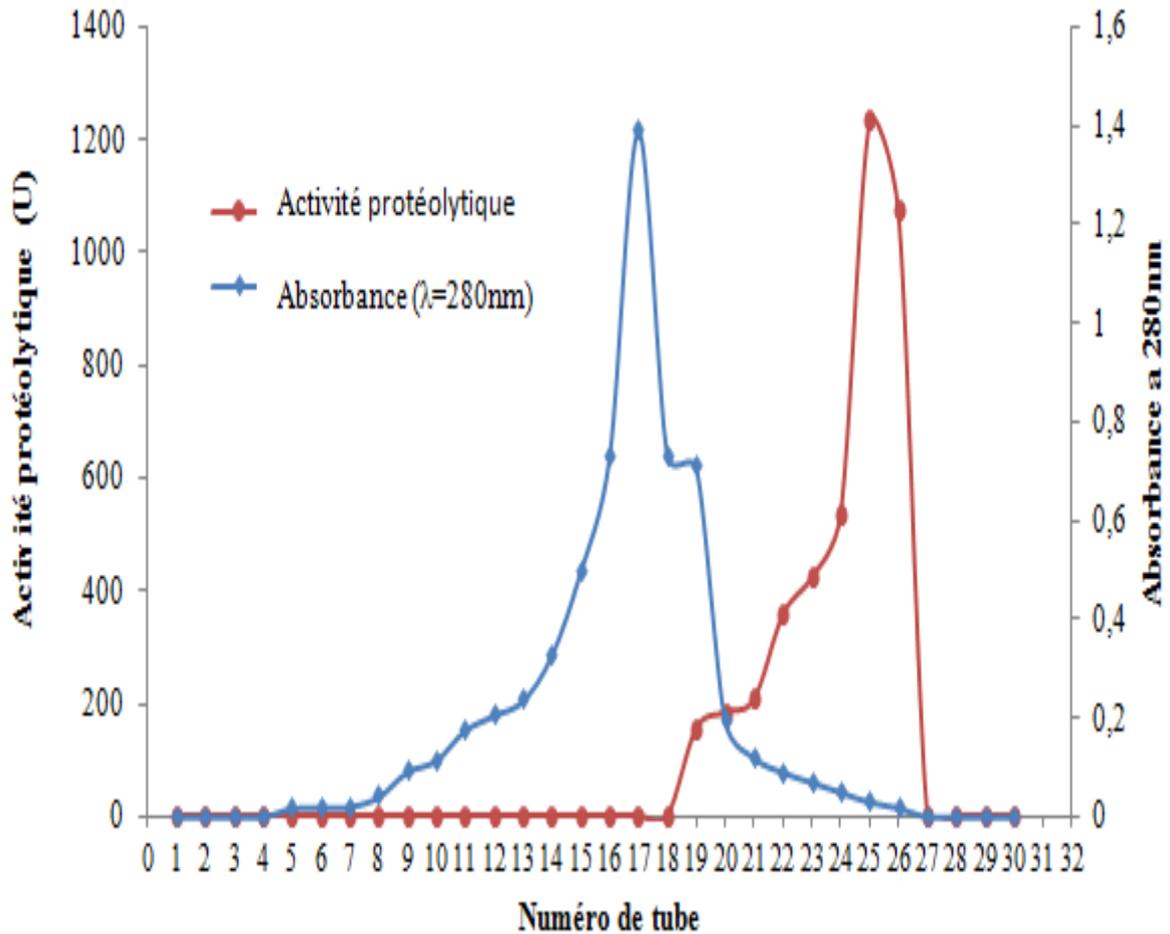


Fig11: Profil d'élution de la protéase acide de *Galactites tomentosa* sur le Sephadex G-100. Elution par le tampon citrate 0,05 M, pH 5 ; volume des fractions : 2ml.

Le tableau 7 résume les paramètres de purification de l'extrait de fleurs de *Galactites tomentosa*).

Tableau 7: Tableau de purification de la protéase extraite à partir de *Galactites tomentosa*

	Volume (ml)	Activité protéolytique (U)	Protéines totales (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Degré de purification	Rendement (%)
Extrait brut	35	19584,25	402	48,71	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30%	2,5	7466,28	41,61	179,43	3,68	38,12
dialyse	3,25	9855,48	36,83	267,66	5,49	50,32
Sephadex G100	25	4523,8	06	753,96	15,47	23,09

Ce tableau indique une séparation de l'enzyme avec un rendement de 23% et un degré de purification de 15,47. Ces résultats sont proches de ceux de Kumar et al. (2005) pour la protéase acide de *R. oryzae* et meilleurs à ceux de Fazouane et al. (2010) pour la protéase acide d'*Aspergillus niger*.

2.3. SDS-PAGE et zymogramme

L'électrophorèse sur SDS-PAGE et le zymogramme réalisés après purification des deux protéases végétales sont présentés dans les figures 12 et 13.

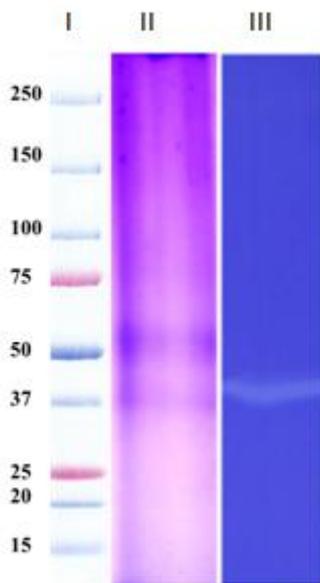


Fig 12 : Profil électrophorétique de la protéase d'*Onopordum acanthium*.

I : marqueurs de taille; II : SDS PAGE de la protéase purifiée ; III: Zymogramme de la protéase avec la caséine comme substrat

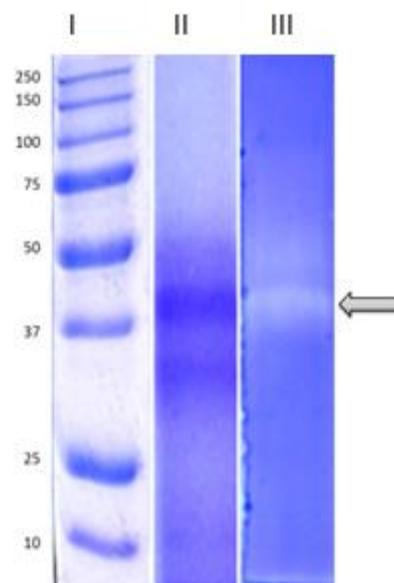


Fig13 : Profil électrophorétique de la protéase de *Galactites tomentosa* .

I : marqueurs de taille; II : SDS PAGE ; III: Zymogramme de la protéase avec la caséine comme substrat

Les zymogrames des deux gels donnent une bande d'activité protéolytique indiquant une structure monomérique avec une masse moléculaire de 45 kDa. Ces résultats sont confirmés par la littérature où il est rapporté que la majorité des aspartyl protéases végétales sont hétérodimériques et où seul un nombre réduit de ces enzymes est monomérique et se caractérise par des masses molaires comprises entre 36 et 65 kDa (Mutlu et Gal, 1999). La MM de 45 kDa notée pour la protéase d'*O acanthium* confirme le résultat rapporté par Brutti *et al.* (2012). Fazouane et al. (2010), lors de la séparation de la protéase acide d'*A niger* présente une seule bande protéolytique correspondant à une masse moléculaire de 47 kDa.

3. Caractérisation des protéases purifiées

3.1. Affinité des protéases vis-à-vis de quelques substrats

L'activité des protéases purifiées est testée en présence de différents substrats protéiques naturels (BSA, hémoglobine, caséine et ovalbumine). D'après les résultats résumés dans le tableau 8, la meilleure activité est observée avec la caséine, suivie de l'hémoglobine, puis de la BSA et de l'ovalbumine. Ces résultats indiquent une meilleure affinité des deux protéases

étudiées vis-à-vis de la caséine. Cette activité prédispose ces enzymes à une utilisation comme substituts de la présure pour la coagulation.

Tableau 8: Affinité des deux protéases végétales aux différents substrats

Substrats	Activité résiduelle (%)	
	<i>Onopordum acanthium</i>	<i>Galactites tomentosa</i>
Caséine	100	100
Hémoglobine	31,45	39,9
BSA	9,35	9,14
Ovalbumine	8,12	6,43

3.2. Mesure des paramètres cinétiques

Les représentations graphiques (fig. 14 et 15) des activités des protéases d'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa* en fonction des concentrations de caséine présentent une allure michaélienne indiquant qu'il s'agit d'enzymes monomériques comme déjà observé par le zymogramme. Ces résultats sont similaires à ceux décrits par Kumar et al. (2005) qui ont obtenu une cinétique hyperbolique pour la protéase acide de *R. oryzae*.

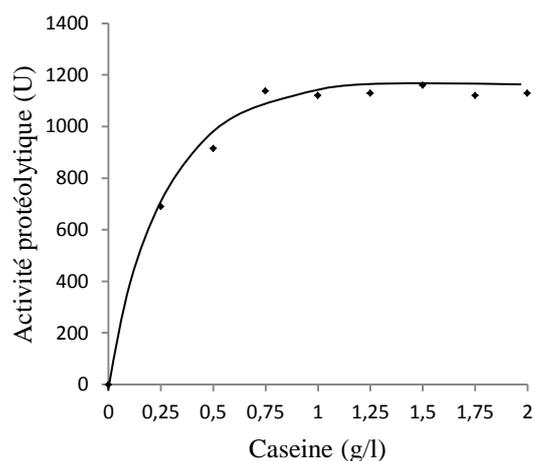


Fig14 : Effet de la concentration du substrat sur la protéase d'*Onopordum acanthium*.

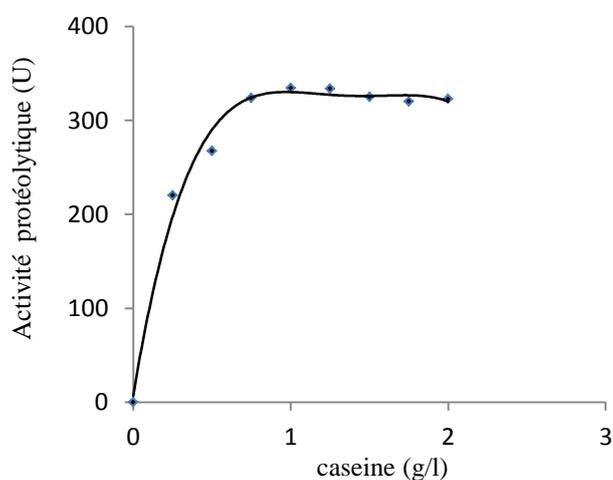


Fig15 : Effet de la concentration du substrat sur la protéase de *Galactites tomentosa*.

La représentation de Lineweaver et Burk (fig. 16 et 17) a permis d'obtenir des constantes de Michaelis (K_M) de 2.34 g/l et 3,47g/l et des vitesses maximales (V_{max}) de 1329.6 U et 523.8 U pour *Onopordum acanthium* et *Galactites tomentosa* respectivement. Les faibles valeurs de K_M calculées indiquent une grande affinité de l'enzyme pour la caséine par rapport aux résultats obtenus par d'autres auteurs pour l'aspartique protéase de *R. oryzae* en utilisant le lait écrémé comme substrat (Kumar *et al.*, 2005). Par ailleurs, les valeurs élevées de V_{max} des deux protéases indiquent leur efficacité catalytique. Un résultat similaire est aussi noté par Vishwanatha *et al.* (2009) concernant la protéase acide d'*A. oryzae*.

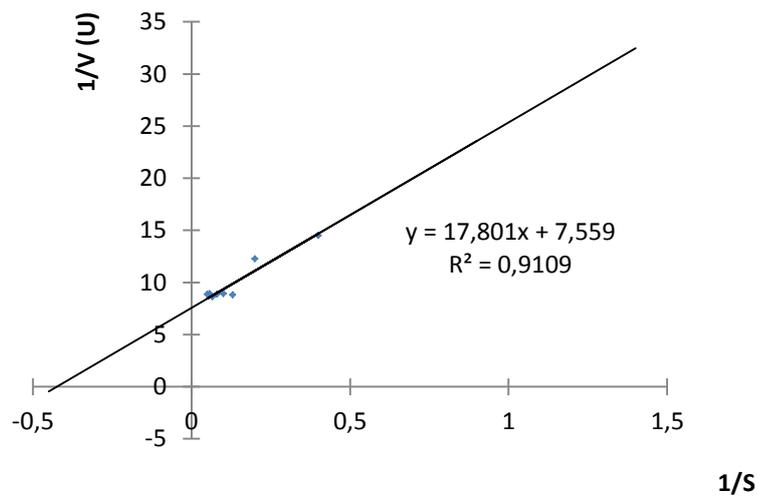


Fig 16: Cinétique de la protéase d'*Onopordum acanthium* selon la représentation de Lineweaver-Burk

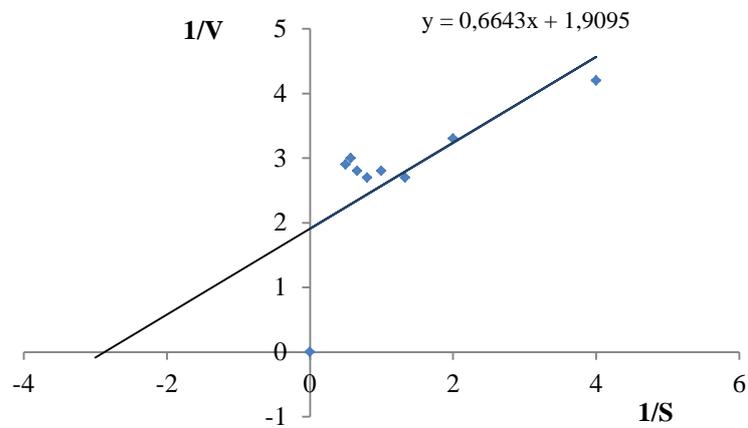


Fig17: Cinétique de la protéase acide de *Galactites tomentosa* selon la représentation de Lineweaver et Burk

3.3. Effet du pH sur l'activité protéolytique

L'effet du pH sur l'activité protéolytique des protéases purifiées est déterminé en utilisant l'hémoglobine dénaturée dans un intervalle de pH compris entre 2,5 et 6,5 ; les résultats sont

représentés par les figures 18 pour *Onopordum acanthium* et 19 pour *Galactites tomentosa*. Une augmentation de l'activité est observée pour les deux protéases jusqu'à pH 4, où elle atteint sa valeur maximale. Ce résultat est caractéristique des protéases acides.

L'analyse de la variance des résultats montre que le pH a un effet significatif sur l'activité de la protéase acide des deux espèces végétales (voir annexe 3).

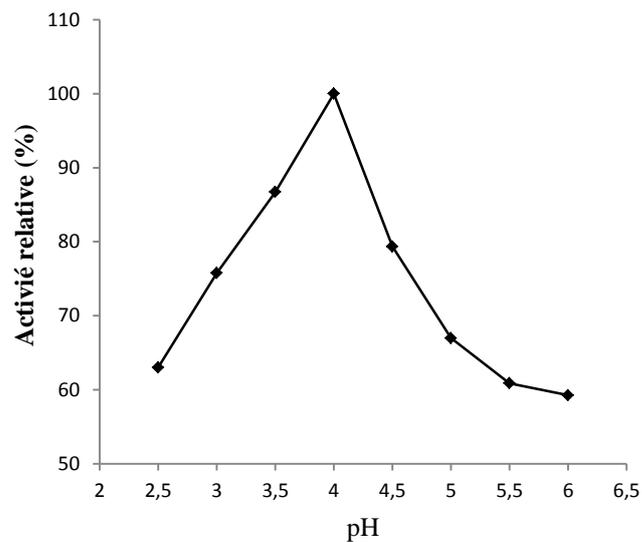


Fig18 : Effet du pH sur l'activité de la protéase d'*Onopordum acanthium*

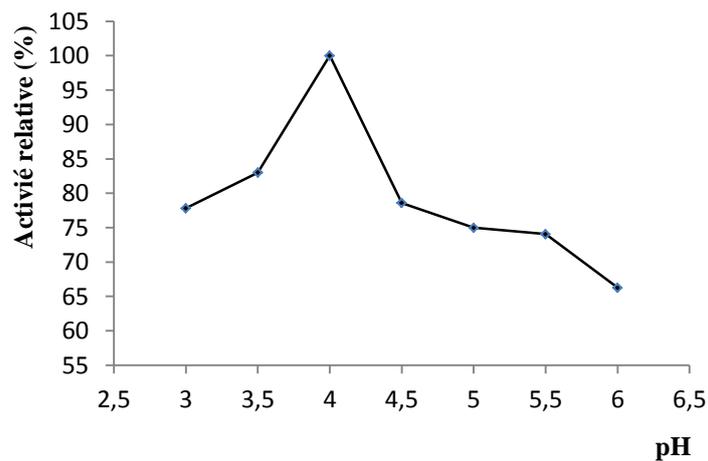


Fig19 : Effet du pH sur l'activité de la protéase de *Galactites tomentosa*.

C'est le cas de nombreuses protéases, qu'elles soient d'origine animale comme la chymosine de veau, de porc et d'agneau (Foltmann et Szecsi , 1998) ou végétale comme celles des fleurs de *Silybum Marianum* (Vairo *et al.*, 2005), d'*O acanthium* (Brutti *et al.*, 2012) et de *C. calcitrapa* (Domingos *et al.*, 1998).

Le pH de la protéase du chardon australien *Centaurea Cardunculus* atteint son maximum à pH 6,0, mais dans ce cas, le substrat utilisé est la caséine au lieu de l'hémoglobine (Chen *et al.*, 2003).

L'activité protéolytique à pH acide est favorable à une activité coagulante tel que l'extrait de fleurs d'artichaut qui a montré une activité maximale autour de 4 (Chazarra *et al.*, 2007) .

3.4. Effet de la température sur l'activité protéolytique

L'effet des températures de 30°C à 70°C sur l'activité de la protéase acide d'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa* est présenté dans les figures 20 et 21. Celles-ci montrent que la température maximale d'activité se situe à 40°C. Ces températures sont proches de celles rapportées par des auteurs ayant travaillé sur les protéases de *Rhizopus oryzae* et des graines de *Centaurea Calcitrapa* (Kumar *et al.*, 2005 et Sumantha *et al.*, 2006). Najera *et al.* (2003) notent pour leur part une diminution progressive du temps de coagulation par la présure lorsque la température augmente de 20 à 40 °C.

L'activité des deux protéases subit une inactivation totale à 70°C comme observé par Kumar *et al.* en 2005 pour la protéase acide de *Rhizopus oryzae*.

L'analyse de la variance des résultats révèle que la température exerce un effet significatif sur l'activité de la protéase des deux plantes étudiées (voir annexe 3).

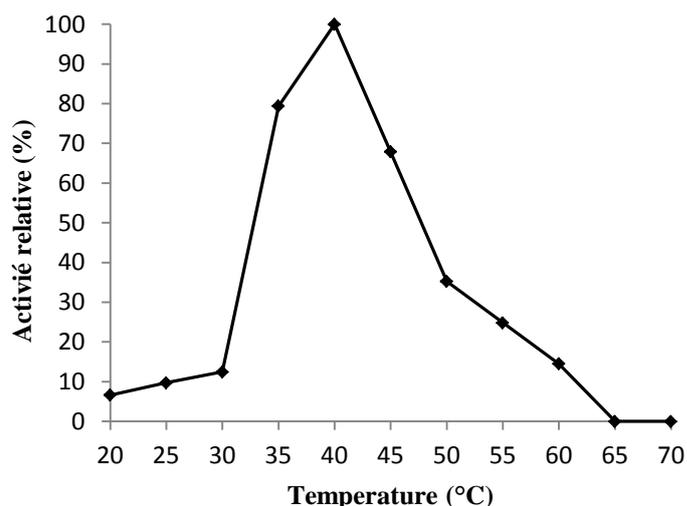


Fig20 : Effet de la température sur l'activité de la protéase d'*Onopordum acanthium*.

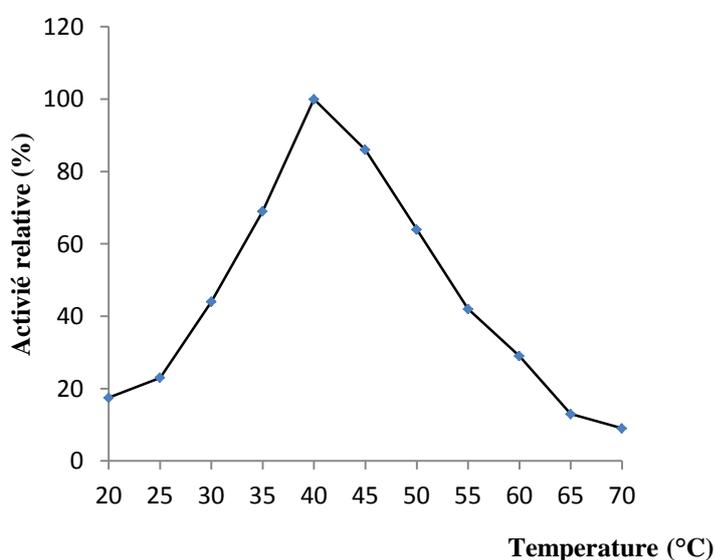


Fig21 : Effet de la température sur l'activité de la protéase de *Galactites tomentosa*.

3.5. Stabilité thermique des protéases

La stabilité thermique des protéases acides des deux plantes réalisée à 60°C à des temps variant de 10 à 60 min à pH 5,5 est représentée dans les figures 22 et 23. La protéase d'*O. acanthium* montre une perte d'activité de 50 % après 20 min d'incubation et de 90 % après 60 min. La même observation concerne la protéase extraite des pétales de *G. tomentosa* qui perd également 50% de son activité après 20 min.

Ces résultats sont différents de ceux obtenus pour les protéases acides d'autres origines. Kumar et al. (2005) signalent une perte d'activité de 62% à la même température au bout de 60 min pour la protéase acide de *Rhizopus oryzae*. Les travaux réalisés par Fernandez-Lahore

et al. (1999) sur les protéases acides de quelques souches mésophiles de *Mucor sp* notent des activités résiduelles uniquement de 26% et 13% à 50°C et 60°C respectivement durant les 30 premières minutes d'incubation. Comme la chymosine bovine, ces résultats indiquent que ces protéases ne sont pas thermostables, une caractéristique pertinente pour la fabrication de fromage. En effet, plus la température de chauffage du caillé est élevée au cours de la fabrication du fromage, moins il reste de présure active et moins le fromage sera amer (Cerning, 1984).

Les propriétés biochimiques des enzymes végétales étudiées, particulièrement leur faible thermostabilité encouragent leur emploi dans l'industrie laitière.

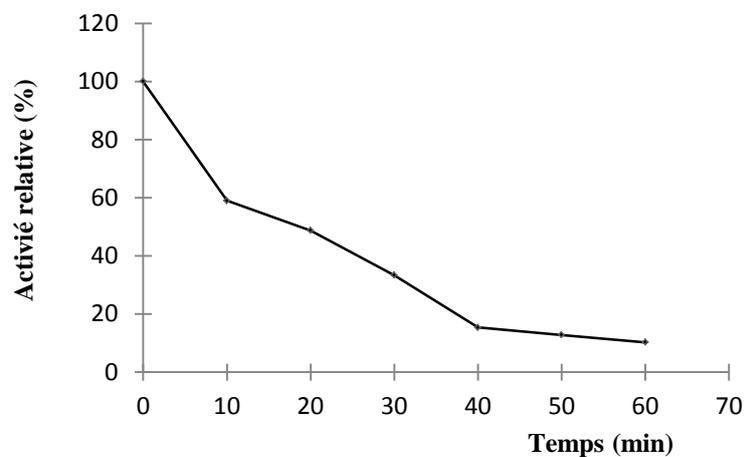


Fig22: Stabilité thermique de la protéase issue des fleurs d'*Onopordum acanthium* à 60°C

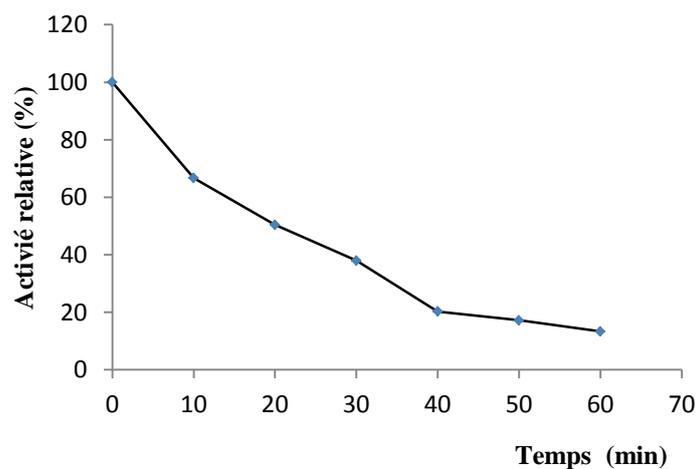


Fig23: Stabilité thermique de la protéase issue des pétales de *Galactites tomentosa* à 60°C

Le temps de demi-vie des protéases d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa* à 60°C est calculé d'après les représentations graphiques linéarisées (fig. 24 et 25). Les enzymes possèdent un temps de demi-vie de 19 min pour la première et de 21,6 min pour la deuxième. Une valeur inférieure a été notée pour la protéase acide de *Penicillium expansum* où le t1/2 est de 17 min mais à 50°C (Umar Dahot., 2001). Ces résultats montrent que les protéases étudiées ne sont pas thermostables, propriété pouvant être favorable à la fabrication fromagère. En effet, lors de l'affinage une faible activité protéolytique est souhaitée afin d'éviter le problème de l'amertume lié à l'hydrolyse excessive des liaisons peptidiques. C'est justement l'inconvénient des protéases végétales (Lo Piero *et al.*, 2002).

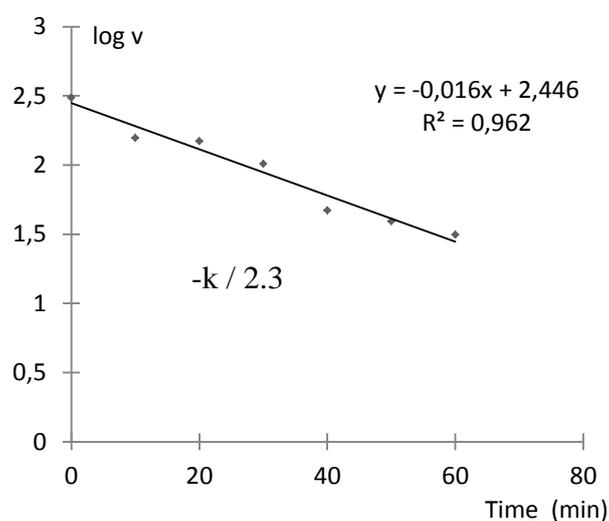


Fig24 : Cinétique de la stabilité thermique de la protéase d'*Onopordum acanthium* à 60°C.

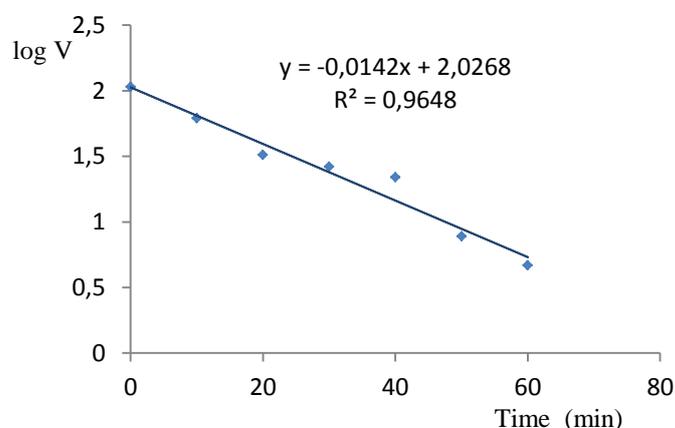


Fig25 : Cinétique de la stabilité thermique de la protéase de *Galactites tomentosa* à 60°C.

3.6. Effet de quelques effecteurs sur l'activité des protéases d'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa*

3.6.1. Effet des inhibiteurs

L'effet de quelques inhibiteurs sur l'activité des protéases est récapitulé dans le tableau 9.

Tableau 9 : Effet de quelques inhibiteurs sur les protéases d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa*

	Inhibiteurs	Concentrations (mM)	Activité résiduelle (%)
<i>Onopordum acanthium</i>	Sans inhibiteur	-	100
	EDTA	10	97,43
	Pepstatine-A	1	0
		10	0
	Iodoacétamide	10	98
<i>Galactites tomentosa</i>	Sans inhibiteur	-	100
	EDTA	10	98
	Pepstatine-A	1	0
		10	0
		Iodoacétamide	10

On observe une inhibition totale des deux protéases par la pepstatine A à la concentration de 1 mM. Ces résultats indiquent que les deux enzymes sont des aspartyl protéases. En effet, la pepstatine est un inhibiteur puissant des aspartylprotéases. C'est un hexa-peptide contenant

l'acide aminé inhabituel, statine . Il a été initialement isolé à partir de cultures de différentes espèces d'*Actinomyces*. L'inhibition de l'enzyme indique que la pepstatine s'est liée sur le résidu aspartyl du site actif de l'enzyme entraînant son blocage et, ainsi, empêche la reconnaissance du substrat (Umezawa *et al.*, 1970).

Cette inhibition est noté aussi bien chez plusieurs protéases acides végétales ; *O acanthium* (Brutti *et al.*, 2012) , *Ficus racemosa* (Devaraj *et al.*, 2008) et *C. calciprata* (Raposo *et al.*, 2008), que chez les protéases acides fongiques ; *Aspergillus oryzae* (Vishwanathaet *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'iodoacétamide, ce qui indique qu'elles n'appartiennent ni au groupe des métallo protéases, ni à celui des cystéyl protéases.

3.6.2. Effet de quelques ions métalliques

Les effets de quelques ions métalliques sur l'activité des aspartyl protéases des deux plantes se présentés dans le tableau 10.

D'après les résultats exprimés en activités résiduelles, l'activité protéolytique des deux enzymes étudiées est positivement affectée par la présence des ions Ca^{++} , Mn^{++} et; le Zn^{++} est sans effet sur l'activité enzymatique d'*O.acanthium* mais augmente légèrement celle de *G.tomentosa* (11%).

Les ions Co^{++} et de Hg^{++} engendrent une diminution de l'activité respectivement de 45% et 100% chez d'*O.acanthium*, et de 24% et 81% chez *G.tomentosa*.

Arima *et al.* (1968) trouvent des résultats plus au moins similaires, les ions Ca^{++} et Mn^{++} activent la protéase acide mais le Mg^{++} est sans effet. Il est rapporté par la bibliographie que les ions calcium stimulent l'activité des aspartylprotéases (Sumantha *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2008b)

Des résultats similaires quand a l'effet des ions Hg^{++} sur l'activité des protéases acides sont notés par Umar Dahot. (2001) et Benkhaled *et al.* (2011) qui observent des diminutions en activité enzymatique de 65% et 65% respective.

Tableau 10 : Effet de quelques ions métalliques sur les protéases d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa*

	Ions métalliques	Concentrations (mM)	Activité résiduelle (%)
<i>Onopordum acanthium</i>	Témoin	10	100
	CaCl ₂	//	120
	MnCl ₂	//	134
	MgCl ₂	//	145
	ZnCl ₂	//	100
	CoCl ₂	//	55
	HgCl ₂	//	0
<i>Galactites tomentosa</i>	Témoin	10	100
	CaCl ₂	//	133
	MnCl ₂	//	162
	MgCl ₂	//	128
	ZnCl ₂	//	111
	CoCl ₂	//	76
	HgCl ₂	//	19

4. Application des protéases acides dans la coagulation du lait

4.1. Mesure de l'activité coagulante

Les résultats des temps de coagulation du lait de vache frais et sur le lait écrémé UHT par les extraits enzymatiques d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa* sont résumés dans le tableau 11.

Tableau 11: Comparaison entre le temps de coagulation du lait de vache frais et du lait écrémé UHT

Plante	Temps de coagulation (min)	
	Lait frais	Lait UHT
<i>Onopordum acanthium</i>	19	90
<i>Galactites tomentosa</i>	38	162

D'après le tableau 11, on remarque que le lait frais coagule plus vite que le lait UHT. En effet, les hautes températures entraînent une altération des propriétés coagulantes du lait liée à une dénaturation des protéines sériques qui vont enrober les micelles de caséine (Vasbinder *et al.*, 2003).

La capacité des protéases de fleurs d'*O. acanthium* et de pétales de *G. tomentosa* et de présure à coaguler le lait est exprimée par les résultats présentés dans le tableau 12. D'après ces résultats, l'extrait brut d'*O. acanthium* ayant une activité spécifique de 193 U/mg présente une activité de coagulation de $46,3 \cdot 10^{-4}$. Ce résultat est supérieur à celui obtenu avec l'extrait brut des pétales de *G. tomentosa* ($16 \cdot 10^{-4}$). Il est également supérieur au résultat obtenu par Salvador *et al.* (2006) en utilisant les protéases de graines de *C. calcitrapa* (180 U/mg), où l'activité de coagulation est de $37 \cdot 10^{-4}$.

D'autre part, l'enzyme d'*O. acanthium* purifiée a montré une activité coagulante supérieure à celle obtenue par *G. tomentosa* et par la présure. Des données similaires ont été notées par Hashim *et al.* (2011) avec les protéases de gingembre et le même résultat a été décrit par Su *et al.* (2009).

Ces résultats confirment l'efficacité des protéases étudiées dans la coagulation du lait comme cela a été montré pour de nombreux extraits végétaux tels que le latex du figuier (*Ficus carica*) et les extraits de chardons (*Cynara cardunculus L.* et *Cynara scolymus*) qui sont utilisés depuis longtemps en Algérie dans les préparations traditionnelles fromagères (Androuët, 2002).

Le tableau 12 présente également les activités spécifiques de coagulation (SMCA) des deux protéases étudiées pour chaque étape de purification. Ces activités spécifiques augmentent au fur et à mesure que l'enzyme est purifiée. En effet, on passe de $20,21 \cdot 10^{-4}$ UP/mg pour la protéase d'*O. acanthium* précipité avec du SA à $1390 \cdot 10^{-4}$ UP/mg pour la même enzyme après gel filtration, ces valeurs sont supérieures à celles observées par la protéase de *G. tomentosa*. Egito *et al.* (2006) récupèrent d'avantage d'activité lors de la concentration de extrait brut des graines d'*Albizia lebbek* par le SA, il passe de $156 \cdot 10^{-3}$ UP/mg à $591 \cdot 10^{-3}$ UP/mg.

Tableau 12: Activité coagulante et force de coagulation des protéases d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa* sur le lait de vache UHT.

Espèces	Etape de purification	Protéines totales (mg/ml)	Activité Coagulante MCA (UP)	Force de Soxhlet	Activité Coagulante spécifique SMCA (UP/mg)
<i>O. acanthium</i>	Extrait brut	2,7	46,3.10 ⁻⁴	10,29.10 ⁻¹	17,14.10 ⁻⁴
	Après précipitation	5,46	110,4.10 ⁻⁴	24,54.10 ⁻¹	20,21.10 ⁻⁴
	Après gel filtration	0,10	139.10⁻⁴	30,88.10 ⁻¹	1390.10⁻⁴
<i>G. tomentosa</i>	Extrait brut	11,48	23,14.10 ⁻⁴	5,1.10 ⁻¹	2.10 ⁻⁴
	Après précipitation	11,33	59,76.10 ⁻⁴	13,3.10 ⁻¹	5,27.10 ⁻⁴
	Après gel filtration	0,24	87,6.10⁻⁴	19,4.10 ⁻¹	365.10⁻⁴
Présure commerciale		2	107,3.10 ⁻⁴	24.10 ⁻¹	-
		4	200.10 ⁻³	44,4	-
		6	220.10 ⁻³	48,8	-
		8	224.10 ⁻³	49,7	-
		10	330.10 ⁻³	73,3	-

4.2. Influence du pH sur le temps de floculation du lait

L'effet du pH du lait sur l'activité coagulante des protéases d'*O. acanthium* et de *G. tomentosa* à 30 °C est résumé dans les figures 26 et 27. Les deux courbes indiquent un meilleur temps de floculation aux pH acides. Comme pour la présure, le pH influe directement sur l'activité des enzymes coagulantes (Ramet, 1997 ; Desmazeaud, 1990). Toutes les coagulases du lait sont des protéases acides, de ce fait, leur activité est généralement optimale aux valeurs de pH proches de 5,5 (Ramet, 1997).

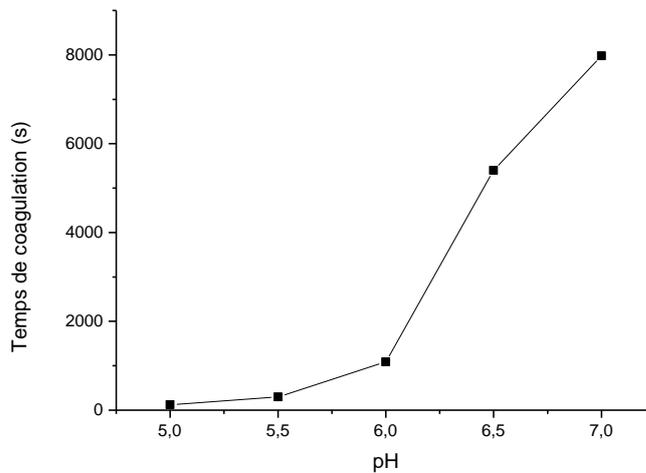


Fig26 : Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir d'*O. acanthium* en fonction du pH.

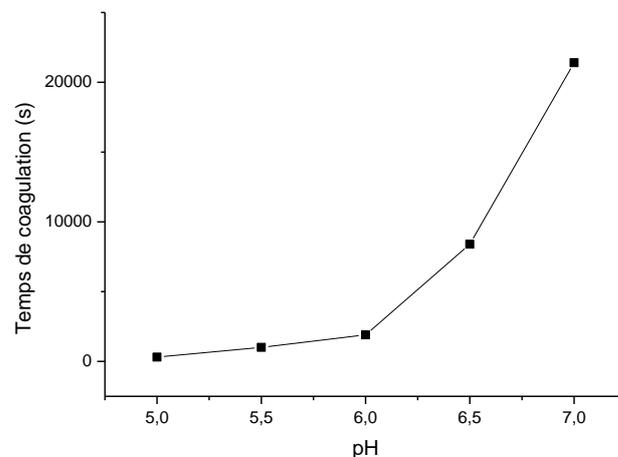


Fig27 : Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase extraite à partir de *G. tomentosa* en fonction du pH.

D'après les figures 26 et 27, les temps de coagulation diminuent beaucoup plus aux pH acides (6 à 5) qu'aux pH plus élevés (6 à 7). La même observation a été rapportée pour plusieurs autres protéases (Castillo *et al.*, 2000a ; Imafidon et Farkye, 1993 ; Spreer , 1991).

Les protéases acides des deux plantes étudiées montrent une dépendance à l'égard du pH similaire à celle de la présure de veau où un caillage du lait est obtenu plus rapidement dans des conditions acides que dans des conditions alcalines. (Richardson *et al.*, 1967). Ces résultats concordent avec de Hashem et al. (1999) pour *Penicillium oxalicum*, de Kumar et al. (2005) pour la protéase de *R. oryzae* et de Merheb-Dini et al. (2010) pour les protéases de *Thermomucor indicae-seudaticae*. Ces derniers décrivent une activité coagulante importante autour de pH 5 suivie par une perte importante de l'activité de coagulation du lait à pH 7.

Dans le cas des protéases de *Cynara scolymus* et de *Brassica napus*, les auteurs ont remarqué une forte diminution de l'activité coagulante (MCA) à pH 7 (Chazarra et al., 2007 ; El-Sayed et al., 2013).

Ces résultats montrent l'importance du pH du lait sur le temps de floculation. En effet, l'influence du pH est plus importante sur l'agrégation des protéines que sur leur hydrolyse (Eck, 1989). Cela s'explique par la stabilité maximale de la caséine Kappa dans l'intervalle de pH 5-6 et un pH optimum d'hydrolyse par la présure entre 5,1 et 5,3, ce qui entraîne une déstabilisation des micelles de caséines (Nagera *et al.*, 2003). Cependant, si l'abaissement du pH augmente l'activité coagulante de ces protéases, l'effet de l'acidification du lait sur les propriétés du gel formé et sur l'activité protéolytique au cours de la maturation et de l'affinage du fromage, doivent être pris en considération.

4.3. Influence de la température sur le temps de floculation du lait

L'effet de la température sur le temps de floculation du lait par les protéases végétales étudiées est déterminé entre 30°C et 60°C (figures 28 et 29). Il apparaît une diminution du temps de floculation lorsque la température augmente. Le temps de coagulation le plus court, correspondant à la meilleure activité coagulante, est observé vers 60°C et ce, quelque soit l'extrait coagulant. Les mêmes résultats sont rapportés pour les protéases acides de *R. oryzae* (Kumar *et al.*, 2005), de *C. scolymus* (Chazarra et al., 2007) et de *Brassica napus* (El-Sayed et al., 2013). Le maximum de l'activité coagulante est enregistré à la température de 65°C pour

les protéases acides de *Bacillus sphaericus* (El Bendary et al., 2007) et de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Merheb-Dini et al., 2010).

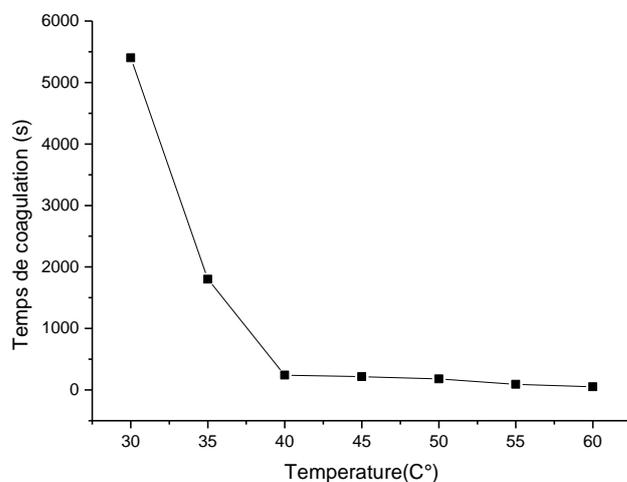


Fig28 : Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase d'*Onopordum acanthium* en fonction de la température.

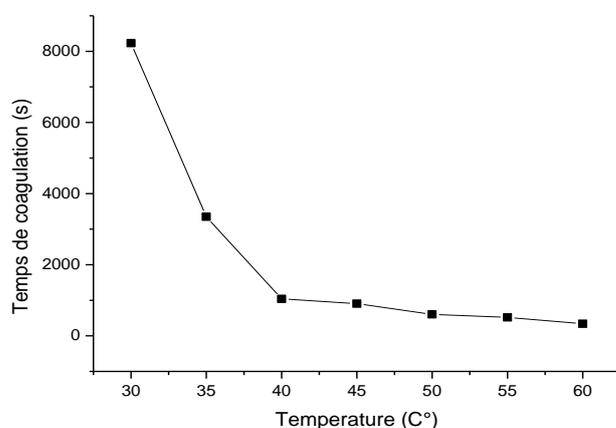


Fig29 : Variation du temps de floculation du lait de vache UHT traité par la protéase de *Galactites tomentosa* en fonction de la température.

On constate une diminution très importante du temps de coagulation lorsque la température du lait augmente de 30 à 40°C et plus faible lorsque la température passe de 40 à 50°C, et ce, aussi bien avec l'extrait d'*O. acanthium* qu'avec celui de *G. tomentosa*. Des résultats similaires sont signalés par la bibliographie où Ramet (1993) montrent l'existence d'une

relation quasi linéaire entre la température et l'activité des préparations coagulantes, dans l'intervalle de température de 25-40°C. Najera et al. (2003) et Chazarra et al. (2005) rapportent le même résultat dans un intervalle de 20- 40°C.

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. En effet, la température entraîne deux actions, l'une sur la réaction enzymatique, et l'autre sur l'agrégation (Mouranche et Costes, 1984).

4.4. Influence de la concentration du CaCl₂ sur la MCA

Les variations de l'activité de coagulation du lait en fonction de différentes concentrations de CaCl₂, enregistrées pour les deux extraits coagulants sont illustrés par les figures 30 et 31

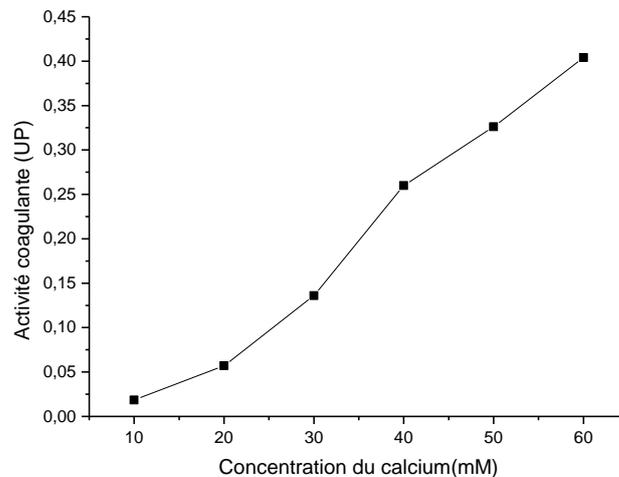


Fig30 : Variation de l'activité coagulante du lait de vache UHT traité par la protéase d'*Onopordum acanthium* en fonction de la concentration des ions calcium.

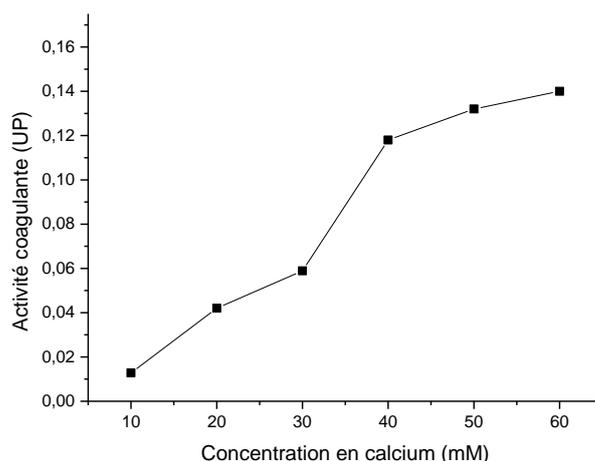


Fig31 : Variation de l'activité coagulante du lait de vache UHT traité par la protéase de *Galactites tomentosa* en fonction de la concentration des ions calcium.

D'après les deux représentations graphiques, la MCA augmente lorsque la teneur en Chlorure de calcium augmente, elle en est proportionnelle. Celui-ci, en plus de causer une légère baisse de pH par dissociation du H_2PO_4^- , tend à se fixer à la micelle. Sous l'addition de calcium, ces protéines demeurent solubles jusqu'à ce qu'une quantité critique soit liée après laquelle la solubilité diminue (Rollema, 1992).

Les résultats observés montrent que la concentration de CaCl_2 qui permet la plus grande activité coagulante correspond à 50mM et 60mM, avec les extraits de *G tomentosa* et d'*O acanthium* respectivement. Des résultats similaires sont notés par plusieurs auteurs, entre autres Sidrach et al. (2005) pour la cynarase A, Vairo et al. (2005) pour la protéase de *Sylibum marianum*, Chazarra et al. (2007) pour la protéase de *Cynara scolymus*, Nouani et al. (2009) pour les protéases de *Ficus carica* et de *Cynara scolymus*, Pontual et al. (2012) pour la protéases extraite des fleurs de *Moringa oleifera* et El-Sayed et al. (2013) pour l'aspartyl protéase de *Brassica napus*. Compte tenu de ces résultats, une concentration de 50mM est considérée comme suffisante pour augmenter l'activité coagulante à un niveau efficace en entraînant un raccourcissement très marqué du temps de coagulation et renforce la fermeté des gels (Ramet, 1994).

Étant donné que le pH est ajusté après l'ajout de calcium et non pas avant, les variations observées avec la concentration de calcium sont implicitement liées à un effet direct sur l'agrégation. En effet, La plupart des auteurs estiment que l'effet principal de CaCl_2 est plus

sur l'agrégation et le raffermissement (Castillo *et al.*, 2002b). La présence de calcium ionisé est indispensable à l'accomplissement de la phase secondaire de la coagulation du lait. En effet, les ions Ca^{+2} neutralisent les résidus de micelles de caséine négatifs pour former un caillé ferme lors de la deuxième phase du processus de coagulation (Pires *et al.*, 1999)

En fromagerie L'addition du CaCl_2 , le pH et la température sont des facteurs indispensable au déroulement de la phase secondaire de la coagulation qui conduit après hydrolyse de la κCn à la coagulation par association des micelles par l'entremise des interactions hydrophobes (Lenoir *et al.*, 1997).

5. Action des protéases d'*O acanthium* et de *G tomentosa* sur les caséines

L'effet des extraits végétaux sur la dégradation des différentes caséines : α , β et κ 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 et les hydrolysats résultants sont détectés par électrophorèse et HPLC.

5.1. Suivi par électrophorèse de la dégradation des caséines par les protéases

L'hydrolyse des caséines α , β et κ par les protéases des deux plantes et de la présure et l'étendue de la dégradation des différentes fractions de la caséine et les produits d'hydrolyse sont présentés dans les figures 32 et 33.

La caséine κ (19 kDa) montre une plus grande mobilité, suivie de la caséine β (24KDa) puis des caséines α_{s1} (23 kDa) et α_{s2} (25 kDa). Après 30 min d'incubation avec les extraits enzymatiques, les bandes des différentes caséines tendent à disparaître indiquant l'hydrolyse de ces protéines, et donc une diminution de leurs teneurs. Parallèlement, de nouvelles bandes de masses moléculaires plus faibles (à mobilité plus élevée) apparaissent ; les hydrolysats. Les deux enzymes montrent donc leur capacité à hydrolyser les trois types de caséine avec, cependant, une dégradation complète de la fraction κ . On constate une plus grande similitude de l'action de la présure avec la protéase acide d'*O. acanthium*, qu'avec celle de *G. tomentosa*. Globalement, les électrophorégrammes (fig 32 et 33) permettent de visualiser une action plus importante des extraits végétaux sur les différentes caséines par rapport à celle de la présure. Ces résultats sont comparables à de nombreux autres travaux réalisés sur des protéases coagulantes d'origine végétale tels que Brutti *et al.* (2012), Vairo *et al.* (2005), Chazarra *et al.* (2007) et Egito *et al.* (2007)

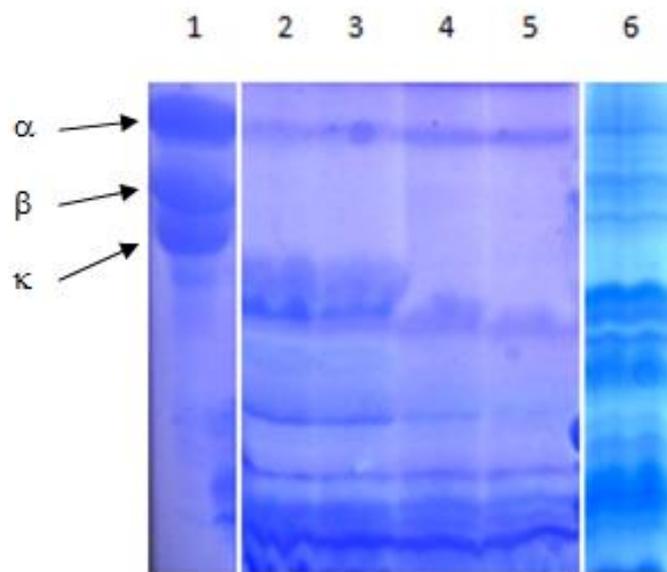


Fig32 : Analyse électrophorétique de la dégradation des caséines α , β et κ par les protéases après 30,60, 90 et 120 min de digestion.

1: caséines entière ; 2- 5 : hydrolyse par la protéase extraite à partir d' *Onopordum acanthium*
6 : hydrolyse par la présure (120 min).

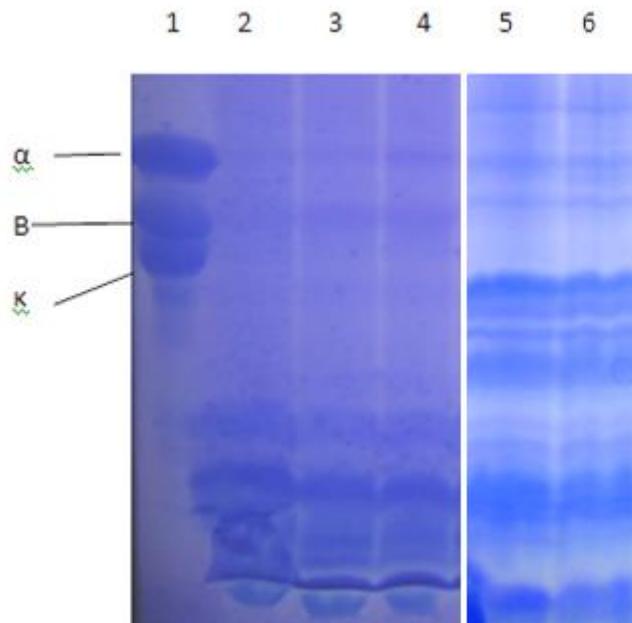


Fig33: Analyse électrophorétique de la dégradation des caséines α , β et κ par les protéases après 30,90 et 120 min de digestion.

1: caséines entière ; 2- 4 : hydrolyse par la protéase extraite à partir de *Galactites tomentosa*
5- 6 : hydrolyse par la présure (30 et 120 min).

L'hydrolyse de la caséine κ par les extraits enzymatiques végétaux et la présure, l'intensité de sa dégradation ainsi que les produits d'hydrolyse sont présentés dans les figures 34 et 35.

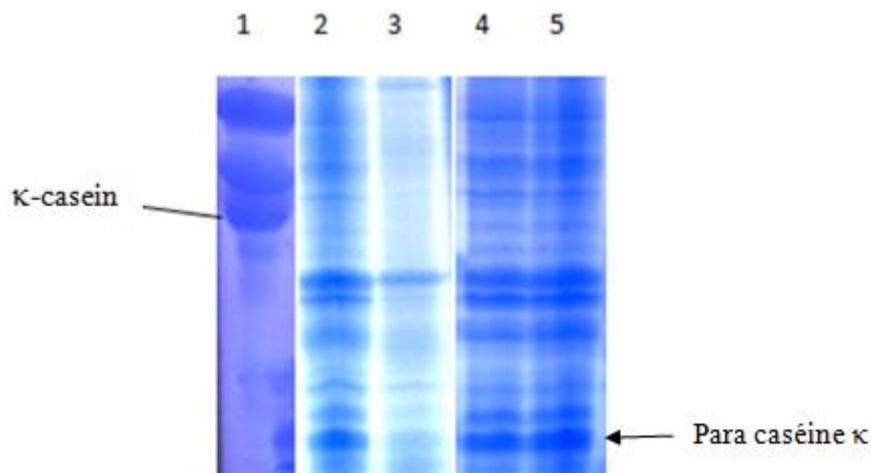


Fig34: Dégradation de la caséine κ par les protéases après 30 et 120 min d'incubation.

1: caséine totale; 2- 3: hydrolyse de la caséine par la protéase d'*O.acanthium*;

4 - 5 : hydrolyse de la caséine par la présure.

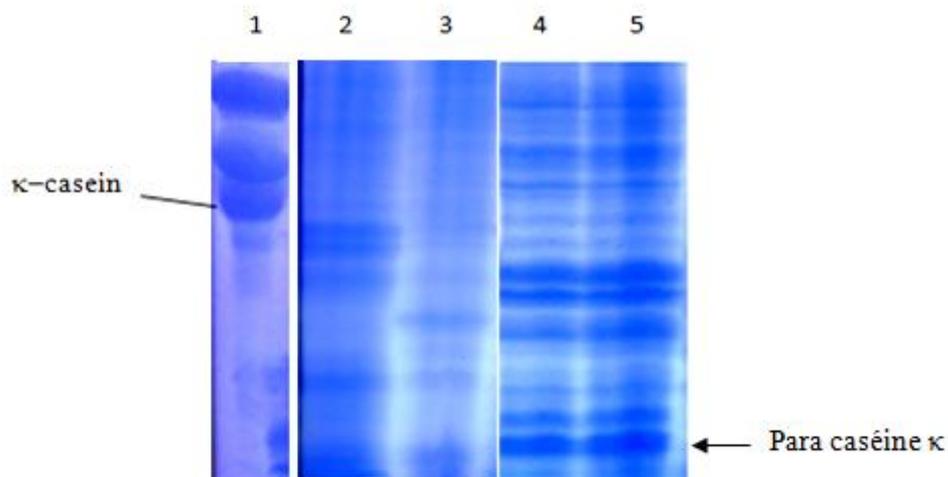


Fig35: Dégradation de la caséine κ par les protéases après 30 et 120 min d'incubation.

1: caséine totale; 2- 3: hydrolyse de la caséine par la protéase de *Galactites tomentosa*; 4 - 5 : hydrolyse de la caséine par la présure.

Après 30 min d'incubation, on observe un profil électrophorétique de la dégradation de la caséine κ par les protéases végétales similaire à celui obtenu par la présure (Figures 32 et 33). Ainsi, la caséine κ a été totalement dégradée et a entraîné la formation de composés à forte migration qui se retrouvent au niveau du front. Cette hydrolyse est accompagnée par une augmentation de l'intensité de la bande d'une protéine correspondant fort probablement à la para caséine κ . En effet, cette dernière est le résultat de l'action enzymatique sur la caséine κ au niveau de la liaison Phe105-Met106 lors de la phase primaire de la coagulation du lait (Mouranche et Costes, 1984 et Lucey, 1995)

Ces résultats indiquent que les extraits enzymatiques préparés à partir des deux plantes entraînent une hydrolyse de la caséine κ identique à celle de la présure. Par ailleurs, on constate que les hydrolysats (dont la para caséines κ) sont à leur tour dégradés après une incubation plus longue (colonne 3 dans les figures 34 et 35), contrairement à la présure où la bande de la paracaséine κ reste intacte même après 120 min, ce qui confirme les résultats observés dans les figures 30 et 31. L'action protéolytique de ces protéases indique donc une hydrolyse de la caséine κ au niveau de la liaison Phe105-Met106, ce qui aboutit à la formation de la paracaséine κ .

Les électrophorégrammes obtenus après l'action des protéases extraites d'*O acanthium* et de *G tomentosa* sont similaires à ceux obtenus avec les protéases d'autres plantes comme les cynarases A, B et C de *C. scolymus* (Chazarra *et al.*, 2007) et les protéases de *Mucor miehei* et d'*Endothia parasitica* (Vanderpoorten et Weckz, 1972). Il a été rapporté par la bibliographie l'étroite ressemblance entre les coagulants de certains chardons et la présure de veau. Ces mêmes auteurs observent une activité de coagulation du lait plus élevée par les coagulant végétal en poudre que par la chymosine dérivée de la présure de veau (Pino *et al.*, 2009).

Les propriétés hydrolytiques des deux protéases sur les caséines leur attribuent des activités coagulantes. En effet, plusieurs protéases végétales possèdent un schéma de dégradation similaire avec celui de la présure ; ce qui explique leur utilisation dans la production de fromages traditionnels. C'est le cas des extraits de *Cynara sp* utilisés dans la fabrication de divers fromages espagnols et portugais à partir de lait de brebis (Roseiro *et al.*, 2003).

5.2. Suivi par RP- HPLC de la dégradation des caséines par les protéases

La séparation par HPLC des différentes caséines avant et après hydrolyse sont présentés dans les fig. 36 (caséines non hydrolysées) et fig. 37 à 39 (hydrolyse par les extraits végétaux et la

présure pendant 30 min, 120 min et 24 h). D'après la figure 36, l'éluion des caséines s'est faite selon l'ordre suivant : κ , α et enfin β , avec des temps de rétention de 12 min, 14 min et 16 min successivement. Dans les autres figures, on observe une séparation de différentes fractions selon le temps d'hydrolyse et les propriétés des fragments obtenus. On constate que les constituants du mélange injecté se déplacent tous moins vite que la phase mobile et que leurs vitesses de déplacement varient selon les interactions hydrophobes plus ou moins fortes des peptides avec la colonne.

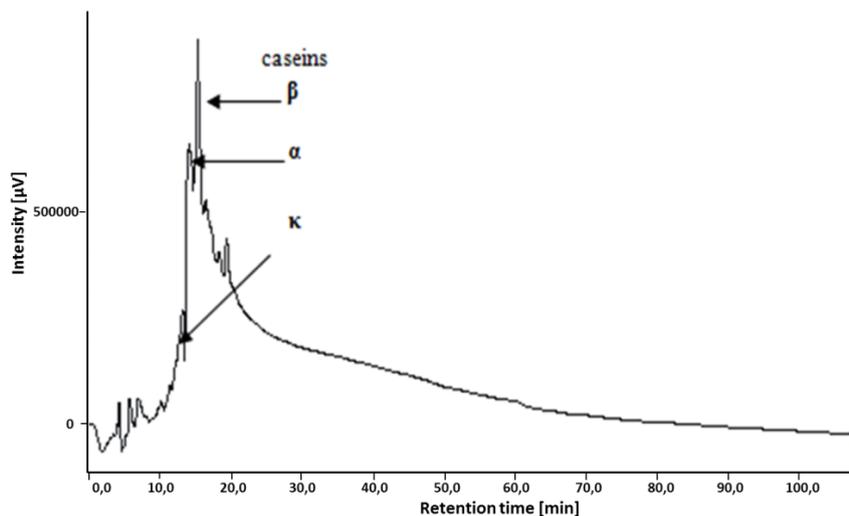


Fig36: Profil d'éluion des caséines α , β et κ (20 mg/ml) par RP-HPLC avant hydrolyse.

Débit : 0,7 ml/min par 0,06 % de TFA/méthanol.

D'après les résultats, on constate que les profils de fragments peptidiques formés par l'action des protéases d'*O. acanthium* (fig 37B, 38B et 39B) et de *G. tomentosa* (fig 37C, 38 C et 39 C) présentent des similarités avec les profils issus de l'action de la présure (fig 37A, 38A et 39A). On remarque également une action hydrolytique plus forte de l'extrait de la deuxième plante (*G. tomentosa*) qui entraîne l'apparition davantage de nouveaux pics par rapport à l'extrait de la première (*O. acanthium*) et de la présure.

Par ailleurs, après 30 minutes d'hydrolyse, les enzymes ont complètement dégradé la κ -caséine, ce qui se traduit par l'apparition de nouveaux pics entre 0 et 10 min. Les produits de

la digestion continue à être dégradée après les 30 min (Fig 38 et 39) ; cette observation vient confirmer les résultats de l'électrophorèse.

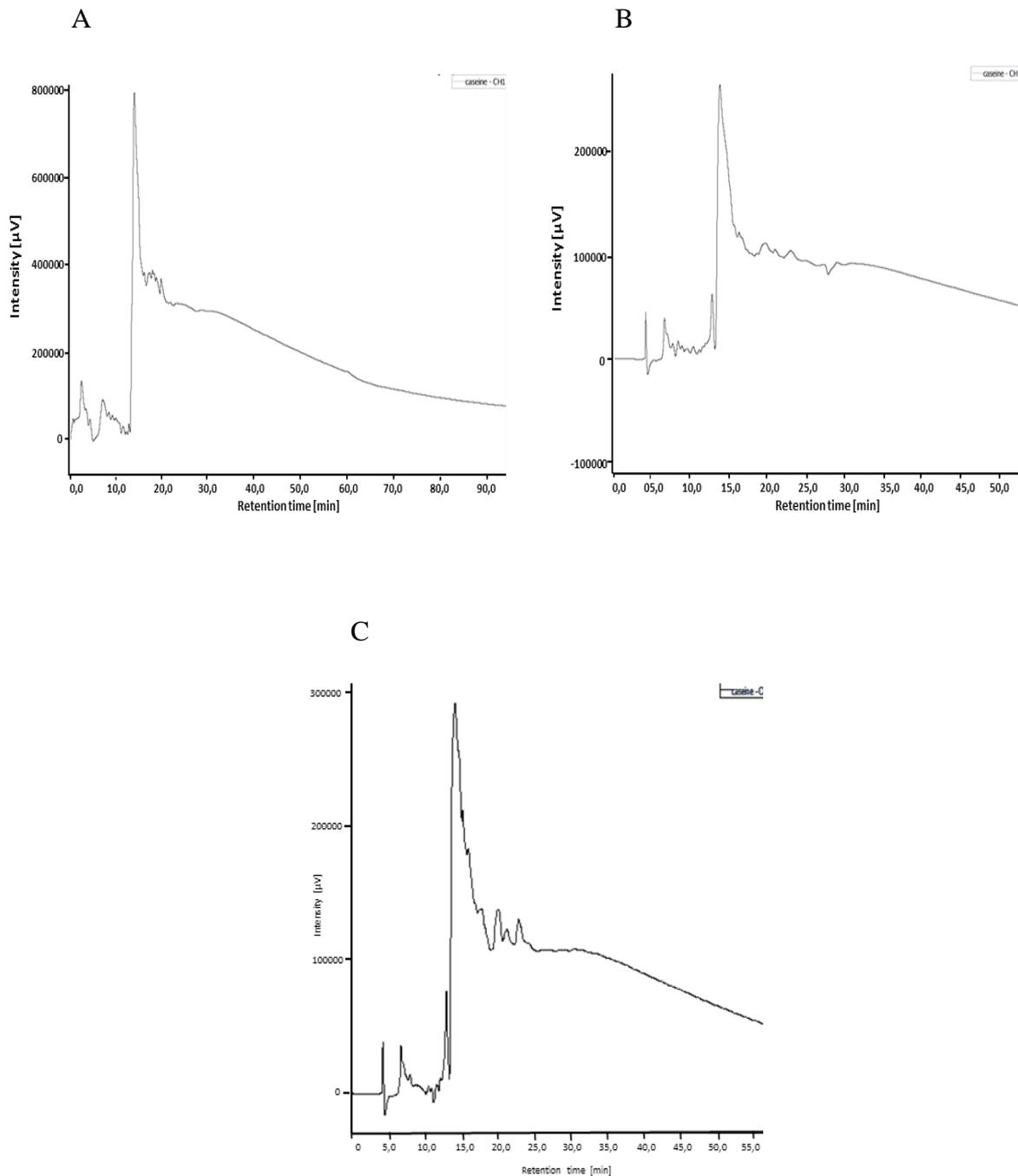


Fig37: Profil d'éluion des hydrolysats des différentes caséines α , β et κ -caséine (20 mg/ml) après 30min de digestion par RP-HPLC traitées par la présure (A), la protéase d'*O acanthium* (B) et la protéase de *G tomentosa* (C)

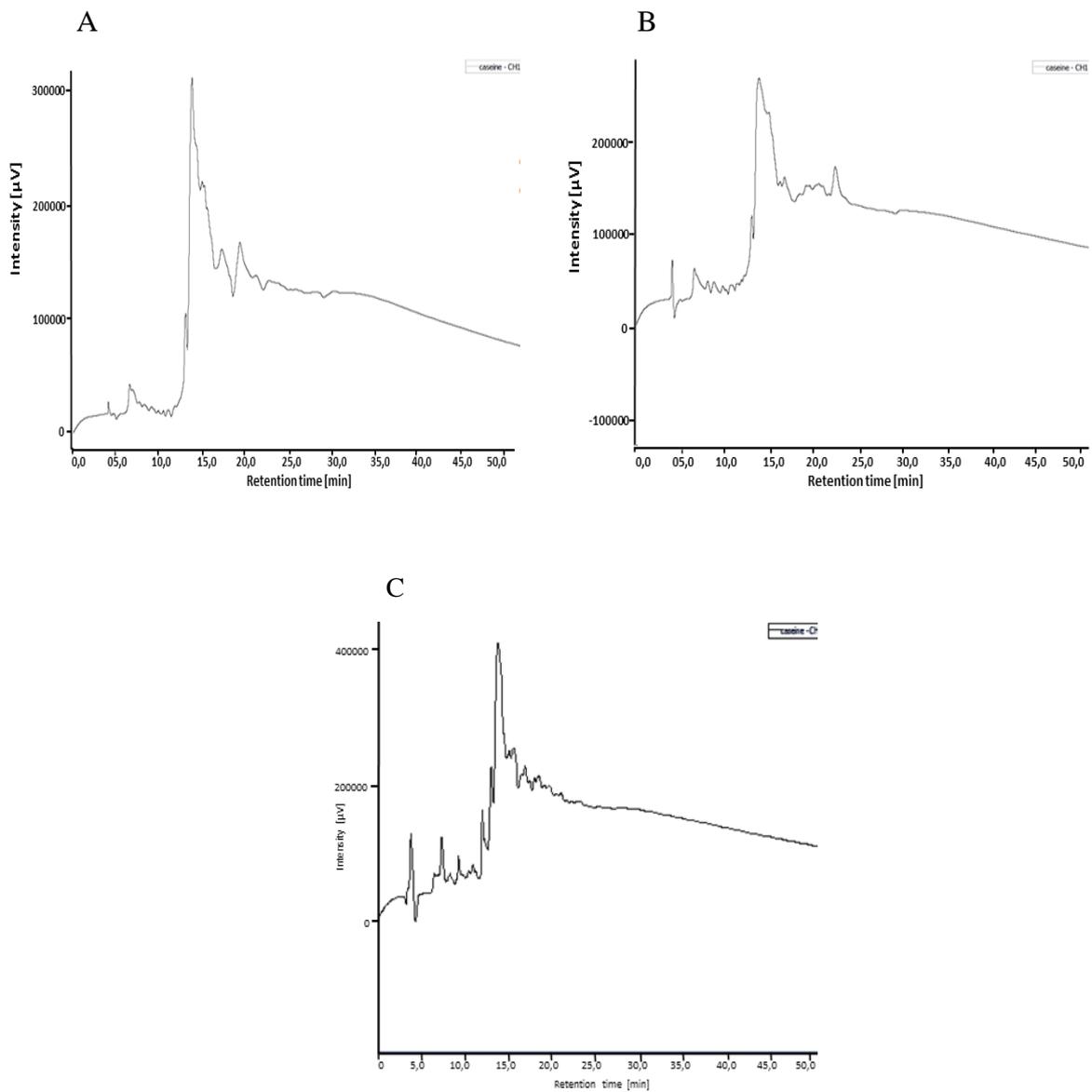


Fig38: Profil d'élution des hydrolysats des différentes caséines α , β et κ -caséine (20 mg/ml) après 120min de digestion par RP-HPLC traitées par la présure (A), la protéase d'*O. acanthium* (B) et la protéase de *G. tomentosa* (C)

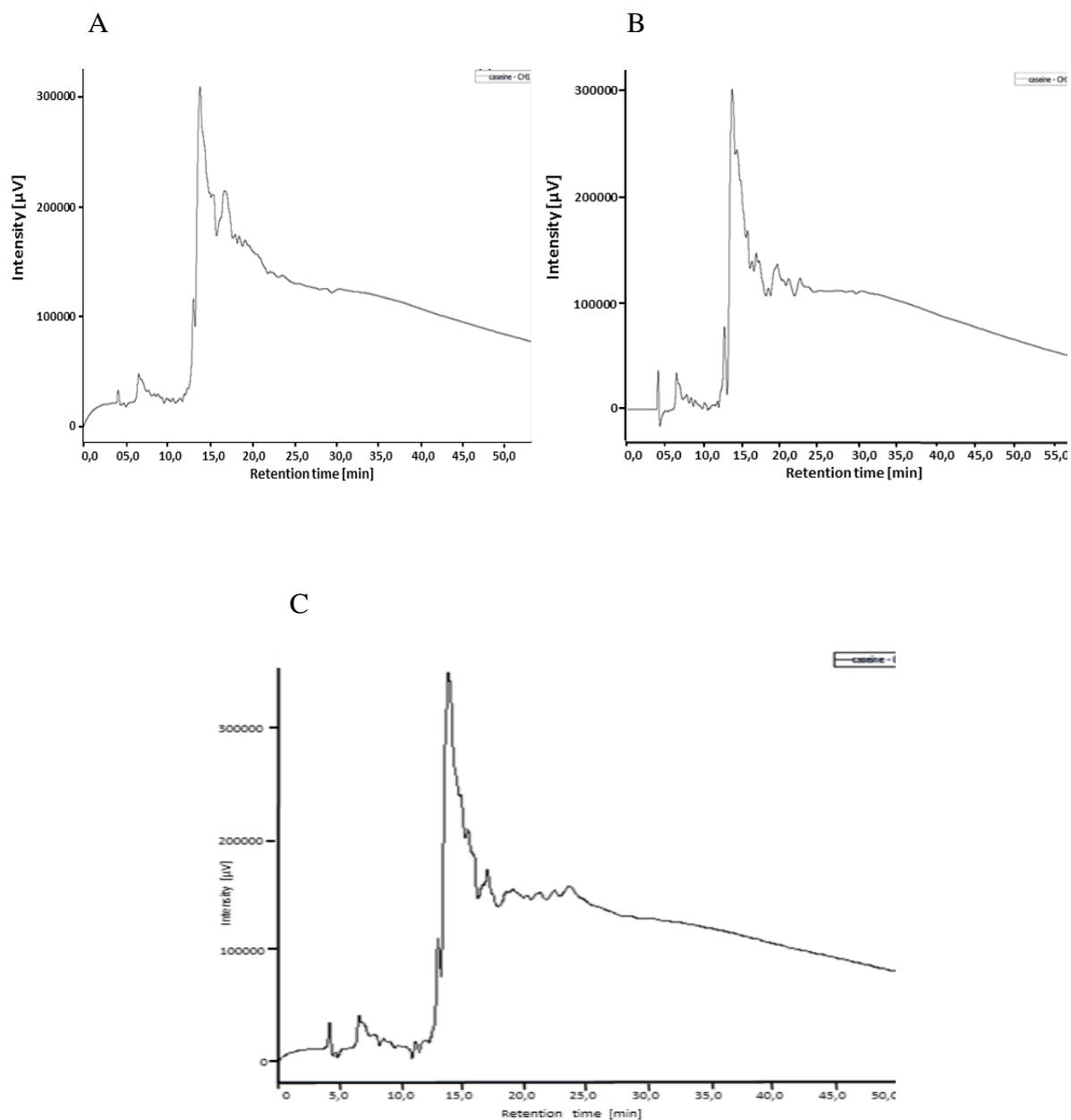


Fig39: Profil d'éluion des hydrolysats des différentes caséines α , β et κ -caséine (20 mg/ml) après 24h de digestion par RP-HPLC traitées par la présure (A), la protéase d'*O acanthium* (B) et la protéase de *G tomentosa* (C)

Les profils montrent que les caséines κ et β sont plus sensibles à l'action des trois enzymes. En effet, ces deux fractions disparaissent après 30min de digestion (Fig 37) alors que la fraction α est toujours présente après 24h (Fig 39) d'hydrolyse.

Le motif de fragments peptidiques formé par l'action des extraits enzymatiques de fleurs des deux plantes et celui de la présure ne sont pas tout à fait identiques, mais présentent des similitudes. Les trois principaux composants de la caséine, α -CN, β -NC et κ -NC, étaient plus sensibles à l'action des protéases végétales qu'envers l'action de la présure. Les mêmes résultats ont été observés aussi bien par Egito et al. (2007) en travaillant avec les extraits de protéases d'Albizia et de graines de tournesol que par Merheb-Dini et al. (2010) avec la protéase extraite de *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 et *Rhizomucor miehei*. Aussi l'activité des aspartylprotéases extraite de *Centaurea calcitrapa* a été jugée supérieure à celle de la présure et a exposée une activité plus spécifique envers les caséinates ovines et caprines, ce qui suggère leur utilisation comme substitut de la présure pour produire des fromages de haute qualité à partir de laits caprins et ovins (Tavaria et al., 1997).

L'hydrolyse des différentes caséines et en particulier la κ caséine par les deux protéases acides étudiées indique l'efficacité de l'action de ces enzymes vis à vis des caséines et de leur spécificité de kappa-fraction. Cette action a montré une hydrolyse de phe105-met106 responsable de l'agrégation des micelles de caséine, tel que produit par la présure du commerce.

Conclusion et Perspectives

Conclusion générale

L'étude de deux espèces végétales endémiques des sols incultes et largement répandues en Algérie, *Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa*, a permis de mettre en évidence leur richesse en protéases, au niveau des fleurs et particulièrement des pétales.

La purification des deux protéases étudiées par précipitation fractionnée suivie du tamisage moléculaire a permis de noter des degrés de purification de 26,65 et 15,47 et des rendements de 29,78% et 23,09% pour *O. acanthium* et de *G. tomentosa* respectivement.

La séparation des deux protéases par SDS-PAGE avec le zymogramme indique une seule bande d'activité protéolytique d'une masse molaire de 45 kDa. L'inactivation totale des deux protéases purifiées par la pepstatine A montre qu'il s'agit bien d'aspartylproteases. Les deux protéases ont un pH optimal de 4,0 et une température optimale de 40°C. Les enzymes de coagulation utilisées par l'industrie fromagère sont des aspartyl protéases et agissent à des pH proches de l'acidité. L'étude de la stabilité thermique a montré que les deux protéases acides ne sont pas thermostables, cette propriété peut être favorable à la fabrication fromagère. En effet, lors de l'affinage une faible activité protéolytique est souhaitée afin d'éviter le problème de l'amertume lié à l'hydrolyse excessive des liaisons peptidiques.

Parmi les quatre substrats naturels testés sur l'enzyme : BSA, ovalbumine, hémoglobine et caséine, le meilleur est la caséine qui donne l'activité la plus élevée. L'étude cinétique enzymatique selon Lineweaver et Burk a donné des V_m de 1329 U et 523,83 U et des constantes michaeliennes de 2,34 g/l et 3,47 g/l pour *O. acanthium* et pour *G. tomentosa* respectivement. Une activité caséinolytique spécifique élevée est souhaitée pour la coagulation du lait. La forme hyperbolique des deux courbes de cinétique montre que les protéases ont une structure monomérique.

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. En effet, ces trois facteurs influent de façon significative la coagulation du lait aussi bien en phase d'hydrolyse enzymatique qu'en phase d'agrégation. Les profils électrophorétiques et ceux de l'HPLC où la dégradation des différentes caséines et en particulier l'action spécifique sur la κ -caséine est observée, montrent des similitudes avec la présure commerciale. L'utilisation des ces deux protéases caractérisées peut être envisagée dans la coagulation du lait pour la fabrication du fromage mais des recherches ultérieures plus diversifiées méritent d'être entreprises et

poursuivies pour mieux connaître la spécificité de clivage de ces enzymes, ceci fournit des informations importantes pour les applications dans la biotechnologie.

Les chardons tels qu'*Onopordum acanthium* et de *Galactites tomentosa* sont largement répandus dans le bassin méditerranéen et particulièrement en Algérie. L'exploitation de ces plantes comme source de protéases, permet, non seulement de produire des enzymes localement, mais également de les valoriser. Leur reconnaissance est un préalable à leur sauvegarde et à leur réhabilitation.

L'utilisation des protéases végétales pourraient intervenir, en remplacement de certaines protéases d'origine animale ou microbienne importées au prix fort. Il est possible d'utiliser les extraits séchés de fleurs appartenant aux plantes étudiées dans la fabrication d'un fromage Algérien en utilisant des procédés modernes

Par ailleurs, l'utilisation des enzymes protéolytiques d'origine végétale pourrait s'appliquer à d'autres domaines que la fromagerie. En effet, les propriétés des différentes activités protéolytiques permettent de les utiliser dans la production de peptides spécifiques d'intérêts biologique ou technologique ou d'acides aminés destinés à l'alimentation du bétail ou à la consommation humaine, dans la lutte biologique contre certains parasites, etc.

Les enzymes sont des molécules à forte valeur ajoutée. Ceci nous incite à envisager une production à l'échelle semi-pilote et pilote en vue d'une application industrielle. Pour cela, il est nécessaire d'optimiser les méthodes d'extraction pour améliorer le rendement, d'appliquer des méthodes encore plus performantes pour la purification des protéases comme la chromatographie d'affinité et d'introduire des systèmes issus du clonage des gènes. Tous ces points peuvent s'inscrire dans les perspectives de ce travail.

Références

Références

A

- Alais, C. (1975). *Sciences du lait. Principes des techniques laitières. 3e édition.* Paris.
- Amiot, J., Fournier, F., Lebeuf, Y., Paquin, P., & Simpson, R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. In *Science et technologie du lait : transformation du lait* (Presses in, pp. 1–73). Montréal.
- Androuët, P. (2002). *Le dictionnaire des fromages du monde.* (Amazon, Ed.) (Le Cherche Midi). Collection Beaux Livres.
- Antao, C., & Malcata, F. (2005, July). Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. *Plant Physiology and Biochemistry*, *43*(7), 637–650
- Arima, K., Yu, J., Iwasaki, S., & Tamura, G. (1968). Milk-clotting Enzyme from Microorganisms. *Applied Microbiology*, *16*(11), 1727–1733. Ariza, E. L., & Delucchi, G. (1998). 280 Asteraceae, parte 11. Tribu XI. Cardueae. In E. L. Ariza (Ed.), *Flora Fanerogamica Argentina* (ProFlora, pp. 24–25). Cordoba.
- Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K., & Arai, S. (1997). Oryzasin as an Aspartic Proteinase Occurring in Rice Seeds: Purification, Characterization, and Application to Milk Clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(4), 1070–1075. Audigie, C., Dupont, G., & Zonszain, F. (1995). *Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Tome 1.* (DOIN).
- Austin, M. P., Groves, R. H., Fresco, L. M. F., & Kaye, P. E. (1985). Relative growth of six thistle species along a nutrient gradient with multispecies competition. *The Journal of Ecology*, *73*(2), 667–684.

B

- Barrett, A. J., & Rawlings, N. D. (2001, May). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biological Chemistry*, *382*, 727–733.
- Bartling, D., & Nosek, J. (1994). Molecular and immunological characterization of leucine aminopeptidase in *Arabidopsis thaliana*: a new antibody suggests a semi-constitutive regulation of a phylogenetically old enzyme. *Plant Science*, *99*(2), 199–209.

- Beers, E. P., Woffenden, B. J., & Zhao, C. (2000). Plant proteolytic enzymes: Possible roles during programmed cell death. *Plant Molecular Biology*, *44*(3), 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 characterisation. *Food Chemistry*, *128*(4), 847–853.
- Berger, D., & Altmann, T. (2000). A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, *14*(9), 1119–1131.
- Berridge, N. J. (1945). The purification and crystallisation of rennin. *Biochemistry*, *39*(2), 179–186.
- Bezanger-Beauquesne, L., Pinkas, M., Torck, M., & Trotin, F. (1990). *Plantes médicinales des régions tempérées. 2ème éd.* (V. Maloine, Ed. pp: 366-367). Paris.
- Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs.* (Lavoisier, pp: 1143).
- Bruno, M. A., Lazza, C. M., Errasti, M. E., Lopez, L. M. I., Caffini, N. O., & Pardo, M. F. (2010). Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(4), 695–701.
- Bruno, M. A., Trejo, S. A., Caffini, N. O., & López, L. M. I. (2008). Isolation and characterization of hyeronymain II, another peptidase isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (Bromeliaceae). *Protein Journal*, *25*, 224–231.
- Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., & Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT - Food Science and Technology*, *45*(2), 172–179.

C

- Cáceres Arriba, P. Fernández, J. I. (2000). Proceso de obtención de extractos en polvo de un coagulante de leche procedente de las flores del cardo *Cynara* sp. *Patente Espanhola* ES 2 139 550 A1.
- Castillo, M., Payne, F., Hicks, C., & Lopez, M. (2000). Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, *10*(8), 551–562.

- Castillo, M., Payne, F. A., Hicks, C. L., Laencina, J., & López, 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*(12), 1019–1023.
- Cerning, J., Gripon, J., & Desmazeaud, M. (1984). Utilisation des enzymes dans l'industrie laitière. *La Technique Laitière*, *992*, 9–24.
- Chaiwut, P., Pintathong, P., & Rawdkuen, S. (2010). Extraction and three-phase partitioning behavior of proteases from papaya peels. *Process Biochemistry*, *45*(7), 1172–1175.
- Chao, W. S., Gu, Y.-Q., Pautot, V., Bray, E., & Walling, L.L. (1999). Leucine Aminopeptidase RNAs, Proteins, and Activities Increase in Response to Water Deficit, Salinity, and the Wound Signals Systemin, Methyl Jasmonate, and Abscisic Acid. *Plant Physiology*, *120*(4), 979–992.
- Chao, W. S., Pautot, V., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (2000). Leucine aminopeptidases: the ubiquity of LAP-N and the specificity of LAP-A. *Planta*, *210*(4), 563–573.
- Chazarra, S., Sidrach, L., López-Molina, D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, *17*(12), 1393–1400.
- Chen, S., Zhao, J., & Agboola, S. (2003). Isolation and partial characterization of rennet-like proteases from Australian cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(10), 3127–3134.
- Collin, J. C., & Delecourt, R. (1988). A propos des méthodes d'analyse des enzymes applicables aux préparations enzymatiques industrielles. *Industries Alimentaires et Agricoles*, *105*(6), 448–460.
- Cordeiro, M. C., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1994). Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia Plantarum*, *92*(4), 645–653.
- Cysarz, D., Heckmann, C., Bettermann, H., & Kümmell, H. C. (2002). Effects of an anthroposophical remedy on cardiorespiratory regulation. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, *8*(6), 78–83. Retrieved from

D

- Dalgleish D G. (1997). The enzymatic coagulation of milk. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced in*

- Dairy Chemistry-1, proteins* (Blackie and Son Ltd, pp. 579–619).
- De Monet, B. J., De Lamark, P., & De Candolle, A. (1805). *Flore Française. 3eme édition.* (Delmarck & Decadolle, Eds.). Paris.
- Delacroix-Buchet, A., Lefier, D., & Nuuyts-Petit, V. (1993). Polymorphisme de la caséine κ de trois races bovines françaises et aptitude à la coagulation. *Lait*, 73, 62–72.
- Desmazeaud, M. (1983). La nutrition des bactéries lactiques. *Le Lait*, 63, 267–316.
- Desmazeaud, M. (1990). Les enzymes utilisées en industrie laitière. In *Lait et produits laitiers : Vaches-Brebis-Chèvre. Deuxième édition.* (Tec & Doc-Lavoisier-Apria). Paris.
- Devaraj, K. B., Kumar, P. R., & 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.
- Dewey, S. A. (1991). Weed thistles of the western United States. In L. F. James, J. O. Evans, M. H. Ralphs, & R. D. Child (Eds.), *Noxious Range Weeds* (Westview P, pp. 247–253). Boulder, Colorado.
- Distefano, S., Palma, J. M., McCarthy, I., & Del Rao, L. A. (1999). Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent pea leaves. *Planta*, 209(3), 308–313.
- Domingos, A., Cardoso, P. C., Xue, Z. T., Clemente, A., Brodelius, P. E., & Pais, M. S. (2000). Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *European Journal of Biochemistry*, 267(23), 6824–6831.
- Domingos, A., Xue, Z. T., Guruprasad, K., Clemente, A., Blundell, T., Pais, M. S., & Brodelius, P. E. (1998). An aspartic proteinase from flowers of *Centaurea calcitrapa*. Purification, characterization, molecular cloning, and modelling of its three-dimensional structure. *Adv Exp Med Biol.*, 436, 465–472. Retrieved from
- Domsalla, A., & Melzig, M. F. (2008, June). Occurrence and properties of proteases in plant latices. *Planta Medica*. 74,699–711.
- Dubey, V. K., Pande, M., Singh, B. K., & Jagannadham, M. V. (2007). Papain-like proteases : Applications of their inhibitors. *African Journal of Biotechnology*, 6(9), 1077–1086.

E

Eck, A. (1990). *El queso*. Barcelona: Omega

- Egito, A. S., Girardet, J. M., Laguna, L. E., Poirson, C., Mollé, D., Miclo, L., ... Gaillard, J. L. (2007). Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine *k*-casein. *International Dairy Journal*, 17(7), 816–825.
- El-Bendary, M., Moharam, M., & Ali, T. (2007). Purification and characterization of milk clotting enzyme produced by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(8), 695–699.
- El-Sayed, S. T., Elmazar, M. M. A., & Al-Azzouny, R. A. (2013). Purification and Characterization of a Novel Milk-Clotting Enzyme from *Brassica napus* Seeds. *Australian Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1), 482-493.

F

- Fazouane-Naimi, F., Mechakra, A., Abdellaoui, R., Nouani, A., Daga, S. M., Alzouma, A. M., ... Penninckx, M. J. (2010). Characterization and Cheese-Making Properties of Rennet-Like Enzyme Produced by a Local Algerian Isolate of *Aspergillus niger*. *Food Biotechnology*, 24(3), 258–269.
- Feijoo-Siota, L., & Villa, T. G. (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 1066–1088.
- Ferdinand, W. (1976). *The enzyme molecule*. (Bristol,pp:261-275). England.
- Fernandez-Lahore, H. M., Auday, R. M., Fraile, E. R., Biscoglio de Jimenez Bonino, M., Pirpignani, L., Machalinski, C., & Cascone, O. (1999). Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. *The Journal of Peptide Research : Official Journal of the American Peptide Society*, 53(6), 599–605.
- Fernández-Salguero, J., Prados, F., Calixto, F., Vioque, M., Sampaio, P., & Tejada, L. (2003). Use of recombinant cyprosin in the manufacture of ewe's milk cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7426–7430.
- Foltmann, B., & Szecsi, P. (1998). Chymosin. In A. Barrett, D. Rawlings, & J. Woessner (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Academic P, pp. 815–819). London.
- Fox, P. F. (1981). Exogenous proteinases in dairy technology. In *Proteinases and their inhibitors. Structure, function and applied aspects* (Pergamon P). Oxford, Angleterre.

Fox, P. F. (1993). Exogenous enzymes in dairy technology - A review. *Journal of Food Biochemistry*, 17(3), 173–199.

G

Galán, E., Prados, F., Pino, A., Tejada, L., & Fernández-Salguero, J. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. *International Dairy Journal*, 18(1), 93–98.

Gallagher, J., Kanekanian, A. D., & Evans, E. P. (1994). Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *International Journal of Food Science & Technology*, 29(3), 279–285.

Garcel, H. (2011). Bio-production de pétrole à partir d'*Onopordum acanthium* L. par pyrolyse lente. *Journal of Analytical and Applied Pyrolyse*, 92(1), 233–238.

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(3), 604–608.

Green, M. L., Hobbs, D. G., Morant, S. V., & Hill, V. A. (1978). Intermicellar relationships in rennet-treated separated milk: II. Process of gel assembly. *Journal of Dairy Research*, 45(03), 413-422.

Grudkowska, M., & Zagdańska, B. (2004). Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica*, 51(3), 609–624.

Gu, Y. Q., Holzer, F. M., & Walling, L. L. (1999). Overexpression, purification and biochemical characterization of the wound-induced leucine aminopeptidase of tomato. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 263(3), 726–735.

Guevara, M. G., Oliva, C. R., Huarte, M., & Daleo, G. R. (2002). An Aspartic Protease With Antimicrobial Activity is Induced after Infection and Wounding in Intercellular Fluids of Potato Tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), 131–137.

Guevara, M. G., Oliva, C. R., Machinandiarena, M., & Daleo, G. R. (1999). Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiologia Plantarum*, 106(2), 164–169.

Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(1), 15–32.

H

Hainque, B., Baudin, B., & Lefebvre, P. (2008). *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. (Flammarion, pp: 34-46). Paris.

Haldon, B., Drozd, B., Holub, M., & Bob-Kiewicz, T. (1975). *Archive immunologie. Médecine Science*, 23, 845–855.

Hashem, A. M. (1999). Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. *Bioresource Technology*, 70(2), 203–207.

Hashim, M. M., Mingsheng, D., Iqbal, M. F., & Xiaohong, C. (2011). Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Phytochemistry*, 72(6), 458–464.

Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., da Silva Figueiredo, A. C., & Pais, M. S. S. (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29(5), 1405–1410.

Heywood, V. H., & Harbone, J. B. (1977). An overture to the compositae. In V. H. Heywood, J. B. Harbone, & B. L. Turne (Eds.), *The biology and chemistry of the compositae. 1er éd.* (Academic p, pp. 1–17). Londre.

Hildmann, T. (1992). General Roles of Abscisic and Jasmonic Acids in Gene Activation as a Result of Mechanical Wounding. *The Plant Cell Online*, 4(9), 1157–1170.

Horne D. S., Muir D. D., Leaver J., McCreight T. A., Banks J. M., Law A. J. R., (1993). Influence of κ -casein genotype on rennet coagulation of bovine milk. In *Cheese yield et factors affecting its control*. (International Dairy Federation, pp: 142-150)

I

Imafidon, G. I., & Farkye, N. Y. (1993). Rennet Coagulability of High-Heat Treated Milk Influenced By Time of pH Adjustment. *Journal of Food Science*, 58(6), 1300–1302.

J

Jack, F. H., James, A. Y., & Raymond, A. E. (1970). Economic Evaluation of Scotch Thistle Suppression. *Weed Science*, 18(5), 583–586.

Jeschke, E., Ostermann, T., Vollmar, H. C., Kröz, M., Bockelbrink, A., Witt, C. M., ... Matthes, H. (2009). Evaluation of prescribing patterns in a German network of CAM physicians for the treatment of patients with hypertension: a prospective observational study. *BMC Family Practice*, *10*(1), 78.

Jiang, B., Siregar, U., Willeford, K. O., Luthe, D. S., & Williams, W. P. (1995). Association of a 33-kilodalton cysteine proteinase found in corn callus with the inhibition of fall armyworm larval growth. *Plant Physiology*, *108*(4), 1631–1640.

K

Kamoun, P. (1987). *Appareils et méthodes en biochimie, 3e édition*. (Flammarion). Paris.

Kent, U. M. (1999). Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *115*, 11–18.

Khaparde, S. S., & Singhal, R. S. (2001). Chemically modified papain for applications in detergent formulations. *Bioresource Technology*, *78*(1), 1–4.

Kobayashi, T., Kobayashi, E., Sato, S., Hotta, Y., Miyajima, N., Tanaka, A., & Tabata, S. (1994). Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA Research : An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, *1*(1), 15–26.

Koochek, M.H. and Pipelzadeh Ali-Ghochani, M.H. (2000). Effect of *Onopordon acanthium* on full-thickness dermal wound healing in rabbit. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, *8*(1-2), 45–49.

Kraut, J. (1977). Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, *46*, 331–58.

Kumar, A. G., Nagesh, N., Prabhakar, T. G., & Sekaran, G. (2008b). Purification of extracellular acid protease and analysis of fermentation metabolites by *Synergistes* sp. utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. *Bioresource Technology*, *99*(7), 2364–2372.

Kumar, D., Savitri, N., Thakur, R. V., & Bhalla, T. C. (2008a). Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. *Research Journal of Microbiology*, *13*(12), 661–672.

Kumar, S., Sharma, N. S., Saharan, M. R., & Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40(5), 1701–1705.

L

La Valle, J., Krinsky, D., & Hawkins, E. (2000). *Natural therapeutics pocket guide* (Lexi-Comp). Hudson, Ohio.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Lang, A., Hatscher, C., Wiegert, C., & Kuhl, P. (2009). Protease-catalysed coupling of N-protected amino acids and peptides with 4-aminoantipyrine. *Amino Acids*, 36(2), 333–340.

Leary, D., Vierros, M., Hamon, G., Arico, S., & Monagle, C. (2009). Marine genetic resources: A review of scientific and commercial interest. *Marine Policy*, 33(2), 183–194.

Lee, E. Y., Choi, D. Y., Kim, D. K., Kim, J. W., Park, J. O., Kim, S., ... Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics*, 9(24), 5425–5436.

Lehninger, A. (1982). *Principles of Biochemistry*. USA: Worth Publisher.

Lenoir, J., Remeuf, F., & Schneid, N. (1997). L’aptitude du lait à la coagulation par la présure. In Eck & Gillis (Eds.), *Le fromage, 3ème Ed* (Lavoisier). Paris.

Li, J., & Dalgleish, D. (2006). Mixed coagulation of milk gel formation and mechanism. *J. Agric. Food Chem*, 54, 4687–4695.

Lorente, B. E., Brutti, C. B., & Caffini, N. O. (2004). Purification and characterization of a milk-clotting aspartic proteinase from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8182–8189.

Lo Piero, A. R., Puglisi, I., & Petrone, G. (2002). Characterization of lettuce, a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2439–2443.

Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000).

Molecular Cell Biology. (W. H. & C. Freeman, Ed.). USA.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.

Lucey, J. A. (1995). Effect of heat treatment on the rennet coagulability of milk. In *Heat-induced changes in milk* (International Dairy Federation, pp. 171–187).

Lucey, J. K. (2002). Rennet coagulation of milk. In *Encyclopedia of Dairy Science* (Elsevier). New York.

M

Martínez, D. E., Bartoli, C. G., Grbic, V., & Guiamet, J. J. (2007). Vacuolar cysteine proteases of wheat (*Triticum aestivum* L.) are common to leaf senescence induced by different factors. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1099–1107.

Mechakra, A., Auberger, B., Remeuf, F., & Lenoir, J. (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sciences Des Aliments*, 19(6), 663–675.

Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Muñoz, F. F., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2006). Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt7), 2039–2047.

Merheb-Dini, C., Gomes, E., Boscolo, M., & da Silva, R. (2010). Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. *Food Chemistry*, 120(1), 87–93.

Miller, M. F., Carr, M. A., Ramsey, C. B., Crockett, K. L., & Hoover, L. C. (2001). Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *Journal of Animal Science*, 79(12), 3062–3068.

Mohamed Ahmed, I. A., Babiker, E. E., & Mori, N. (2010). pH stability and influence of salts on activity of a milk-clotting enzyme from *Solanum dubium* seeds and its enzymatic action on bovine caseins. *LWT - Food Science and Technology*, 43(5), 759–764.

Morcelle, S. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., Priolo, N., & Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1), 177–182.

Mouranche, A., & Costes, C. (1984). Hydrolases et Dépolymérase (Enzymes d'intérêt

- industrie). In *Biochimie Appliquée* (BORDAS). Paris.
- Moyrand, J. (2010). Gatuline-Skin-Repair-Bio : La nouvelle génération d'actif. *Gattefossé Review*, 76, 18–19.
- Mucina, L. (1989). Syntaxonomy of the *Onopordum acanthium* communities in temperate and continental Europe. *Vegetatio*, 81(1-2), 107–115.
<http://doi.org/10.1007/BF00045516>
- Mueller, M. S., & Mechler, E. (2005). *Medicinal plants in tropical countries. Traditional use-Experience-facts*. (Thieme). Stuttgart.
- Muñoz, F. F., Mendieta, J. R., Pagano, M. R., Paggi, R. A., Daleo, G. R., & Guevara, M. G. (2010). The swaposin-like domain of potato aspartic protease (StAsp-PSI) exerts antimicrobial activity on plant and human pathogens. *Peptides*, 31(5), 777–785.
- Müntz, K., Belozersky, M. A., Dunaevsky, Y. E., Schlereth, A., & Tiedemann, J. (2001). Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*, 52(362), 1741–1752.
- Mutlu, A., & Gal, S. (1999). Plant aspartic proteinases: enzymes on the way to a function. *Physiologia Plantarum*, 105(3), 569–576.
- Mutlu, A., Pfeil, J. E., & Gal, S. (1998). A probarley lectin processing enzyme purified from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Phytochemistry*, 47(8), 1453–1459.
- N**
- Nájera, A. I., de Renobales, M., & Barron, L. J. R. (2003). Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study. *Food Chemistry*, 80(3), 345–352.
- Napper, A. D., Bennett, S. P., Borowski, M., Holdridge, M. B., Leonard, M. J., Rogers, E. E., ... Shames, S. L. (1994). Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. *The Biochemical Journal*, 301, 727–35.
- Nouani, A., Dako, E., Morsli, A., Belhamiche, N., Belbraouet, S., Bellal, M. M., & Dadie, A. (2009). Characterization of the Purified Coagulant Extracts Derived from Artichoke Flowers (*Cynara scolymus*) and from the 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.

O

Okamoto, T., & Minamikawa, T. (1995). Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine endopeptidase (SHEP). *Eur J Biochem*, 231, 300–305.

Otsuki, N., Dang, N. H., Kumagai, E., Kondo, A., Iwata, S., & Morimoto, C. (2010). Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 760–767.

Ould El Hadj, M., Didi Hadj-Mahammed, M., & Zabeirou, H. (2003). Place of the spontaneous plants samples in the traditional pharmacopoeia of the area of Ouargla (Septentrional east Sahara). *Courrier Du Savoir*, 03, 47–51.

P

Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., & del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6), 521–530.

Pardo, M. F., López, L. M., Canals, F., Avilés, F. X., Natalucci, C. L., & Caffini, N. O. (2000). Purification of balansain I, an endopeptidase from unripe fruits of *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3795–3800.

Park, H., Kusakabe, I., Sakakibara, Y., & Kobayashi, H. (2001). Autoproteolytic processing of aspartic proteinase from sunflower seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(3), 702–705.

Pautot, V., Holzer, F. M., Chaufaux, J., & Walling, L. L. (2001). The induction of tomato leucine aminopeptidase genes (LapA) after *Pseudomonas syringae* pv. tomato infection is primarily a wound response triggered by coronatine. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 14(2), 214–24.

Pautot, V., Holzer, F. M., Reisch, B., & Walling, L. L. (1993). Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 90(21), 9906–9910.

- Pechan, T., Ye, L., Chang, Y., Mitra, A., Lin, L., Davis, F. M., & Luthe, D. S. (2000). A Unique 33-kD Cysteine Proteinase Accumulates in Response to Larval Feeding in Maize Genotypes Resistant to Fall Armyworm and Other *Lepidoptera*. *The Plant Cell*, 12(7), 1031–1041.
- Pelmont, J. (1995). *Enzymes catalyseurs du monde vivant* (Presses Un, pp: 619-655). Paris.
- Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P. L. H., & Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42(3), 324–330.
- Piper, G. (1984). Scotch thistle - a continuing menace in the Pacific Northwest. Pacific Northwest Weed Topics. *Pacific Northwest Weed Topics*, 84, 1–2.
- Pires, M. S., Orellana, G. A., & Gatti, C. A. (1999). Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca²⁺ and pH. *Food Hydrocolloids*, 13(3), 235–238.
- Polaina, J., & MacCabe, A. P. (2007). *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (Springer). New York.
- Pontual, E. V, Carvalho, B. E. A., Bezerra, R. S., Coelho, L. C. B. B., Napoleão, T. H., & Paiva, P. M. G. (2012). Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. *Food Chemistry*, 135(3), 1848–1854.

R

- Rai, R., & Taneja, V. (1998). Papain catalysed hydantoin hydrolysis in the synthesis of amino acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244(3), 889–892.
- Ramalho-Santos, M., Pissarra, J., Veríssimo, P., Pereira, S., Salema, R., Pires, E., & Faro, C. J. (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., & Scher, J. (1997). Propriétés physiques du coagulum. In A. Eck & J. Gillis (Eds.), *Le fromage, 3ème Ed* (Tec & Doc-Lavoisier).
- Ramet, J.-P. (1998). Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication des fromages au lait de dromadaire. *Colloques - CIRAD*, 241–255.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 62(3), 597–635.

- Raposo, S., & Domingos, A. (2008). Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process Biochemistry*, 43(2), 139–144.
- Rawlings, N. D., & Barrett, A. J. (1995). Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods in Enzymology*, 248, 183–228.
- Reis, P. M., Lourenço, P. L., Domingos, A., Clemente, A. F., Salomé Pais, M., & Malcata, X. (2000). Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *International Dairy Journal*, 10(11), 775–780.
- Renault, C., Gastaldi, E., Cuq, J. L., & De La Fuente, B. T. (2000). Effect of Temperature of Milk Acidification on Rennet Gel Properties. *Journal of Food Science*, 65(4), 630–634.
- Ribadeau Dumas, B. (1991). Physicochimie et biochimie des protéines de lait. Données récentes. *Lait*, 71, 133–139.
- Ricci, C., & Ciricofolo, E. (1983). *Osservazioni sull'Acanthiophilus helianthi ROSSI (Diptera Tephritidae) dannoso al cartamo in Italia Centrale.* (REDIA, LXVI, pp. 577-592).
- Rollema, H. H. (1992). Casein association and micelle formation. In P.F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry-1: Proteins* (Elsevier A, pp. 111–140). London, UK.
- Roseiro, L. B., Barbosa, M., Ames, J. M., & Wilbey, R. A. (2003). Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56(2), 76–85.
- Roupas, P. 2001. On-farm practices and post farmgate processing parameters affecting composition of milk for cheesemaking. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 56(3), 219-232.
- Roy, J. J., Sumi, S., Sangeetha, K., & Abraham, T. E. (2005). Chemical modification and immobilization of papain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(2), 184–188.
- Ruettimann, K. W., & Ladisch, M. R. (1987). Casein micelles: structure, properties and enzymatic coagulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(10), 578–589.

S

- Salvador, S. M., Novo, C., & Domingos, A. (2006). Evaluation of the presence of aspartic

- proteases from *Centaurea calcitrapa* during seed germination. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), 893–898.
- Sampaio, P. N., Fortes, A. M., Cabral, J. M. S., Pais, M. S., & Fonseca, L. P. (2008). Production and characterization of recombinant cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(4), 305–312.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689–2694.
- Sangeetha, K., & Abraham, T. E. (2006). Chemical modification of papain for use in alkaline medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(3), 171–177.
- Sarmiento, A. C., Lopes, H., Oliveira, C. S., Vitorino, R., Samyn, B., Sergeant, K., ... Barros, M. T. (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta*, 230(2), 429–439.
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220(2), 183–197.
- Schaller, A., Bergey, D. R., & Ryan, C. A. (1995). Induction of wound response genes in tomato leaves by bestatin, an inhibitor of aminopeptidases. *The Plant Cell*, 7(11), 1893–1898.
- Scriban, R. (1993). *Biotechnologie. 4eme édition*. (Lavoisier, pp. 30-695). Paris.
- Sidrach, L., García-Cánovas, F., Tudela, J., & Rodríguez-López, J. N. (2005). Purification of cynarases from artichoke (*Cynara scolymus* L.): enzymatic properties of cynarase A. *Phytochemistry*, 66(1), 41–49.
- Silva, S. V., Barros, R. M., & Malcata, F. X. (2002). Hydrolysis of Caseins By Extracts of *Cynara Cardunculus* Precipitated by Ammonium Sulfate. *Journal of Food Science*, 67(5), 1746–1751.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005a). Partial identification of water-soluble 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(6), 1947–1954.
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005b). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89(1), 19–26.

- Simões, I., & Faro, C. (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 271(11), 2067–2075.
- Soares, P. M. S., Calixto, F. C., & Planta, R. J. (2000). Production by yeast of aspartic proteinases from plant origin. Instituto de Ciencia Aplicada e Tecnologia. International Patent WO 00/75283 A1.
- Spreer, E. (1991). *Lactologia industrial* (Acribia). Zaragoza, Spain.
- St-Gelais, D., & Tirard-Collet, P. (2002). Fromage. In *Science et technologie du lait : transformation du lait*. (Presses in, pp. 349–415). Montréal.
- Storer, A. C., & Ménard, R. (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 486–500.
- Suguna, K., Padlan, E. A., Smith, C. W., Carlson, W. D., & Davies, D. R. (1987). Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(20), 7009–7013.
- Sullivan, G. A., & Calkins, C. R. (2010). Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue. *Meat Science*, 85(4), 730–734.
- Sumantha, A., Larroche, C., & Pandey, A. (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211–220.
- Sutoh, K., Kato, H., & Minamikawa, T. (1999). Identification and possible roles of three types of endopeptidase from germinated wheat seeds. *Journal of Biochemistry*, 126(4), 700–707.

T

- Takahashi, K., Matsumoto, K., Nishii, W., Muramatsu, M., Kubota, K., & Shibata, C. (2009). Comparative studies on the acid proteinase activities in the digestive fluids of *Nepenthes*, *Cephalotus*, *Dionaea*, and *Drosera*. *Carniv Pl Newsl*, 38, 75–82.
- Takeda, N., Kistner, C., Kosuta, S., Winzer, T., Pitzschke, A., Groth, M., ... Parniske, M. (2007). Proteases in plant root symbiosis. *Phytochemistry*, 68(1), 111–121.
- Tamer, I. M. (1993). Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme

from *Onopordum turcicum*. *Biotechnology Letters*, 15(4), 427–432.

Tanabe, S., Arai, S., & Watanabe, M. (1996). Modification of wheat flour with bromelain and baking hypoallergenic bread with added ingredients. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(8), 1269–1272.

Tavaria, F. K., Sousa, M. J., Domingos, A., Malcata, F. X., Brodelius, P., Clemente, A., & Pais, M. S. (1997). Degradation of Caseins from Milk of Different Species by Extracts of *Centaurea calcitrapa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(10), 3760–3765.

Theppakorn, T., Kanasawud, P., & Halling, P. J. (2004). Activity of immobilized papain dehydrated by n-propanol in low-water media. *Biotechnology Letters*, 26(2), 133–136.

Tornero, P., Conejero, V., & Vera, P. (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6332.

U

Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications* (Wiley & Sons). New York.

Umar Dahot, M. (2001). Purification and some properties of Acid protease from *Penicillium Expansum*. *Pakistan J. Appl. Sci*, 1, 405–408.

Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Matsuzaki, M., & Hamada, M. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 23(5), 259–262.

V

Vairo-Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *The Journal of Dairy Research*, 72(3), 271–275.

Van der Hoorn, R. A. L. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 191–223. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835>

Vanderpoorten, R., & Weckz, M. (1972). Break-down of casein by rennet and microbial milk clotting enzymes. *Neth Milk Dairy J*, 26, 47–59.

Varshavsky, A. (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America, 93(22), 12142–12149.

- Vasbinder, A. J., Rollema, H. S., & de Kruif, C. G. (2003). Impaired rennetability of heated milk; study of enzymatic hydrolysis and gelation kinetics. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1548–1555.
- Veríssimo, 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 of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 235(3), 762–768.
- Vieira, M., Pissarr, J., Veríssimo, P., Castanheira, P., Costa, Y., Pires, E., & Faro, C. (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), 529–39.
- Viggiani, G. (1963). Osservazioni sulla morfo-biologia delPnigalio mediterraneus Ferr. & del. (Hym. eulophidae). *Entomophaga*, 8(3), 191–198.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., & Singh, S. A. (2009). Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114(2), 402–407.

W

- Wang, J., Zhao, M., Zhao, Q., & Jiang, Y. (2007b). Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101(4), 1658–1663.
- Wang, J.-S., Zhao, M.-M., Zhao, Q.-Z., Bao, Y., & Jiang, Y.-M. (2007a). Characterization of hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis of wheat gluten. *Journal of Food Science*, 72(2), C103–107.
- Wang, Y. T., Yang, C. Y., Chen, Y.-T., Lin, Y., & Shaw, J.-F. (2004). Characterization of senescence-associated proteases in postharvest broccoli florets. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 42(7-8), 663–670.
- Warlop, F. (2006). Limitation des populations de ravageurs de l'olivier par le recours à la lutte biologique par conservation. *Cahiers Agricultures*, 15(5), 449–455.

Westergaard, J. L., Hackbarth, C., Treuhaft, M. W., & Roberts, R. C. (1980). Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures. *Journal of Immunological Methods*, 34(2), 167–175.

White, I. (1991). Tephritid flies (Diptera : Tephritidae). In *Handbooks for the Identification of British Insects* (Royal Ento). London.

Y

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

Z

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389–395.

Sites internet

1. <http://docslide.fr/documents/les-enzymes-pr-eric-chabriere-ericchabriereafmbuniv-mrs-fr.html>
2. <http://biochimej.univ-angers.fr/>
3. <http://www.tela-botanica.org/>
4. <http://ephytia.inra.fr/>

Annexes

ANNEXE 1

Préparation des membranes de dialyse

La technique usuelle consiste à placer successivement les membranes

- 1h dans un mélange à volume égal d'éthanol et d'eau
- 1h dans du bicarbonate de sodium 10Mm
- 1h dans une solution diluée d'EDTA
- Et enfin 2h dans de l'eau distillée. La membrane ainsi préparée peut être conservée à 4°C pendant 2 à 3 jours dans de l'eau. Si le délai de conservation est plus long il faut ajouter un inhibiteur de poussé bactérienne (solution d'azide de sodium). Avant utilisation, il faut rincer la membrane avec le solvant utilisé pour la dialyse.

Préparation de l'hémoglobine dénaturée

- Agitation de 20ml de 25g d'Hb/L (sigma) plus 2,5ml de 0,6M d'HCl durant 30min.
- Le pH est ajusté à pH4 par 0,5M de NaOH , la concentration finale étant 20mg/m
- la solution est filtrée pour éliminer le précipité.

Dosage de l'activité protéolytique

- Solution nécessaires

- Solution de caséine 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.
- Tampon citrate / sodium 0.05M, pH 5.5.
- Extraits enzymatique.
- Solution mère de la tyrosine avec une concentration de 100µg/ml pour l'étalonnage.

- Solution d'acide trichloracétique (T.C.A) à 4%.
- Solution de Na_2CO_3 2% (w/v) dans du NaOH 0.1N.
- Réactif de Folin-Ciocalteu dilué à 50%.

- Le dosage

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

La 1^{ère} étape étant la réaction enzymatique ; dont le mélange réactionnel est constitué de :

- 1ml de l'extrait enzymatique.
- 1.5ml du tampon citrate / sodium 0.05M, pH 5.5.
- 2.5ml de la solution de caséine à 2.5% dissoute dans du citrate de sodium 0.02M.

L'incubation se fait au bain marie à 40°C ; après une 1h la réaction est arrêtée par addition de 5ml de T.C.A à 4%, qui permet la précipitation de la caséine non hydrolysée. Les blancs réactionnels sont traités de la même manière que l'échantillon sauf qu'ici le TCA est rajouté bien avant le substrat afin d'empêcher la réaction enzymatique

La 2^{ème} étape étant le dosage colorimétrique ; Après filtration les composés azotés non protéiques qui se trouvent dans la phase soluble, sont dosées selon la méthode d'ANSON (1958).

- 0.5ml filtrat.
- 2.5 ml de Na_2CO_3 à 2% dans du NaOH 0.1N.

Après agitation et repos 10min, on ajoute 0.25ml du réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/2. Bien agiter et incubé 30min à température ambiante. L'absorbance est lue contre le blanc réactionnel à 750nm au spectrophotomètre (JENWAY 6315).

Dosage des protéines

- **Solutions nécessaires**
- **Solution A** : 2% de Na_2CO_3 dans de NaOH 0.1N.
- **Solution B** : 1% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans l'eau distillé.
- **Solution C** : 2% tartrate double de sodium et de potassium dans l'eau distillé.
- **Solution M** : c'est un mélange de :
 - 20ml de la solution A
 - 1ml de la solution B
 - 1ml de la solution C
- **Solution E** : le réactif de Folin- Ciocalteu dilué au 1/10.
- **Solution mère de BSA (Sérum Albumine Bovine)** à $500\mu\text{g/ml}$ pour l'étalonnage.

- **Dosage**

A 1 ml de l'extrait enzymatique, on ajoute 1 ml de la solution M. On laisse reposer 15min puis on ajoute 3 ml du réactif de Folin. On agite juste après et on incube 45 min à température ambiante et à l'obscurité. La lecture de l'absorbance se fait à 750 nm au spectrophotomètre (JENWAY 6315).

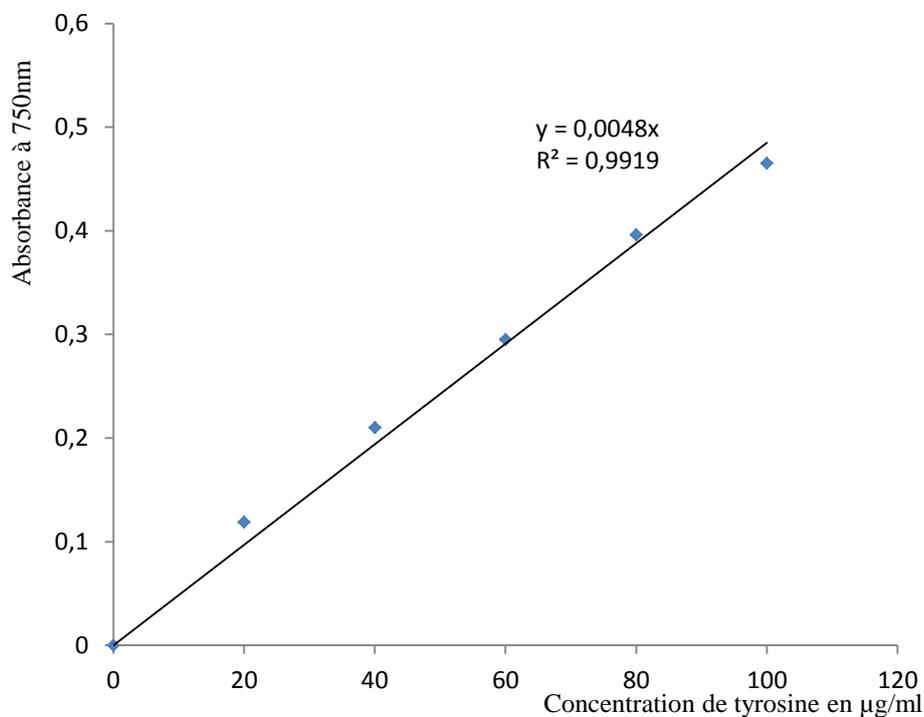
ANNEXE 2

- 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 ₂ CO ₃ (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Folin-Ciocalteu dilué au 1/2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

L'absorbance lue à 750nm permet de tracer la courbe

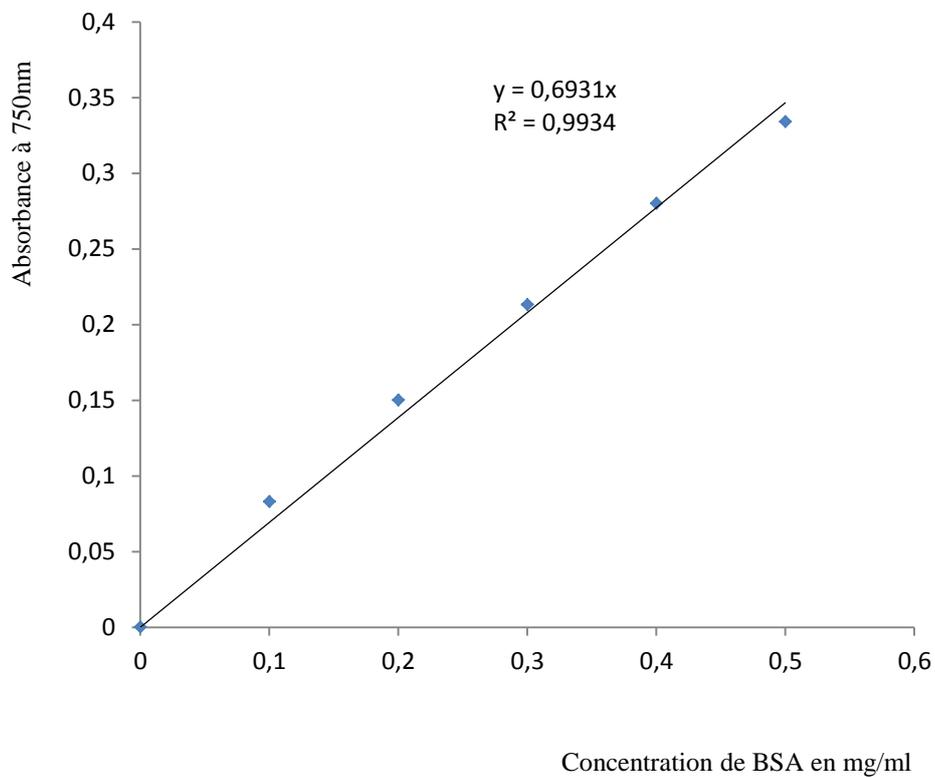


Courbe étalon de la Tyrosine

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

La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution mère de sérum albumine à 500µg/ml

Dilution	0	1/5	2/5	3/5	4/5	1/5
Solution mère (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Mélange M (ml)	1	1	1	1	1	1



Courbe étalon de la BSA.

ANNEXE 3

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

***O. acanthium* (p < 0,05)**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Ligne 1	3	19,93	6,64333333	0,27053333
Ligne 2	3	28,54	9,51333333	0,45453333
Ligne 3	3	38,35	12,78333333	1,18043333
Ligne 4	3	234,4	78,13333333	7,45333333
Ligne 5	3	300	100	0
Ligne 6	3	195,64	65,21333333	39,92663333
Ligne 7	3	104,26	34,75333333	6,44253333
Ligne 8	3	76,16	25,38666667	0,65973333
Ligne 9	3	43,52	14,50666667	20,25013333
Ligne 10	3	0	0	0
Ligne 11	3	0	0	0

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	35328,9029	10	3532,89029	507,083441	1,31321E-23	2,29669596
A l'intérieur des groupes	153,275733	22	6,96707879			
Total	35482,1786	32				

**Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour
O. acanthium (p < 0,05)**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Ligne 1	3	190,010919	63,3369729	12,3297335
Ligne 2	3	227,08595	75,6953166	2,7908228
Ligne 3	3	264,713652	88,237884	2,74246254
Ligne 4	3	300	100	0
Ligne 5	3	238,354591	79,4515302	2,25704797
Ligne 6	3	199,967024	66,6556747	0,32270384
Ligne 7	3	181,86131	60,6204365	2,29351488
Ligne 8	3	168,246755	56,0822517	7,76056101

ANALYSE DE VARIANCE						
<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	4735,64261	7	676,520373	177,466315	5,90029E-14	2,6571966
A l'intérieur des groupes	60,9936931	16	3,81210582			
Total	4796,6363	23				

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

G. tomentosa ($p < 0,05$)

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Ligne 1	3	43,83	14,61	9,6313
Ligne 2	3	180,16	60,0533333	28,6485333
Ligne 3	3	300	100	0
Ligne 4	3	260	86,6666667	82,3333333
Ligne 5	3	216,75	72,25	99,4375
Ligne 6	3	33,52	11,1733333	6,2226333

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	20600,1854	5	4120,03708	109,249401	1,40683E-09	3,105875239
A l'intérieur des groupes	452,5466	12	37,7122167			
Total	21052,732	17				

**Analyse de la variance de l'effet du pH sur l'activité protéolytique pour
G. tomentosa (p < 0,05)**

RAPPORT DÉTAILLÉ

<i>Groupes</i>	<i>Nombre d'échantillons</i>	<i>Somme</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Variance</i>
Ligne 1	3	224,83	74,94333333	26,4996333
Ligne 2	3	245	81,66666667	2,333333333
Ligne 3	3	300	100	0
Ligne 4	3	231,86	77,28666667	1,40723333
Ligne 5	3	226,99	75,66333333	4,34003333
Ligne 6	3	213,05	71,01666667	7,15083333
Ligne 7	3	186,27	62,09	22,1043

ANALYSE DE VARIANCE

<i>Source des variations</i>	<i>Somme des carrés</i>	<i>Degré de liberté</i>	<i>Moyenne des carrés</i>	<i>F</i>	<i>Probabilité</i>	<i>Valeur critique pour F</i>
Entre Groupes	2439,19276	6	406,532127	44,5791265	2,48021E-08	2,847725996
A l'intérieur des groupes	127,670733	14	9,1193381			
Total	2566,8635	20				

Production
Scientifique

Publications et Communications

Les travaux réalisés ont fait l'objet de deux publications et une communication

Publications:

1/ Benkahoul M., Benchiheub M., Bellil I., Khelifi D. and Mechakra Maza Aicha. (2015).

Partial characterization of acid protease from *Galactites tomentosa* flowers. International Journal of Advanced Research, Vol 3(8), pp.368-376

2/ Benkahoul M., Benchiheub M., Bellil I., Khelifi D. and Mechakra Maza Aicha. (2016).

Physical and chemical properties of the acid protease from *Onopordum acanthium*: Comparison between electrophoresis and HPLC of degradation casein profiles. African journal of Biotechnologie, Vol. 15(9), pp. 331-340

Communications:

Benkahoul M., Benchiheub M & Mechakra A. (2013). Extraction et étude des propriétés d'une protéase acide de fleurs d'*Onoprdum acanthium* Journées Scientifiques sur la Valorisation des Bioressources mai 2013 (Tunisie).

Résumés

Résumé

Deux protéases acides sont extraites à partir des fleurs de deux plantes locales appartenant à la famille des composés, *Onopordum acanthium* et *Galactites tomentosa*. Une purification des enzymes est réalisée par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium puis par tamisage moléculaire. Les rendements en activité récupérés sont de 30 % et 23 %, avec des degrés de purification de 26,65 et 15,47 pour *O. acanthium* et *G. tomentosa* respectivement. L'électrophorèse sur SDS-PAGE et le zymogramme font ressortir une seule bande d'activité enzymatique correspondant à un poids moléculaire égale à 45 KDa pour les deux protéases végétales. La caractérisation physico-chimiques a donné un pH optimal de 4 et une température optimale aux alentours de 40°C dans les deux cas. Ces protéases sont inhibées par la pepstatine A indiquant qu'il s'agit d'aspartylprotéases et activées par les ions Ca^{+2} . La représentation michaelienne des l'activité des deux protéases a donné une forme des courbes hyperboliques caractéristiques d'une structure monomérique des enzymes, résultat confirmé par le zymogramme. Les valeurs des paramètres cinétiques calculés à partir de la représentation de Lineweaver-Burk sont : vitesses maximales (V_{max}) de 1329 U et 523,83 U et constantes de Michaelis (K_M) de 2,34 g/L et 3,47 g/L pour *O. acanthium* et de *G. tomentosa* respectivement. Ces résultats montrent une grande affinité de ces protéases vis-à-vis du substrat caséine. L'étude des propriétés coagulantes du lait par les protéases acides extraites des deux plantes est indiquée par activité coagulante optimale à 60°C et à pH 5 et une concentration de 50 mM en calcium. Les profils électrophorétiques et de la HPLC montrent que ces protéases sont capables d'hydrolyser les caséines α , β et κ . l'analyse de ces profils permettent de caractériser les produits de dégradation et donc, de proposer un mécanisme de réaction de ces enzymes. En conclusion, les caractéristiques de ces enzymes indiquent qu'elles peuvent être utilisées comme substitut de présure ou utilisées en association avec d'autres présures.

Mots-clés : Protéases, *Onopordum acanthium*, *Galactites tomentosa*, purification, coagulation du lait

Abstract

A study was carried out on two acid proteases extracted from the flowers of two local plants belonging to the family of *Asteracea* (*Onopordum acanthium* and *Galactites tomentosa*). Proteases were purified in two steps, fractional precipitation with AS and molecular sieving chromatography. The yields activity recovered are 29,78% and 23,09%, with purification degrees of 26,65 and 15,47 for *Onopordum acanthium* and *Galactites tomentosa* respectively. The separation of acid proteases by SDS-PAGE and zymogram show a single enzyme activity band corresponding to a molecular weight equal to 45 kDa for both enzymes. The study of physicochemical properties allows to obtain an optimum pH of 4, an optimum temperature of 40°C. These enzymes are inhibited by pepstatin A indicating that it is aspartylprotease and activated by Ca²⁺ ions. The Michaelis representation of the activity of two proteases gave a form of hyperbolic curves characteristics of a monomeric structure of enzymes result confirmed by the zymogram. The values of the kinetic parameters calculated from the Lineweaver-Burk representation are V_{max} 1329 U and 523.83 U and K_M of 2.34 g/l and 3.47 g/l for *Onopordum acanthium* and *Galactites tomentosa* respectively. These enzymes caused coagulation of milk. The coagulant activity of these proteases is optimum at 60 ° C and pH 5, at a concentration of 50 mM in calcium. The electrophoretic profiles and HPLC show that 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 or used in combination with other rennet..

Keywords: Proteases, *Onopordum acanthium* and *Galactites tomentosa*, purification, Milk clotting activity.

الملخص

تم إجراء هذه الدراسة على نوعين من الأشواك البرية من نوع Chardons. لقد تمت تنقية اثنتين من البروتياز الحمضي من زهور النباتتي *Onopordum acanthium* و *Galactites tomentosa*. مردود النشاط الأنزيمي المتحصل عليه بعد مرحلتين من التنقية، الجزئي الإقصاء اللوني والتبادل الأيوني اللوني، هو 29,78% و 23,09٪، تنقية على درجة من تنقية 26,65 و 15,47 لكل من *Onopordum acanthium* و *Galactites tomentosa* على التوالي. أعطى فصل الأنزيمات النقية بواسطة SDS PAGE الوزن الجزيئي لكل من الأنزيمين 45 KDa وقد سمحت دراسة الخصائص الفيزيائية بتحديد درجة الحموضة المثلى من 4 والأمثل درجة حرارة 40 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 بالايون ثنائي التكافؤ Ca^{+2} من جهة أخرى، مما يؤكد أن الأنزيم من نوع pepstatine-A المعايير الحركية لهذه البروتياز هي $U \text{ Vm}$ 1329 U و K_M 523,83 U و 2,34 g/L و 3,47 g/L على التوالي. هذه الأنزيمات تسبب تجلط حليب إن نشاط التخثر البروتيني الأمثل كان عند 60 درجة مئوية، ودرجة الحموضة 5، بتركيز 50 mM من الكالسيوم. هذه المخثرات لها القدرة على تحليل ا ب ك كازيين. هذه النتائج تشير إلى انه يمكن استخدام هذه الأنزيمات كبدائل للمخثرات المستعملة في صناعة الجبن..

الكلمات المفتاحية

O. acanthium, *G. tomentosa*, البروتياز الحمضي، التنقية، التطبيقات التكنولوجية، نشاط التخثر البروتيني

Nom : BENKAHOUL

Prénom: MALIKA

Date de soutenance : 8 mai 2016

Thème Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, *Galactites tomentosa* et *Onopordum acanthium*.

Résumé

Deux protéases acides sont extraites à partir des fleurs de deux plantes locales appartenant à la famille des composés, *Onopordum acanthium* et *Galactites tomentosa*. Une purification des enzymes est réalisée par précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium puis par tamisage moléculaire. Les rendements en activité récupérés sont de 30 % et 23 %, avec des degrés de purification de 26,65 et 15,47 pour *O. acanthium* et *G. tomentosa* respectivement. L'électrophorèse sur SDS-PAGE et le zymogramme font ressortir une seule bande d'activité enzymatique correspondant à un poids moléculaire égale à 45 KDa pour les deux protéases végétales. La caractérisation physico-chimiques a donné un pH optimal de 4 et une température optimale aux alentours de 40°C dans les deux cas. Ces protéases sont inhibées par la pepstatine A indiquant qu'il s'agit d'aspartylprotéases et activées par les ions Ca^{+2} . La représentation michaelienne des l'activité des deux protéases a donné une forme des courbes hyperboliques caractéristiques d'une structure monomérique des enzymes, résultat confirmé par le zymogramme. Les valeurs des paramètres cinétiques calculés à partir de la représentation de Lineweaver-Burk sont : vitesses maximales (V_{max}) de 1329 U et 523,83 U et constantes de Michaelis (K_M) de 2,34 g/L et 3,47 g/L pour *O. acanthium* et de *G. tomentosa* respectivement. Ces résultats montrent une grande affinité de ces protéases vis-à-vis du substrat caséine. L'étude des propriétés coagulantes du lait par les protéases acides extraites des deux plantes est indiquée par activité coagulante optimale à 60°C et à pH 5 et une concentration de 50 mM en calcium. Les profils électrophorétiques et de la HPLC montrent que ces protéases sont capables d'hydrolyser les caséines α , β et κ . l'analyse de ces profils permettent de caractériser les produits de dégradation et donc, de proposer un mécanisme de réaction de ces enzymes. En conclusion, les caractéristiques de ces enzymes indiquent qu'elles peuvent être utilisées comme substitut de présure ou utilisées en association avec d'autres présures.

Mots-clés : Protéases, *Onopordum acanthium*, *Galactites tomentosa*, purification, coagulation du lait

Laboratoire de recherche : Biologie et environnement Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Constantine 1.

Directrice de thèse : M^{me} MECHAKRA A. Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine

Devant le Jury

Présidente : M^{me} AMEDAH S.

Professeur, Université des Frères Mentouri Constantine

Examineurs : M^{me}. FAZOUANE F.

Professeur, Université Boumerdès

M^r. NOUANI A.

M.C, Université Boumerdès

M^r. OULDJAOUI A.

M.C, Université Oum EL Bouaghi

M^r. NOUADRI. T

M.C, Université des Frères Mentouri Constantine