

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Frères Mentouri Constantine



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES
AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)
DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

N° d'ordre :
N° de série :

Mémoire
présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Magister en sciences alimentaires
Option : Technologie Alimentaire

Hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales en vue de réduire leur allergénicité

Présenté par :
LAZZOUNI Imane.

Devant le Jury composé de :

Président :	NAMOUNE H.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.
Rapporteur :	ZIDOUNE M. N.	Professeur I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.
Examineurs :	BECILA S.	M.C/ I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.
	BENATALLAH L.	M.C/ I.N.A.T.A.A. U.F.M.C.

Année universitaire 2015-2016.

Remerciements

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

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

Monsieur le professeur ZIDOUNE MN, pour son encadrement scientifique, sa patience et ses conseils pertinents.

Madame BENSMIRA S. pour sa gentillesse, son aide précieuse et ses conseils remarquables pour la réalisation de ce mémoire.

Madame ADOUI F pour sa gentillesse, ses encouragements et ses conseils remarquable je la remercie profondément.

Madame BOUGHELLOUT H pour sa gentillesse et ses remarques objectives je la remercie infiniment.

Je tiens également à remercier

Mr le professeur NAMOUNE H d'avoir accepté de présider le jury. Ainsi que Mme BECILA S et Mme BENATALLAH L d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver, ici l'expression de ma reconnaissance et mon respect.

Un grand merci et tous mes encouragements à toute ma promotion de magister.

Je remercie particulièrement, les membres de l'équipe T.E.P.A. du laboratoire L.N.T.A. pour leur contribution et le temps qu'ils ont bien consacré pour la réalisation de ce mémoire.

Que toutes les personnes de l'INATAA ; administrateurs, enseignants et laborantins trouvent ici, l'expression de ma vive reconnaissance pour leurs service.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À tous ceux qui aiment le Dieu et le prophète Mohamed (Paix et Salut sur Lui).

À toute ma famille ; à la mémoire de mon père qui a tellement sacrifié pour mes études, à ma mère qui m'a comblée de bonheur, à mes frères, Djamel Eddine, youcef et Abdelbasset ;

À ma très chère tante Nacira et ma grande mère fellla pour leur soutien et leur prières pour ma réussite ;

À ma deuxième famille ; à mon oncle Rachide pour son soutien inestimable, que dieu lui donne santé et bonheur, ma tante Sakina pour sa compréhension et son soutien permanent, à ma sœur manoula, mes frères Raouf et Wassim, je leur dis merci pour les souvenirs inoubliables ;

À mon oncle Abdellouahed pour son encouragement permanent, et à toute sa famille ;

À ma grande mère barisa et ma tante Rokia et à tous mes proches, oncles et tantes.

À mon oncle Aissa, je le remercie infiniment pour son approvisionnement en fleurs de cardon et je lui dis un grand merci pour son estime de la science ; et à toute sa famille ;

À ma chère sœur Souad mon ancien binôme et à sa petite famille ;

À tous mes amies et amis que j'ai eus la chance d'avoir à mes côtés et particulièrement ceux qui j'ai connu à l'INATAA ;

À tous ceux qui m'aiment et je leur dis merci pour ce sentiment précieux ;

ET

*À TOUS CEUX QUI LUTTIENT POUR LA PAIX ET LA JUSTICE DANS LE MONDE
IMANE*

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction 01

Rappels bibliographiques

I. L'allergie alimentaire 03

I.1. Généralités..... 03

1.1. Définition..... 03

1.2. Mécanisme de l'allergie alimentaire..... 03

1.3. Tableau clinique de l'allergie alimentaire 04

1.4. Facteurs favorisant ou aggravant..... 05

I.2. Allergie aux protéines du lait de vache 05

2.1. Définition..... 05

2.2. Épidémiologie et fréquence de l'APLV 06

2.3. Mécanisme et symptomatologie 06

2.4. Allergènes du lait de vache et épitopes 07

2.4.1. Définition d'un allergène alimentaire..... 07

2.4.2. Allergènes du lait bovin..... 08

II. Les traitements technologiques pour réduire l'allergénicité des protéines du lait..... 12

II.1. Traitements thermiques..... 13

II.2. Fermentation bactérienne..... 13

II.3. Traitements enzymatique 14

III. Enzymes protéolytiques..... 15

III.1. Définition..... 15

III.2. Enzymes d'origine animale 15

III.3. Enzymes d'origine végétale..... 16

3.1. La ficine..... 16

3.1.1. Généralités sur le figuier..... 16

3.1.2. Classification des différentes formes de figuier 17

3.1.3. Latex 18

3.1.4. Caractéristiques de la ficine (ficain) (EC 3.4.22.3) 18

3.1.5. Hydrolyse par la ficine 19

3.2. Les cardosines	19
3.2.1. Généralité sur le cardon	19
3.2.2. Localisation du système enzymatique dans la plante	20
3.2.3. Caractéristiques du système enzymatique	21
3.2.4. Hydrolyse des caséines par les protéases de l'extrait de cardon	23

Matériel et méthodes

I. Extraction des systèmes enzymatiques.....	27
I.1.Extrait brut de la ficine.....	27
I.1.1. Collection de latex.....	27
I.1.2. Extraction	27
I.2.Extrait brut des fleurs de cardon	29
I.2.1.Collecte des fleurs	29
I.2.2. Conservation des fleurs	29
I.2.3. obtention de l'extrait enzymatique brut	30
II. Caractérisation des extraits obtenus.....	32
II.1. Mesure du pH.....	32
II.2.Extrait sec total	32
II.3. Détermination de la teneur en protéines	32
II.4. Détermination de l'activité coagulante	33
II.5. Dosage de l'activité protéolytique	35
II.6. Activité spécifique	36
II.7. Electrophorèse SDS-PAGE	36
III. Hydrolyse des caséines.....	37
III.1. Cinétique d'hydrolyse.....	37
III.2. Evaluation de la protéolyse	38
III.2.1.Evaluation de la protéolyse par la méthode OPA.....	38
III.2.2. Evaluation de la protéolyse par électrophorèse SDS-PAGE	39
III.3.Test de l'allergénicité des hydrolysats obtenus	39
III.3.1.Détermination du profil immuno-électrophorétique par Le western blot	40

Résultats et discussion

I. Caractéristiques des extraits enzymatiques.....	44
I.1. Extrait de la ficine	44

I.1.1. Rendement en extrait enzymatique brut.....	44
I.1.2. Caractéristiques physicochimiques	44
I.2. Extrait de fleurs de cardon	44
I.2.1. Rendement en extrait enzymatique brut.....	44
I.2.2. Caractéristiques physicochimiques	45
I.3. Activités enzymatiques des extraits	46
I.3.1. Activité coagulante.....	46
I.3.2. Activité protéolytique.....	47
I.4. Les profils électrophorétiques	49
II. Hydrolyse enzymatique de la caséine bovine	50
II.1. Hydrolyse par la ficine.....	50
II.1.1. Evolution du degré d'hydrolyse.....	50
II.1.2. Profil électrophorétique des hydrolysats.....	52
II.2. Hydrolyse par la cardosine.....	53
II.2.1. Evolution du degré d'hydrolyse.....	53
II.2.2. Profil électrophorétique des hydrolysats	55
III. Evaluation de l'allergénicité des hydrolysats obtenus.....	56
III.1. Profil immuno-électrophorétique par le western blot.....	56
Conclusion	61
Références bibliographiques.....	63
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique du mécanisme de l'allergie, hypersensibilité de type I (immédiate).....	04
Figure 2 : β -lactoglobuline : structure 3-D	10
Figure 3 : Localisation des épitopes Conformationnelles	11
Figure 4 : Principaux épitopes linéaires de la β Lg	11
Figure 5 : α lactalbumine : structure 3-D	11
Figure 6 : Position des peptides les plus fréquemment reconnus par les IgE humaines, LAC1 (rouge), LAC2 (bleu) et LAC8 (vert), dans la structure en ruban : présentation (Fig. A & C) et dans la présentation moléculaire (Fig. B & D)	12
Figure 7 : Le figuier (<i>ficus carica L</i>)	17
Figure 8 : Le cardon sauvage (<i>C.Cardanculus L</i>)	20
Figure 9 : collection de latex	27
Figure 10 : Diagramme d'obtention de l'extrait brut de la ficine.....	28
Figure 11 : Séparation de la matière gommeuse du latex.....	28
Figure 12 : La matière gommeuse séparée après centrifugation	28
Figure 13 : Capitules de fleurs de cardon (A : avant florescence, B, C : après florescence) .	29
Figure 14 : les fleurs fraîches du cardon avant lyophilisation.....	30
Figure 15 : une fleur de cardon après lyophilisation	30
Figure 16 : Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon	31
Figure 17 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA	33
Figure 18 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la tyrosine	35
Figure 19 : Formation du composé isoindole	38
Figure 20 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la Leucine	39
Figure 21 : Les principales étapes du test immunologique par le western blot.....	42
Figure 22 : Quantité des produits d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatiques étudiés	48
Figure 23 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des extraits enzymatiques	41
Figure 24 : Estimation du degré d'hydrolyse des caséines par l'extrait de la ficine (E/S : 1/100, 1/1000).....	52
Figure 25 : Profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par la ficine : Profil A : E/S : 1/100	53

Figure 26 : Profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par la ficine, E/S : 1/1000.	54
Figure 27 : Estimation du degré d'hydrolyse des caséines par l'extrait de cardon E/S : (1/100) et (1/50)	55
Figure 28 : profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par l'extrait de cardon : E/S=100	56
Figure 29 : profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par l'extrait de cardon : E/S=1/50	55
Figure 30 : Profils SDS-PAGE (A) et western blot (B) des caséines traités par l'extrait de fleurs de cardon (E/S : 1/50).....	57
Figure 31 : Profils SDS-PAGE (A) et western blot (B) des caséines traités par l'extrait de la ficine (E/S : 1/1000)	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des protéines du lait de vache	09
Tableau 2 : Spécificité des protéases.....	15
Tableau 3 : Spécificité d'action de cardosine A et B isolés de <i>Cynara cardunculus</i> sur α_{s1} , β et κ -caséines bovine, caprie et ovine	24
Tableau 4 : Gamme d'étalonnage de la solution BSA	33
Tableau 5 : Gamme d'étalonnage de la solution de leucine.....	38
Tableau 6 : Caractéristiques des 11 patients ayant une allergie avérée.....	40
Tableau 7 : Caractéristiques physicochimiques de l'extrait brut de la ficine.....	44
Tableau 8 : Caractéristiques physicochimiques de l'extrait des fleurs de cardon.....	45
Tableau 9 : Activités enzymatiques des enzymes extraites	46
Tableau 10 : Epitopes des fractions caséiniques	59

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

APLV : Allergie aux protéines du lait de vache.

APs : Aspartic protéinase.

BSA : Bovin Sérum Albumine.

CAS : Caséine.

DH : Degré d'hydrolyse.

IgE : Immunoglobuline E.

OPA : O-phthaldialdehyde.

PBS : Phosphate Buffer Saline.

PVB : Polyvenylpyrrolidone.

PLV : protéines du lait de vache.

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate.

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

TCA : Acide Trichloacétique.

U.P : Unité présure.

α -Lac : Alpha- Lactalbumine.

β Lg : Beta- Lactoglobuline.

Introduction

Le lait de vache est le premier aliment ingéré par le nourrisson, de sorte que l'allergie aux protéines du lait de vache est la première à apparaître, avec un début précoce, souvent avant l'âge de 6 mois. La prévalence de l'APLV dans la population générale varie de 0,1 à 7,5%, la plaçant en quatrième position des allergies alimentaires en pédiatrie (RANCE et DUTAU, 2009).

En Algérie, une étude a été réalisée dans la région de Constantine sur 822 nourrissons et a fait apparaître une prévalence de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV) de 4,9%, avec apparition à un âge précoce entre 0 et 3 mois. Le problème est vécu par les parents surtout par l'absence d'organisme et surtout de diététiciens pour les informer et les conseiller des régimes à suivre. Les prix élevés des produits de substitution et l'intolérance à ces produits restent également des problèmes posés (BOUGHELLOUT et ZIDOUNE, 2010).

Le traitement de cette affection constitue une préoccupation importante pour les scientifiques. Actuellement, ce traitement repose principalement sur un régime d'éviction des protéines du lait de vache et sur l'administration de préparations adaptées sous forme d'hydrolysats de protéines lactées ou autres protéines (riz, collagène, etc.).

Les hydrolysats de protéines sont obtenus après traitement des protéines par combinaison de plusieurs techniques, variables selon l'hydrolysat (chaleur, ultrafiltration, clivage enzymatique). L'hydrolyse des protéines permet la dégradation des épitopes séquentiels et conformationnels.

Dans ce contexte, une étude a été réalisée par EL MECHERFI, (2011) sur les deux principales protéines du lactosérum bovin impliquées dans l'APLV, la β lactoglobuline (β Lg) et l' α lactalbumine (α -Lac) avec pour objectif principal la réduction de leur potentiel allergisant par l'utilisation de traitements enzymatiques associés à l'action du rayonnement micro-ondes (Université d'Oran). Une deuxième étude a été menée par BOUGHELLOUT *et al.*, (2013) membre de l'équipe de recherche T.E.P.A. (Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires) de l'I.N.A.T.A.A)) cette étude a été porté sur l'impact du traitement par une nouvelle technologie «Détente Instantanée Contrôlée » et celui d'une hydrolyse enzymatique par des protéases digestives (Chymotrypsine, trypsine et pepsine) sur les caséines et les protéines sériques dans le but de réduire leur immunoréactivité.

Ce modeste travail vise à réduire le potentiel allergisant des caséines bovines en utilisant des extraits d'origine végétale obtenus à partir des plantes disponibles dans notre pays mais, malheureusement, non exploitée. L'extrait des fleurs de cardon et celui du latex de figuier, ces deux extraits ont été utilisés pour leurs activités protéolytiques qui peuvent modifier les caséines et dégrader les épitopes responsables de l'allergie alimentaire et par

conséquent, éliminer l'allergénicité de ces dernières et pour cela nous avons procédé comme suit :

- Assurer le stock en matières premières végétales (récolte et conservation des fleurs de cardon, collection du latex) ;
- Extraction des systèmes enzymatiques contenus dans chacune des deux matières premières végétales dont nous disposons ;
- Caractérisations des extraits obtenus ;
- Hydrolyse des caséines par les extraits enzymatiques avec estimation de la quantité des protéines hydrolysées.
- Suivie de la cinétique d'hydrolyse.
- Estimation de l'allergénicité des hydrolysats obtenus après traitement enzymatique par la technique du western blot.

Rappels

bibliographiques

I. Allergie alimentaire

I.1. Généralités

I.1.1. Définition

L'allergie alimentaire correspond à l'ensemble des manifestations cliniques liées à une réponse immunologique vis-à-vis d'un allergène alimentaire. Elle est définie comme étant une réponse immunitaire spécifique néfaste survenant de manière reproductible lors de l'exposition à l'aliment incriminé. Elle est le plus souvent IgE-dépendante mais d'autres mécanismes immunologiques sont possibles (KANNY, 2001 ; JARLOT *et al.*, 2013).

On distingue deux types de réactions adverses à l'ingestion d'un aliment selon que le système immunitaire est impliqué ou non : d'une part l'allergie alimentaire ou hypersensibilité à un aliment mettant en jeu des mécanismes immunologiques et, d'autre part, l'intolérance alimentaire incluant divers mécanismes, où le système immunitaire ne joue aucun rôle (JAFFUEL *et al.*, 2001 ; MAIRESSE, 2002).

L'allergie alimentaire ne se limite pas seulement aux conséquences de l'ingestion d'allergène d'origine alimentaire (tropallergènes). Certes c'est la forme la plus documentée et mieux démontrée mais il existe des cas où les allergènes peuvent pénétrer par voie respiratoire lors de la cuisson ou par simple contact cutané (NEMNI *et al.*, 2006 ; LATRECHE, 2009).

En 1963, deux immunologistes britanniques, Gell et Coombs, ont proposé une classification distinguant quatre types de réactions allergiques :

- type I : réaction immédiate, réaginique, liée aux IgE, représente le mécanisme quasi exclusif de l'allergie alimentaire ;
- type II : réaction cytotoxique ;
- type III : réaction semi-retardée (intervention de complexes immuns circulants) ;
- type IV : réaction retardée (immunité à médiation cellulaire).

I.1.2. Mécanisme de l'allergie alimentaire

L'allergie alimentaire la plus fréquente est liée aux IgE et aux mastocytes/basophiles (type I de la classification de Gell et Coombs) (JAFFUEL *et al.*, 2001). Les mécanismes immunologiques impliqués dans la réaction allergique de type I se résument généralement en deux phases (Figure1) :

a. La phase de sensibilisation et de production d'IgE

La phase de sensibilisation constitue la première étape de l'allergie. C'est une phase silencieuse qui se traduit par une production d'IgE spécifiques par les lymphocytes B, à la suite d'un premier contact avec l'antigène, qui est alors défini comme allergène (MONDOULET, 2005 ; RANCE et DESCHILDRE, 2006 ; LIFRANI, 2006).

a. La réaction allergique proprement dite

C'est au cours de ce deuxième contact avec l'allergène que le sujet déclenche une manifestation clinique de nature allergique plus ou moins grave en fonction de chaque individu suite à l'action des différents médiateurs libres (ROITT et RABSON, 2002 ; LATRECHE, 2009).

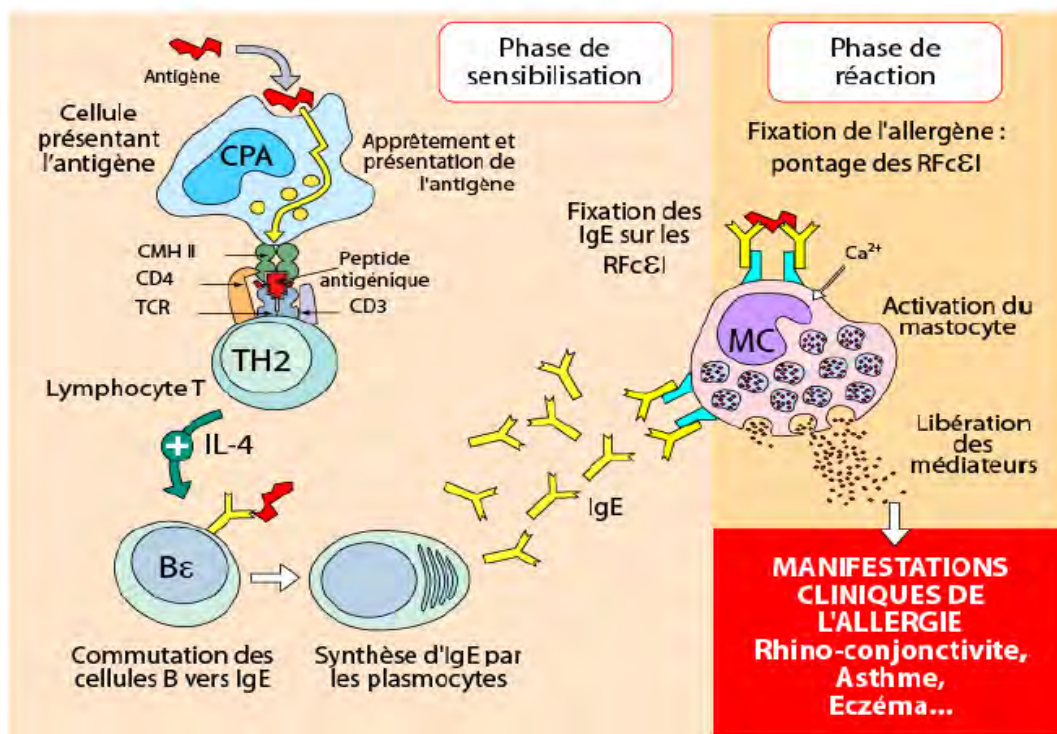


Figure 1 : représentation schématique du mécanisme de l'allergie, hypersensibilité de type I (immédiate).

I.1.3. Tableau clinique de l'allergie alimentaire

Les manifestations cliniques de l'allergie alimentaire sont variées. Elles peuvent être généralisées (choc anaphylactique) ou avoir pour cible des organes comme la peau (urticaire, angioedème, dermatite atopique), les muqueuses (oedème, conjonctivite), l'arbre

respiratoire (asthme, rhinite), le tube digestif (régurgitations, vomissements, constipation, diarrhée, malabsorption, oesophagite à éosinophiles), le système neurologique (asthénie, léthargie, hypotonie) ou plusieurs organes simultanément. La dermatite atopique est le symptôme le plus précoce d'allergie alimentaire, représentant 80 % des tableaux cliniques chez le nourrisson. Les tableaux cliniques changent avec l'âge. L'asthme est plus fréquent chez les adolescents et les jeunes adultes. Le choc anaphylactique représente 30 % des symptômes après l'âge de 30 ans, alors qu'il est rare dans la première enfance (JARLOT *et al* ; 2013).

I.1.4. Facteurs favorisants ou aggravants

L'allergie alimentaire dépend d'une part de l'allergénicité des protéines alimentaires et de leur passage dans la circulation. L'immaturation de la muqueuse digestive et du système immunitaire intestinal participe à la pathogénie chez le nourrisson. L'augmentation de la perméabilité intestinale peut favoriser le passage des allergènes. Elle est accrue par la prise d'alcool, d'aspirine ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, les infections virales, parasitaires et les levures intestinales (BEAUDOUIN *et al.*, 2006 ; JARLOT *et al.*, 2013).

La quantité ingérée d'aliments, nécessaire au déclenchement de la réaction, est importante à connaître. Une réaction à des quantités minimales peut exposer à une réaction plus grave à l'ingestion d'une plus grande quantité d'aliment. Elle expose également à des réactions à l'ingestion d'allergènes masqués ou non identifiés. Le contenu du repas en graisses peut aussi modifier la nature de la réaction. La voie de déclenchement de l'allergie pourrait représenter un facteur de gravité. Le contact ou l'inhalation d'une protéine alimentaire ne sont en fait plus considérés comme des facteurs aggravants. En revanche, les réactions qui surviennent en association à un effort physique ou à la prise de médicaments sont sérieuses le plus souvent à type d'anaphylaxie (RANCE *et al*; 2008).

I.2. L'allergie aux protéines du lait de vache (APLV)

I.2.1. Définition

L'allergie aux protéines du lait de vache représente la quatrième allergie alimentaire chez l'enfant, derrière les allergies à l'œuf, à l'arachide et au poisson (RANCE *et al.*, 1999 ; RANCE et DUTAU, 2009).

L'APLV est la première allergie à apparaître chez l'enfant recevant une alimentation à base de PLV. Il s'agit d'une réaction reproductible liée à une ou plusieurs PLV et faisant

appel à un mécanisme immunologique impliquant ou non les IgE (DUMOND *et al* ; 2006) parfois des anticorps et des cellules à la fois (FIOCCHI *et al* ; 2010 ; DENIS *et al* ; 2011).

Sa prévalence diminue avec l'âge et elle est souvent associée à d'autres allergies alimentaires (HOST, 2002). Le diagnostic d'allergie aux PLV doit être confirmé par une épreuve d'exclusion- réintroduction. Sa confirmation impose l'exclusion complète des protéines lactées bovines (VIOLA, 2012).

I.2.2. Épidémiologie et fréquence de l'APLV

L'APLV est responsable de 12,6 % des allergies alimentaires de l'enfant (RANCE *et al* ; 1999 ; RANCE et DUTAU, 2009). L'incidence de l'allergie aux protéines du lait de vache varie de 0,1 à 7,5 %, selon les études (HOST, 1994 ; HOST *et al.*, 2002).

Sa fréquence chez l'enfant est de 2,5% et diminue à 0,3% chez l'adulte (SAMPSON, 2004). Les réactions allergiques apparaissent très tôt dans la petite enfance et disparaissent généralement vers l'âge de trois à cinq ans (MONERET-VAUTRIN *et al.*, 1996). Cependant, cette allergie pourrait être définitive dans 20% des cas (KAJOSAARI, 1982).

I.2.3. Mécanisme et symptomatologie

Actuellement, toutes les réactions adverses au lait de vache sont appelées « allergie au lait de vache » suivie de la dénomination IgE-dépendante ou non IgE-dépendante en fonction du mécanisme immunologique impliqué. Les formes non immunologiques sont prédominantes (RANCE, 2004 ; RANCE et DUTAU, 2009).

Dans la physiopathologie des APLV, on incrimine trois mécanismes différents selon la classification de Gell et Coombs :

- type I réaction immédiate, réaginique ou médiée par les IgE,
- type III réaction semi-retardée (intervention de complexes immuns circulants ou CIC),
- et type IV réaction retardée (immunité et médiation cellulaire ex-hypersensibilité retardée).

Cette présentation est toutefois schématique ; il est possible d'observer une intrication des mécanismes impliqués : une forme réaginique peut avoir un mode de révélation retardé de plusieurs jours ; certains patients peuvent avoir simultanément ou successivement des signes biologiques d'un type III (CIC contenant des anticorps spécifiques) et d'un type IV (patch test positif) ou d'un type I (IgE spécifiques) et d'un type III.

Selon le délai écoulé entre l'ingestion du lait de vache (lors du diagnostic ou lors des tests de réintroduction) et l'apparition des symptômes cliniques, on distingue

schématiquement trois catégories de manifestations pouvant toucher la peau, le tube digestif et l'appareil respiratoire : réactions cliniques immédiates, intermédiaires ou retardées (HILL, 1986 ; MORALI, 2004).

I.2.4. Allergènes du lait de vache et épitopes

I.2.4.1. Définition d'un allergène alimentaire

Les allergènes alimentaires ou trophallergènes sont en général des glycoprotéines de masse moléculaire de 10 à 70 (kDa), 10 kDa étant la limite inférieure pour être immunogène (c'est à- dire induire une réponse immunitaire) et 70 la limite supérieure pour être absorbée au niveau digestif (MORISSET *et al.*, 2012 ; JARLOT *et al.*, 2013).

Le lait, l'œuf, l'arachide, le soja et la farine de blé représentent 90% des allergènes alimentaires chez l'enfant, tandis que l'arachide et les autres fruits à coque, le poisson et les fruits de mer représentent 85% des allergènes alimentaires impliqués chez les adolescents et adultes (SAMPSON, 1992 ; MADSEN, 1997; SCHÄFER, 2001; TAYLOR, 2001; ZUBERBIER, 2004).

Un aliment contient plusieurs protéines allergéniques. Parmi ces protéines, celles qui sont reconnues par plus de 50 % des sujets sensibilisés sont appelées allergènes majeurs. Dans de rares cas, l'allergène peut être un sucre, comme l'alpha-Gal impliqué dans les allergies aux viandes (MORISSET *et al.*, 2012 ; JARLOT *et al.*, 2013).

I.2.4.2. Allergènes du lait bovin

L'allergénicité concerne des portions limitées de la protéine, appelées déterminants antigéniques ou épitopes. Elle dépend également du nombre et des propriétés de ces derniers. Les épitopes sont les portions de la molécule protéique (antigénique) qui se lient à l'anticorps spécifique et qui sont donc responsables de l'immunoréactivité (MONDOULET, 2005).

Il est important de distinguer deux types d'épitopes, à savoir les épitopes linéaires et les épitopes conformationnels. Les premiers, aussi appelés épitopes continus, se composent d'une courte série de chaînes d'acides aminés ou peptides. Les épitopes conformationnels ou discontinus dépendent de la structure tridimensionnelle des protéines. Il est clair que les épitopes conformationnels sont nettement moins stables et peuvent donc disparaître par dénaturation thermique, comme cela se perd dans le cas de la BLG bovine. La structure des épitopes linéaires, comme ceux présents dans l'allergène majeur des arachides Ara h 1, n'est pas détruite par la dénaturation de la protéine. Ils gardent donc leur caractère allergène (EIWEGGER, 2006 ; MEULENAER, 2006).

Les protéines du lait de vache sont d'une manière générale assez hétérogènes et ont peu de caractéristiques structurales et fonctionnelles communes (WAL, 2001). Plusieurs travaux ont porté sur l'immunoréactivité de ces multiples composants. Les études réalisées sur de larges populations de patients allergiques montrent que la plupart des patients sont sensibilisés à de nombreuses protéines du lait. Les allergènes les plus représentés au sein du lait et reconnus par les IgE de patients sont la fraction caséine (reconnue par 66%), la BLG (reconnue par 58% des patients) et l' α -lactalbumine (reconnue par 38%) mais des protéines du lait plus minoritaires comme la sérum albumine bovine ou la lactoferrine sont reconnues respectivement par 50% et 45% des patients (WAL et *al.*, 1995). Les intensités de réponse des IgE spécifiques des différentes caséines varient fortement en fonction des sérums et des caséines mais semblent être reliées aux proportions relatives de ces protéines dans le lait (BERNARD et *al.*, 1998).

Les allergènes ont la dénomination Bos d pour *Bos domesticus*. Les caséines et la β -lactoglobuline sont le plus souvent en cause, mais toutes les protéines peuvent être incriminées (RANCE et DUTAU, 2009). La composition en protéines du lait (WAL, 1998, 2002 ; FARRELL, 2004 ; WAL, 2011) et leur dénomination selon la nomenclature officielle internationale des allergènes sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Principales caractéristiques des protéines du lait de vache.

Fraction	Protéine	Allergène	g/L	% Protéines totales	MM (kDa)	Nombre d'acides aminés	pHi
Caséines			30	80			
	Caséine-Alpha α_{11}	<i>Bos d 8</i>	12-15	29	23,6	199	4,9-5
	Caséine-Alpha α_{22}		3-4	8	25,2	207	5,2-5,4
	beta-caséine		9-11	27	24	209	5,1-5,4
	kappa-caséine		3-4	10	19	169	5,4-5,6
Lactosérum			5	20			
	Alpha lactalbumine	<i>Bos d 4</i>	1-1,5	5	14,2	123	4,8
	Beta-lactoglobuline	<i>Bos d 5</i>	3-4	10	18,3	162	5,3
	Immunoglobulines	<i>Bos d 7</i>	0,6-1	3			
	Sérum Albumine Bovine	<i>Bos d 6</i>	0,1-0,4	1	67	583	4,9-5,1
	Lactoferrine		0,09	Traces	800	703	8,7
Protéines totales			36	100			

a. Caséines

Les caséines entières sont des phosphoprotéines de structure lâche, flexible non stabilisée par des liaisons intramoléculaires, constituées de quatre fractions différentes $\alpha_1, \alpha_2, \beta$ et κ caséine et certains composés mineurs tels que la caséine γ . Ces fractions montrent peu d'homologie dans leurs séquences en acides aminés, se lient entre elles pour former des agrégats (micelles) en suspension dans le lactosérum (DALGLEISH et CORREDIG, 2012).

Elles sont considérées comme des allergènes en cause dans la majorité des APLV persistantes, des travaux ont montré un taux significativement plus élevé d'IgE spécifiques des épitopes linéaires de l' α -caséine et de la β -caséine chez les patients présentant une forme persistante d'APLV (CERECEDO *et al.*, 2008). L'étude de JÄRVINEN *et al.*, (2002) a montré qu'il existe cinq épitopes (2 sur la caséine α_1 , 1 sur la caséine α_2 et 2 sur la κ -caséine) qui ne sont pas reconnus par la majorité des patients ayant une APLV persistante.

Des études ont démontré également que la caséine α_1 présente à la fois des épitopes séquentiels et conformationnels (SCHULMEISTER *et al.*, 2009). Les caséines sont en effet très sensibles à l'action de toutes les protéases et carboxypeptidases mais par contre ne sont pas significativement affectées par les traitements thermiques (Bernard *et al.*, 1998).

b. β -lactoglobuline (β Lg)

La β -lactoglobuline est la plus importante des protéines du sérum puisqu'elle en représente environ 55%. Son point isoélectrique est 5,1 et elle a un poids moléculaire de 18,3

kDa (DEBRY, 2001). Elle est la seule protéine du lait de vache à n'avoir pas d'équivalent dans le lait humain. La structure tertiaire de la β Lg est connue (Figure2) (WAL, 2011).



Figure 2 : β -lactoglobuline : structure 3-D.

La β Lg appartient à la famille des lipocalines, petites molécules sécrétées pouvant s'associer à des ligands hydrophobes (MONDOULET, 2005). Les lipocalines ont un fort pouvoir allergénique et de nombreux allergènes d'origine animale font partie de cette famille. Ils ont en commun une séquence homologue bien conservée dans la première moitié N-terminale de la molécule, avec un résidu de tryptophane toujours présent en position 19 (WAL, 2011).

La β Lg est stable à des pH acides et résiste aux enzymes protéolytiques, laissant sa structure inchangée pendant la digestion et, éventuellement permet le passage intacte à travers la barrière intestinale (HEYMAN, 2010). Dans ce sens, il semble que la majeure partie des épitopes liant les IgE humaines, sur la structure tri-dimensionnelle de la β Lg, est située à la surface de la molécule, suggérant que les importants sites de liaisons des IgE sur la β Lg sont principalement conformationnels (Figure 4) (WAL, 1998).

Une autre approche, basée sur l'utilisation de peptides synthétiques, a permis de valider la présence de séquences linéaires allergéniques sur la β Lg (Figure 3) (HEINZMANN *et al.*, 1999). Dans la structure tridimensionnelle de la β Lg, trois épitopes majoritaires décrits par SELO *et al.*, (1999) sont disposés à la surface de la molécule, ce qui explique qu'à l'état natif, la β Lg soit très allergénique, et perd de son immunoréactivité dès la déstabilisation de cette conformation.



Figure 3 : Principaux épitopes linéaires de la β Lg (JÄRVINEN *et al.*, 2001).

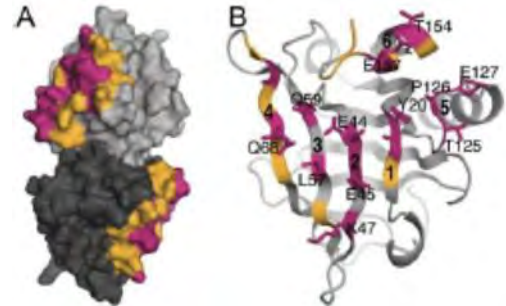


Figure 4 : Localisation des épitopes Conformationnelles (NIEMI *et al.*, 2008)

b. α -lactalbumine (α -Lac)

L' α -lactalbumine est une protéine globulaire monomérique de masse moléculaire de 14,4 kDa comportant quatre ponts disulfures (Figure6). Elle représente environ 22% des protéines du sérum. Son point isoélectrique est de 4,8 (CAYOT et LORIENT, 1998).

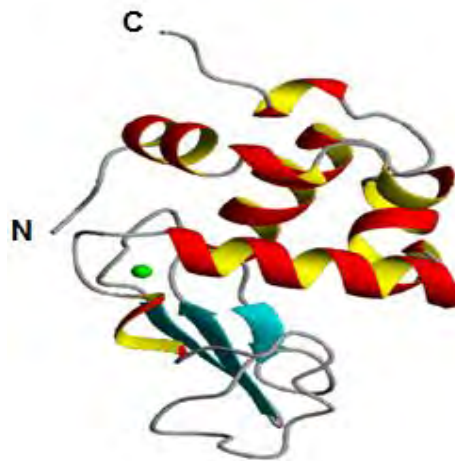


Figure 5 : α lactalbumine : structure 3-D.

Plusieurs études ont exploré la présence d'épitopes majeurs reconnus par les IgE humaines de patients allergiques. Les études menées par JÄRVINEN *et al.*, (2001) et HOCHWALLNER *et al.*, (2010) ont pu démontrer la présence de quatres épitopes majeurs de l' α -lactalbumine liant les IgE Glu1-Cys16, Lys13-Trp26, Ser47-Lys58 et Lys93-Asp102. (Figure 6).

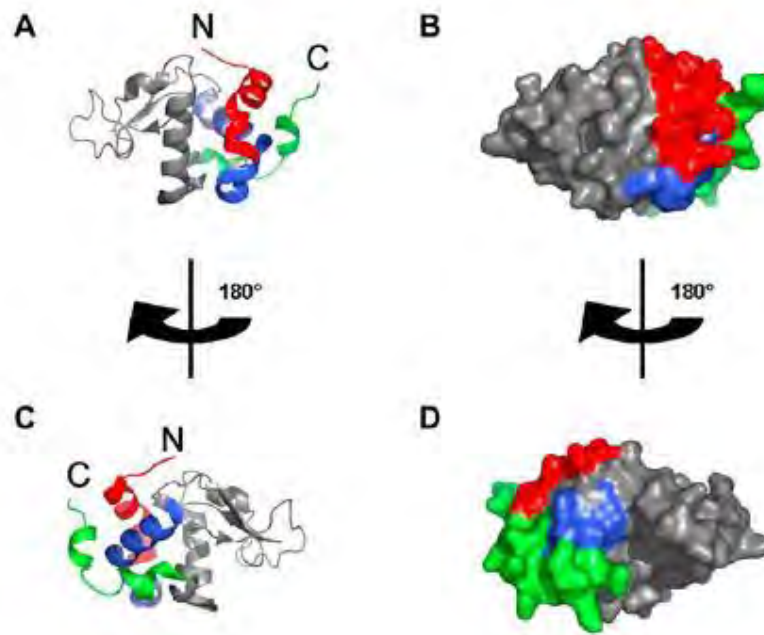


Figure 6 : Position des peptides les plus fréquemment reconnus par les IgE humaines, LAC1 (rouge), LAC2 (bleu) et LAC8 (vert), dans la structure en ruban : présentation (**Fig. 7 A & C**) et dans la présentation moléculaire (**Fig. 7, B & D**). D'après Hochwallner et al., (2010).

II. Traitements technologiques pour réduire l'allergénicité des protéines du lait

Au cours d'une préparation alimentaire industrielle, où se succèdent plusieurs opérations unitaires, une protéine dans un aliment est donc soumise à des contraintes répétées pouvant altérer sa structure. Ces changements de structure n'affectent a priori que les protéines dites globulaires, c'est-à-dire ayant une structure secondaire et tertiaire, voire quaternaire. C'est le cas de la plupart des protéines alimentaires animales (protéines de lactosérum, de blanc d'œuf, de viande et de poisson) et végétales (par exemple, protéines d'arachide, de soja, de pommes de terre, de blé, de colza). Mais ce n'est pas le cas de la caséine, qui n'a quasiment pas de structure secondaire (MORISSET, 2008).

Les allergènes alimentaires et leurs épitopes peuvent être assez résistants aux effets de la transformation industrielle des aliments et de la digestion (TAYLOR et HEFLE, 2001). Il a été suggéré cependant, que cette résistance aux procédés industriels, culinaires puis à la digestion gastro-intestinale est une caractéristique commune des allergènes alimentaires. Par ailleurs l'un des objectifs des traitements technologiques industriels est l'élimination de l'allergénicité des protéines alimentaires afin qu'elles ne soient plus reconnues par les IgE. (EL MECHERFI, 2011).

II.1. Traitements thermiques

Sous l'influence de la chaleur, on observe une modification de plus en plus importante de la structure tridimensionnelle des protéines. Celle est réversible au départ puis à partir de 55-70°C, on assiste à une dénaturation de la structure secondaire avec clivage des ponts disulfures à 70-80°C, formation de nouveaux réarrangements inter ou intramoléculaire à 80- 90°C puis apparition d'agrégats à partir de 90-100°C (DAVIS et WILLIAMS, 1998). Au-delà de ces températures (>100-125°C), on assiste à des transformations chimiques avec formations de liaisons entre les lysines de la protéine étudiée et les autres constituants d'une matrice alimentaire complexe.

Les protéines du lait (caséines et alpha-lactalbumine surtout), gardent leur pouvoir de liaison aux IgE spécifiques après chauffage à 80-100° pendant 15 minutes (WAL, 2001). Un lait écrémé bouilli pendant 10 min a montré une forte réduction du potentiel allergénique des caséines et des protéines sériques (diminution de la capacité à lier des IgE), l'effet étant le plus marqué pour la sérum albumine bovine (SAB), la β -lactoglobuline et les immunoglobulines (MORISSET, 2008). De manière générale, la caséine bovine est globalement thermostable alors que la β Lg est thermolabile mais elle peut être protégée du fait des interactions avec les caséines (WAL, 2011)

La température de transition entre l'état natif et dénaturé des protéines de lactosérum varie entre 60°C et 80°C. A ces températures, la β -Lg est dénaturée de façon irréversible, tandis que l' α -lactalbumine se dénature en présence du calcium après refroidissement. La température change la structure tridimensionnelle de la β -Lg à 65°C et la conformation en dimère se dissocie en monomère (BRAHIM, 2010).

II.2. Fermentation bactérienne

Au cours de la digestion, les bactéries lactiques auraient la propriété de favoriser la destruction des protéines alimentaires et en particulier l'hydrolyse des épitopes, réduisant ainsi l'allergénicité des produits résultant. Les polysaccharides bactériens, ou hydrocolloïdes communément utilisés comme texturants dans les industries agro-alimentaires affectent aussi la digestibilité des protéines. En étudiant ces hypothèses, les chercheurs ont montré que des cellules de la bactérie lactique *Lactobacillus acidophilus*, sont capables d'hydrolyser une protéine du lait, la β -lactoglobuline, à un taux de 52%, alors que la dégradation de cette protéine par la pepsine, une enzyme du suc gastrique, est faible (8%). Ce taux atteint 55% quand l'hydrolyse pepsique est précédée d'une pré-hydrolyse par *Lb. acidophilus*, et même

58% en présence de pectine ou d'exopolysaccharides. Les principaux épitopes de la β -lactoglobuline ayant été hydrolysés, l'allergénicité de cette protéine pourrait ainsi être diminuée (ANONYME, 2010).

II.3. Traitements enzymatiques

L'hydrolyse enzymatique est une méthode appropriée pour la préparation de peptides de façon, non seulement à cause de la disponibilité d'enzymes à grande échelle et à des coûts de plus en plus modérés, mais aussi grâce à la grande qualité de ces produits. Un avantage très important est la possibilité de pouvoir diriger l'hydrolyse vers des peptides particuliers souhaités en utilisant des enzymes avec des spécificités déterminées.

Selon les propriétés visées, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut être plus ou moins complète. Une hydrolyse poussée conduit à la génération de peptides solubles de petite taille moléculaire (peptides < 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres ≥ 20 %). Elle permet l'obtention d'hydrolysats utilisables dans les formulations diététiques, dans les milieux de culture pour microorganismes ou possédant potentiellement des peptides bioactifs. Une hydrolyse limitée permet quant à elle d'obtenir des peptides de plus haute taille moléculaire (peptides > 15 acides aminés et proportion en acides aminés libres < 10 %) aux propriétés fonctionnelles intéressantes (CHABANON, 2005).

L'hydrolyse enzymatique ou acide est largement utilisée pour la préparation des formules infantiles à base de protéines de lait de vache ou de soja. Une activité allergénique des protéines résiduelles a été observée dans les formules issues d'une hydrolyse partielle ou extensive. Des résidus allergéniques ont été retrouvés dans les agrégats de caséine après traitement enzymatique. Seules les formules dont l'hydrolyse a été « poussée » et composées d'acides aminés perdent leur réactivité allergénique (ROSENDAL 2000 ; DOCENA 2002).

Plus récemment il a été montré que le traitement protéasique sous haute pression pouvait aussi supprimer totalement l'allergénicité des hydrolysats de protéines du lactosérum, permettant l'utilisation de ces ingrédients dans la formule infantiles hypoallergéniques (PENAS *et al.*, 2006).

III. Enzymes protéolytiques

III.1. Définition

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides

aminés dans une chaîne peptidique (Tableau 2) et sont produites extracellulairement comme intracellulairement (KUMAR *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Spécificité des protéases (RAO *et al.*, 1998).

Enzyme	Liaison peptidique à clivée
Trypsine	-Lys (ou Arg)↓-----
Chymotrypsine, subtilisine.....	-Trp (ou Tyr, Phe, Leu)↓-----
<i>Staphylococcus</i> V8 protéase	-Asp (ou Glu)↓-----
Papaine	-Phe (ou Val, Leu)-Xaa↓-----
Thermolysine.....	---↓Leu (ou Phe) -----
Pepsine.....	-Phe (ou Tyr, Leu)↓ Trp (ou Phe, Tyr)

La flèche indique le site d'action des protéases, Xaa, n'importe quel acide aminé

Dans l'hydrolyse enzymatique, le taux de clivage des liaisons peptidiques dépend principalement de deux facteurs : la spécificité de l'enzyme et l'accessibilité aux liaisons peptidiques (ADLER-NISSEN, 1986).

III.2. Enzymes d'origine animale

Les enzymes d'origine animale (porcine et bovine) sont principalement la trypsine, la chymotrypsine, issues du pancréas et la pepsine, issue de la muqueuse gastrique. Ces trois enzymes sont des endoprotéases présentant des spécificités différentes. En effet, elles ont la propriété de dégrader les protéines alimentaires. Elles sont toutes synthétisées sous forme d'un précurseur qui peut s'activer de façon autocatalytique dans des conditions bien déterminés (RAO *et al.*, 1998 ; BELMESSIKH, 2011).

La trypsine a une affinité pour la lysine et l'arginine, la chymotrypsine pour les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) et la pepsine principalement pour les acides aminés hydrophobes (ADLER-NISSEN, 1982). La pepsine est l'enzyme d'origine animale la plus largement utilisée.

III.3. Enzymes d'origine végétales

La plupart des protéases d'origine végétale ont été classés comme des protéases à cystéine et plus rarement comme des protéases aspartiques (BOLLER, 1986). Les enzymes protéolytiques d'origine végétale ont reçu une attention particulière en raison de leur propriété d'être actif sur une large gamme de température et de pH (UHLIG, 1998). La

recherche de protéases précieuses avec une spécificité distincte est toujours un défi permanent pour les applications industrielles variées (DEVARAJ *et al.*, 2008).

Les plus connues sont la papaïne, la bromélaïne, et la ficine. Ces protéases permettent d'obtenir des hydrolysats de bonne qualité mais leur production dépend de nombreux facteurs externes tels que les conditions de culture, le cycle de croissance, les recommandations climatiques, ce qui peut susciter des problèmes de coût et d'approvisionnement. Ces enzymes ne sont pas spécifiques. La ficine s'avère peu stable dans le temps. La papaïne, plutôt adaptée à des protéines prédigérées, peut conduire au stade acide aminé libre et poser des problèmes d'amertume (DURAND, 1982).

III.3.1. La ficine

III.3.1.1. Généralités sur le figuier

Le figuier dont le nom botanique *Ficus carica L* (figure 7), est un arbre à feuilles caduques de la famille des Moraceae qui comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre ficus (NICOTRA *et al.*, 2010 ; MAWA *et al.*, 2013). Du point de vue systématique, la classification botanique du figuier telle que l'a décrite GOUSSEN *et al.* (1982) est la suivante :

Règne	Végétal
Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Hamamélidées
Apétales	unisexuées
Ordre	Urticales
Famille	Moracées
Genre	Ficus
Espèce	<i>Ficus carica L.</i>



Figure 7 : Le figuier (*ficus carica L.*).

Ficus constitue l'un des plus grands genres de plantes médicinales avec environ 750 espèces de plantes ligneuses, des arbres et des arbustes. Elles sont surtout présentes dans les régions subtropicales et tropicales à travers le monde (RAJ et BABY, 2011). La variabilité morphologique des Ficus est impressionnante. Toutes ces espèces produisent des faux fruits appelés figue. Ces plantes produisent toutes du latex, et certaines sont utilisées pour la production de caoutchouc (JANDER et MACHADO, 2008).

III.3.1.2. Classification des différentes formes de figuier

La classification du figuier a été étudiée par plusieurs auteurs. Certains comme LAUMONNIER (1960) proposent deux catégories :

a. Formes horticoles

a.1. Figueurs bifères

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

a. 2. Figueurs unifères (d'automne)

Ils ne fructifient qu'une seule fois à la fin du mois d'Août-début septembre. Les figues se forment à partir de bourgeons de forme conique visibles sur les rameaux en hiver.

Cependant, elles ne murissent que si elles sont visitées par le blastophage (insecte polinisateur) (MAURI, 1952).

b. Les caprifigiers ou dokkares

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

III.3.1.3. Latex

Le latex est un liquide visqueux de couleur blanche, il est largement distribué dans la plante (KIM *et al.*, 2003). Par incision du tronc on recueille un latex qui coagule rapidement ; filtré puis desséché, il constitue la ficine brute. La ficine est un mélange de protéases qui possède une activité protéolytique voisine de celle de la papaïne (BRUNETON, 2009).

Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase et peroxydase (BABY et RAJ, 2011). Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (LANSKY, 2008 ; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

III.3.1.4. Caractéristiques de la ficine (ficain) (EC 3.4.22.3)

Ficus carica L., le figuier commun, est une source de protéases qui sont utilisés pour coaguler le lait. Son latex contient un agent protéolytique connu comme la ficine. Plusieurs études ont été menées sur la purification et la caractérisation biochimique de la ficine isolée à partir du latex de *F. carica* (AZARKAN *et al.*, 2011 ; DI PIERRO *et al.*, 2014). Très peu de références sont disponibles sur les aspects structurels de la ficine jusqu'à ce jour par rapport à la papaïne, ainsi que d'autres protéases à cystéine connexes (DEVARAJ *et al.*, 2011).

Selon DEVARAJ (2011), la ficine de *F. carica* est une chaîne polypeptidique unique ayant une masse moléculaire de 23,1 kDa. Elle appartient à la famille des protéases à cystéine (AZARKAN *et al.*, 2011 ; ZARE *et al.*, 2013 ; SHAH *et al.*, 2014). Elle est composée de 210 résidus d'acides aminés. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (KATSAROS *et al.*, 2008 ; FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011). L'enzyme est active à pH neutre et son inactivation complète se produit en dessous de pH 3,0 (DEVARAJ *et al.*, 2011), ainsi que la dénaturation induite par le pH de la ficine, conduit à un état partiellement plié à un pH acide. La structure dépliée partielle de la ficine

à faible pH a montré les caractéristiques de globule fondu comme état intermédiaire comme étudié par différentes techniques biophysiques (DEVARAJ *et al.*, 2009 ; DEVARAJ *et al.*, 2011).

Selon GRZONKA *et al.*, (2007) La plage optimale de pH est de 5 à 8, tandis que la température optimale est de 45 à 55°C, la Ficine nécessite une cystéine ou d'autres agents réducteurs pour l'activation. La Ficine comme la papaïne est inhibée par la cystatine de poulet (GRZONKA *et al.*, 2007). Il a également la température la plus basse de l'inactivation des trois protéases végétales primaires (~ 70 °C), en fonction des conditions.

III.3.1.5. Hydrolyse par la ficine

Les enzymes actives clivent préférentiellement des protéines au niveau des résidus tyrosine et phénylalanine. Et selon (GRZONKA *et al.*, 2007) L'enzyme a une large spécificité de l'acceptation de résidus d'acides aminés hydrophobes (Phe, Leu, Val) dans la poche S2. En raison de ce clivage préférentiel, la ficine tend à produire des hydrolysats avec une faible amertume, ainsi que l'attendrissement plus contrôlée que la bromélaïne ou la papaïne. Un inconvénient majeur de la ficine est son approvisionnement irrégulier, ce qui conduit à des fluctuations de prix (PAYNE, 2009).

Selon Kumari *et al.*, (2012), les Protéinase de *F. carica* ont montré une large spécificité vers les acides aminés neutres et basiques, c'est-à-dire, Gln, Val, Leu, Ala, Arg, His, Ser et Asn. DI PIERRO *et al.*, (2014) ont montré que la ficine est une protéinase à cystéine avec une large spécificité qui hydrolyse les liaisons impliquant des acides aminés non chargés, aromatiques et /ou hydrophobes.

III.3.2. Les cardosines

III.3.2.1. Généralité sur le cardon

Le cardon (*cardo* ou *wild thistle* en Anglais et *Khourchef* ou *Kernoun berri* en Arabe) est une plante connue sous une multitude de noms. Les noms communs du cardon sont : artichaut sauvage, chardon de castille ou encore cardon de Tours qui en fait, n'est autre chose que la variété de cardon la plus connue. Le nom spécifique du cardon est *Cynara cardunculus* L. On peut aussi rencontrer le nom scientifique beaucoup moins fréquent de *Cynara silvestris*, (BONNIER, 1927 ; CHRISTEN *et* VIRASORO, 1935 ; GRISVARD *et* CHAUDUN, 1964 ; CAMPOS *et al.*, 1990).

Le cardon sauvage (*Cynara cardunculus* L. var *sylvestris*) est une plante vivace robuste, non domestiqué, caractérisé par sa rosette de grandes feuilles, ses tiges épineuses

ramifié et une floraison bleu-violet ; il appartient à la famille des Asteraceae, tribu de Cynarae (Figure 8).

Selon QUEZEL *et* SANTA (1963), on peut classier le cardon comme suit :

Groupe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-groupe	<i>Claciflores</i>
Série	<i>Claciflores Gamopétales</i>
Famille	<i>Composées ou Astéracées</i>
Sous famille	<i>Carduacées ou Cynarocéphales</i>
Tribu	<i>Carduinées</i>
Genre	<i>Cynara</i>
Espèce	<i>Cynara cardunculus</i>

Les formes sauvages de *C.cardunculus* poussent principalement dans des milieux méditerranéens chauds, basse altitude (jusqu'à 700 m d'altitude) et préfèrent les sols argileux lourds. Ils se développent dans des milieux ouverts et également colonisent des habitats artificiels tels que les champs abandonnés, les bords de champs cultivés et des routes (KELLY, 2000 ; ROTTENBERG, 2014)



Figure 8 : Le cardon sauvage (*C.Cardanculus L*).

III.3.2.2. Localisation du système enzymatique dans la plante

Très nombreux travaux ont été effectués sur la protéase du cardon. Les premiers sont ceux de CHRISTEN et VIRASORO en 1935. Déjà à cette époque ces deux auteurs

affirmaient que l'enzyme se trouve exclusivement dans les fleurs. Bien que les fleurs de cardon ont été la partie du végétal utilisée pour la fabrication fromagère depuis une époque très lointaine (HEIMGARTNER *et al.*, 1990), il a été prouvé que les cardosines sont des enzymes organo-spécifiques, ce qui veut dire qu'elles sont spécifiques aux fleurs. Plus que cela, ces cardosines se trouvent à concentration élevée dans la partie violette des corolles, et plus les fleurs sont matures, plus la partie violette de leur corolle est grande donc leur concentration en enzyme est élevée (TSOULI, 1974). Ceci dit, la concentration maximale est celle se trouvant au niveau des stylés et de manière exacte, dans les cellules épidermiques des stylés. Cependant, aucune protéase n'a pu être détectée dans les feuilles aussi bien que dans les graines (CORDEIRO *et al.*, 1994 ; ROSEIRO *et al.*, 2003).

Les cyprosines s'accumulent seulement dans les fleurs et en particulier dans les fleurs matures. CORDEIRO *et al.*, (1994) ont détecté la présence de cyprosines, en faibles quantités, dans les fleurs très jeunes. Ces auteurs ont démontré que la quantité d'enzyme augmente vers les stades avancés de développement et est principalement présente dans les pièces de couleur violet des stylés et des corolles, ils ont aussi localisé les cyprosines dans la couche de cellules épidermiques des stylés.

In-situ des études de localisation ont montré que les points d'accès ne sont pas répartis de manière aléatoire dans les plantes. Au contraire, ils sont situés dans différents tissus spécifiques en fonction des espèces (SIMÕES et FARO, 2004). En outre, dans chaque partie de la cellule, l'activité protéolytique est effectuée par une protéase distincte spécifiquement ciblé vers des compartiments subcellulaires spécifiques (PESQUET, 2012).

III.3.2.3. Caractéristiques du système enzymatique

En raison de la présence des protéases aspartiques (APs) avec la capacité de coaguler le lait, les fleurs de cardon appartenant au genre *Cynara* sont traditionnellement utilisées dans la région de la Méditerranée pour la production de fromages artisanaux (ROSEIRO *et al.*, 2003 ; SILVA et MALCATA, 2005). En outre, les contraintes du consommateur sur l'utilisation de présure pour des raisons religieuses, régime alimentaire (p. ex. végétarisme) ou l'opposition aux aliments génétiquement modifiés ont incité l'étude de ces enzymes comme substituts de présure (ROSEIRO *et al.*, 2003).

Le cardon (*Cynara cardunculus L.*) produit deux groupes identifiés d'APs végétales typique « cardosines et cyprosines » dans les fleurs matures. A partir de l'extrait des fleurs séchées, obtenus à pH alcalin (8,3), trois glycosyleptidases, avec activité de coagulation

du lait, ont été isolés et nommés cynarases 1, 2 et 3 (CORDEIRO *et al.*, 1994 ; HEIMGARTNER *et al.*, 1990). Le nom cynarase a été remplacé plus tard par cyprosinine (CORDEIRO *et al.*, 1994 a), chaque peptidase purifiée se compose de deux sous-unités, une grande (32,5 – 35,5 kDa) et une petite (13,5 – 16,5 kDa). Parmi ces trois peptidases, la cyprosinine 3 est la plus semblable à la chymosine -l'enzyme permettant de coaguler le lait de différents mammifères dans la fabrication du fromage-(CORDEIRO *et al.*, 1992).

En revanche, les cardosines ont été purifiées et caractérisées à partir de stigmates frais de *C. cardunculus* (VERISSIMO *et al.*, 1995). Contrairement aux attentes, les cardosines et les cyprosinines n'ont jamais été co-purifiées (PIMENTEL *et al.*, 2007). Le procédé de purification utilisé pour les cardosines, implique une extraction à pH acide suivie d'une chromatographie d'exclusion de taille et échangeuse d'anions.

La cardosine A, le plus abondant de cardosines, s'accumule dans les vacuoles de stockage des protéines des papilles stigmatiques épidermique et dans les vacuoles des cellules épidermiques dans le stylet (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1997). Le preprocarnosine A est codé par le gène CARDA et constitué de 504 résidus d'acides aminés. L'enzyme mature est formé par deux peptides de 31 et 15 kDa et a une faible activité protéolytique (ROSERIO *et al.*, 2003).

Contrairement à la cardosine A, la cardosine B s'accumule dans la matrice extracellulaire du tissu de transmission, ce qui suggère que les deux cardosines peuvent jouer différents rôles dans le pistil de *Cynara cardunculus L* (VIEIRA *et al.*, 2001). Bien que moins abondants que la cardosine A, la cardosine B a plus d'activité protéolytique et peut participer à la digestion des protéines générales (FARO *et al.*, 1995). Cette enzyme affiche 73 % de similarité à la cardosine A (VIEIRA *et al.*, 2001). Le précurseur de la cardosine B (contient 506 acides aminés) est codé par le gène CARDB. L'enzyme mature est formé par deux peptides de 34kDa et 14kDa (VIEIRA *et al.*, 2001).

Dans des études ultérieures, SIMON *et al.*, (2009) ont purifié et caractérisé quatre APs nouvelles de pistils de *C. cardunculus*, élevant ainsi le nombre de protéases qui avait été isolée, purifiée et biochimiquement caractérisée de cette espèce à neuf. Ces quatre enzymes-cardosines, E, F, G et H- sont des dimères (env. 27 kDa et 11 kDa pour le lourd et léger chaînes, respectivement), glycosylées et avec une activité maximale au voisinage de pH 4,3.

Ces enzymes ressemblent à la cardosine A plus qu'à la cardosine B ou cyprosinés (PIMENTEL *et al.*, 2007).

III.3.2.4. Hydrolyse des caséines par les protéases de l'extrait de cardon

Comme la plupart des autres enzymes de coagulation du lait, les APs du cardon clivent la κ -caséine au niveau de la liaison Phe105-Met106 (LUFRANO *et al.*, 2012. RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1996 ; SAMPAIO *et al.*, 2008). Certaines de ces enzymes clivent la caséine- α_s et la β -caséine dans différentes liaisons peptidiques selon la spécificité de l'APs (tableau 3).

Il a été affirmé que la cardosine A et la cardosine B sont similaires, en termes de spécificité et d'activité, à la chymosine et la pepsine, respectivement (PIRES *et al.*, 1994; FARO et PIRES, 1995). Dans les préparations non fractionnée de caséinates de sodium, les caséines α_s étaient plus sensibles à la protéolyse par la cardosine B que la β -caséine, alors qu'avec les caséines purifiés, le contraire a été observé (SILVA et MALCATA, 1999). SOUSA (1993) et MACEDO, FARO et PIRES (1993) ont signalé que le site de clivage primaire sur la caséine- α_{s1} bovine est Phe23-Phe24 ; autres liaisons peptidiques peut également être clivés dans la caséine, viz. Phe145-Tyr146, Leu149-Phe150, Tyr153-Tyr154, Leu156-Asp157, Ala163-Trp164. Trp164-Tyr165, Tyr165-Tyr166 et Tyr166-Val167 (MACEDO *et al.*, 1993).

Dans la caséine- α_{s2} bovine, les cardosines catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques Phe88-Tyr89 et Tyr95-Leu96 (MACEDO *et al.*, 1996). SOUSA et MALCATA (1998) ont suivi la protéolyse primaire de la caséinate ovine par les deux cardosines dans des extraits aqueux bruts de *C. cardunculus*; les principaux sites de clivage dans la caséinate ovine ont été jugés Phe105-Met106 pour la κ -caséine, Leu127-Thr128 et Leu190-Tyr191 pour la β -caséine, Phe23-Val24 pour la caséine- α_{s1} et Phe88-Tyr89 pour la caséine- α_{s2} .

Des études, relatives à l'action indépendante des cardosines A et B sur les caséines bovines, a clairement indiqué que dans la caséine α_{s1} ; les deux enzymes clivent, principalement, les bondes ; Phe23-Phe24, Phe153-Phe154 et Trp164-Tyr165 ; la cardosine A clive également le lien Tyr165-Tyr166, alors que la cardosine B clive, en plus, la liaison Phe150- Arg151 (RAMALHO-SANTOS, VERÕASSIMO, FARO et PIRES, 1996).

La liaison peptidique Leu192-Tyr193 de la β -caséine est la plus susceptible à l'attaque par les deux cardosines, les liaisons peptidiques ; Leu127-Thr128 et Ser166-

Leu165 peuvent également être clivés, mais leur labilité est différente selon la cardosine qui est utilisée (SIMOAES, 1998). Il a également été rapporté que les deux enzymes clivent la bonde Phe105-Met106 chez les caséines bovines.

La cyprosine 3 a montré une activité de coagulation avec le lait de brebis que la chymosine, ainsi qu'une hydrolyse plus spécifique des protéines dans ce type de lait (CORDEIRO *et al.*, 1992). Les trois cyprosines ont un pH optimum environ 5.1 avec la caséine bovine comme substrat.

Tableau 3 : Spécificité d'action de cardosine A et B isolés de *Cynara cardunculus* sur α_{s1} , β et κ -caséines bovine, caprine et ovine.

Endopeptidase	Caséines bovines		
	Caséine α_{s1}	β -Caséine	κ -Caséine
Cardosine A	Phe23-Phe24 Phe153-Tyr154 Trp164-Tyr165 Tyr165-Tyr166 ^a	Leu127-Thr128 Leu165-Ser166 Leu192-Tyr193 ^b	Phe105-Met106 ^b
Cardosine B	Phe23-Phe24 Phe150-Arg151 Phe153-Tyr154 Trp164-Tyr165 ^a	Leu165-Ser166 Leu192-Tyr193 ^c	Phe105-Met106 ^c
	Caséines caprines		
	Caséine α_{s1}	β -Caséine	κ -Caséine
Cardosine A et cardosine B	Phe153-Tyr154 ^d	Leu127-Thr128 Leu190-Tyr191 ^d	Lys116-Thr117 ^e
	Caséines ovines		
	Caséine α_{s1}	β -Caséine	κ -Caséine
Cardosine B	Leu156-Asp157 Trp164-Tyr165 ^f	Leu127-Thr128 Leu165-Ser166 Leu90-Tyr191 ^f	Phe105-Met106 ^f

Les données sont tirées de : ^aRamalho-Santos et al. (1996) ; ^bPires (1998a) ; ^cPires (1998) ; ^dSilva and Malcata (2000) ; ^eSilva and Malcata (2005) ; ^fSilva and Malcata (1999).

En ce qui concerne l'activité, les cardosines E, F, G, et H ressemblent à la cardosine A plus qu'à la cardosine B ou cyprosines, avec les cardosines E et G étant plus actifs que la cardosine A vers le peptide synthétique Lys-Pro-Ala-Glu-Phe -NPh-Ala-Leu. Lorsque la

spécificité des cardosines E, F, G et H a été évaluée par clivage de la chaîne β de l'insuline oxydée, les quatre enzymes étaient capables de cliver le substrat dans les mêmes liaisons peptidiques que la cardosine A. Néanmoins, la sélectivité de ces enzymes varie en fonction de la vitesse exposée avec chaque liaison peptidique scissile (SARMENTO *et al.*, 2009 ; CAVALLI *et al.*, 2013).

Matériel

et

Méthodes

Matériel et méthodes

La partie pratique de ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de la Nutrition et Technologies alimentaires (LNTA) de l'INATAA dirigé par le professeur Zidoune M N et au laboratoire de Biochimie génétique et biotechnologies végétales (BGBV) au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie (FSNV) de l'université des frères Mentouri Constantine dirigé par le professeur khelifi D.

En premier temps, nous avons préparé les extraits enzymatiques à partir des matières premières végétales (latex de *Ficus carica* pour l'extrait de la ficine et les fleurs de *Cynara cardunculus* pour l'extrait de fleurs de cardon).

Les extraits ainsi obtenus ont servi à l'hydrolyse des caséines commerciales (SIGMA C8654) qui sont sous forme de caséinates de sodium, la cinétique d'hydrolyse a été suivi en effectuant des prélèvements à différents temps d'hydrolyse jusqu'à 24h.

Les hydrolysats obtenus ont été caractérisé en mesurant leur degré d'hydrolyse par la méthode OPA et en réalisant des profils électrophorétiques (SDS-PAGE).

Enfin, la technique du western blot est appliquée pour tester l'allergénicité de ces hydrolysats.

I. Extraction des systèmes enzymatiques

I.1. Extrait brut de la ficine

I.1.1. Collection de latex

Le latex utilisé dans notre travail a été collecté sur des arbres unifères de *Ficus carica* dans la région Ferdjioua (Wilaya de Mila), dans le même environnement et les caractéristiques du sol.

Tous les échantillons ont été récoltés manuellement (figure 9) au même stade de maturation pendant la saison chaude (vers la fin du mois d’Août), en coupant le pédoncule du fruit vert (des fruits immatures) des tiges. Quelques gouttes de latex de la figue pouvaient s’écouler dans des boîtes stériles comme le montre la figure ci-dessous, le latex collecté est conservé à -20°C jusqu’à extraction du système enzymatique.



Figure 9 : collection de latex.

I.1.2. Extraction

Le latex est décongelé puis clarifié par centrifugation à 14 000 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant clair (sérum) est séparé de la matière gommeuse précipitée (figure 11 et 12) (DI PIERRO *et al.*, 2014). L'extrait clarifié est alors lyophilisé et conservé à -20°C (ZARE *et al.*, 2013). Le schéma ci-dessous (Figure 10) résume les étapes d’obtention de l’extrait clarifié de la ficine.

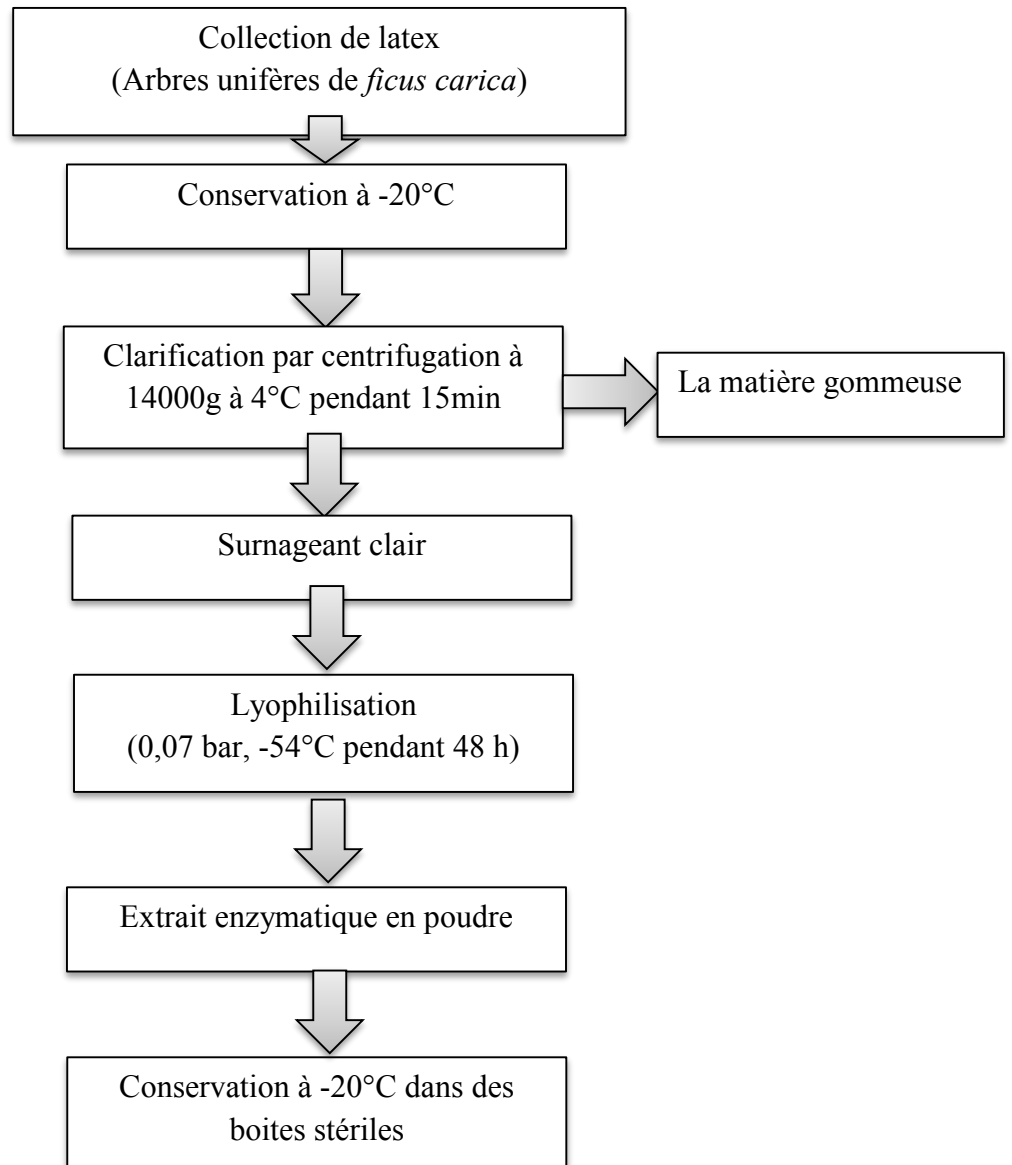


Figure 10: Diagramme d'obtention de l'extrait brut de la ficine.



Figure 11 : Séparation de la matière gommeuse du surnageant



Figure 12 : La matière gommeuse séparée après centrifugation

I.2. Extrait brut des fleurs de cardon

I.2.1. Récolte des fleurs

Afin d'obtenir une activité protéolytique optimale et un meilleur rendement d'extraction, les fleurs du cardon doivent être récupérées à un stade avancé de floraison (violet foncé) (Figure 13, B), à partir de capitules frais et bien développés (ROSEIRO *et al.*, 2003 ; ZIKIOU, 2013). Les capitules (figure 14) de *Cynara cardunculus* ont été récoltés en fin du mois de juin dans un champ situé près de la montagne Djebel Ansel, dans la commune d'Ain Makhoulf (Wilaya de GUELMA). Les capitules ont été récoltés dans le même environnement et les caractéristiques du sol en une seule récolte (même lot).

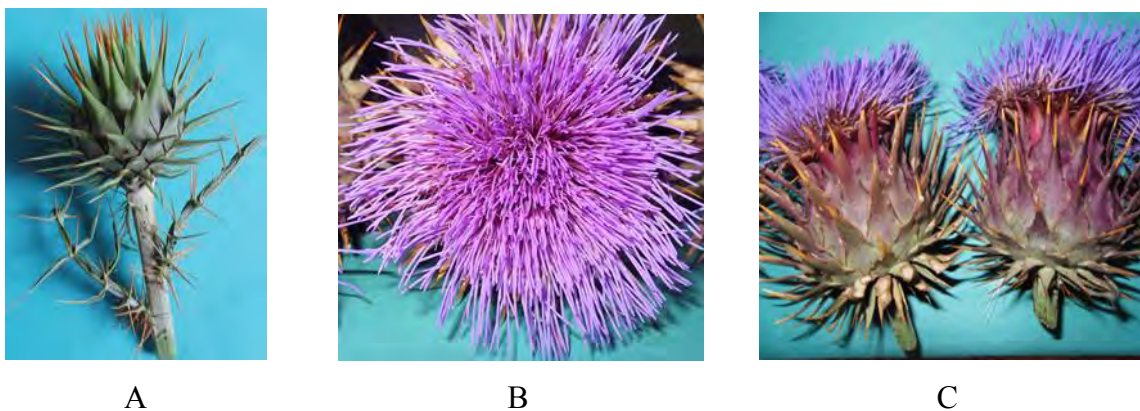


Figure 13 : Capitules de fleurs de cardon
(A : avant florescence, B, C : après florescence).

I.2.2. Conservation des fleurs

La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation, la majeure partie de l'eau contenue dans un produit.

Elle permet une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit (RENE *et al.*, 1993). Son principe repose en pratique sur deux opérations : la congélation et la déshydratation. La congélation est considérée comme une étape préalable à l'opération de déshydratation, cette dernière recouvre deux principes physiques : la sublimation de la glace et la désorption finale de la quantité d'eau résiduelle, non congelée (GENIN *et al.*, 1996).

Les fleurs, enlevées de leurs capitules (figure 14), ont été préalablement congelées à une température de -20°C , puis lyophilisées à une pression de 0,07 bar et à une température de -54°C pendant 20-24 heures. Les fleurs ainsi lyophilisées (figure 15) sont mises dans des

sacs étanches à la vapeur d'eau et conservé dans un endroit à l'abri de la lumière et de l'humidité.



Figure 14 : les fleurs fraîches du cardon avant lyophilisation.



Figure 15 : une fleur de cardon après lyophilisation.

I.2.3. Obtention de l'extrait enzymatique brut

Pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches de cardon, plusieurs types d'extractions ont été appliqués et de nombreux protocoles ont été décrits.

Le protocole, appliqué dans notre travail est celui décrit par (FRENI *et al.*, 2001), l'extrait brut a été préparé par broyage, à l'aide d'un mortier, d'un échantillon de fleurs (5g) pris au hasard. Ensuite la macération a été fait dans 50 ml de tampon acétate de sodium 0,1 M (pH 5,4), additionné de 0,2% d'acide borique afin d'éviter ultérieurement toute prolifération de microorganismes. Après macération une centrifugation à 6000 g pendant 5 min a été réalisée, le surnageant qui en résulte a été filtré (papier Wattman n°1) et l'extrait brut de fleurs de cardon (figure 16) est obtenu, il est ensuite congelé à une température de -20°C pour être lyophilisé par la suite et cela dans l'objectif d'éliminer la majeure partie de l'eau dans cet extrait et de le concentrer.

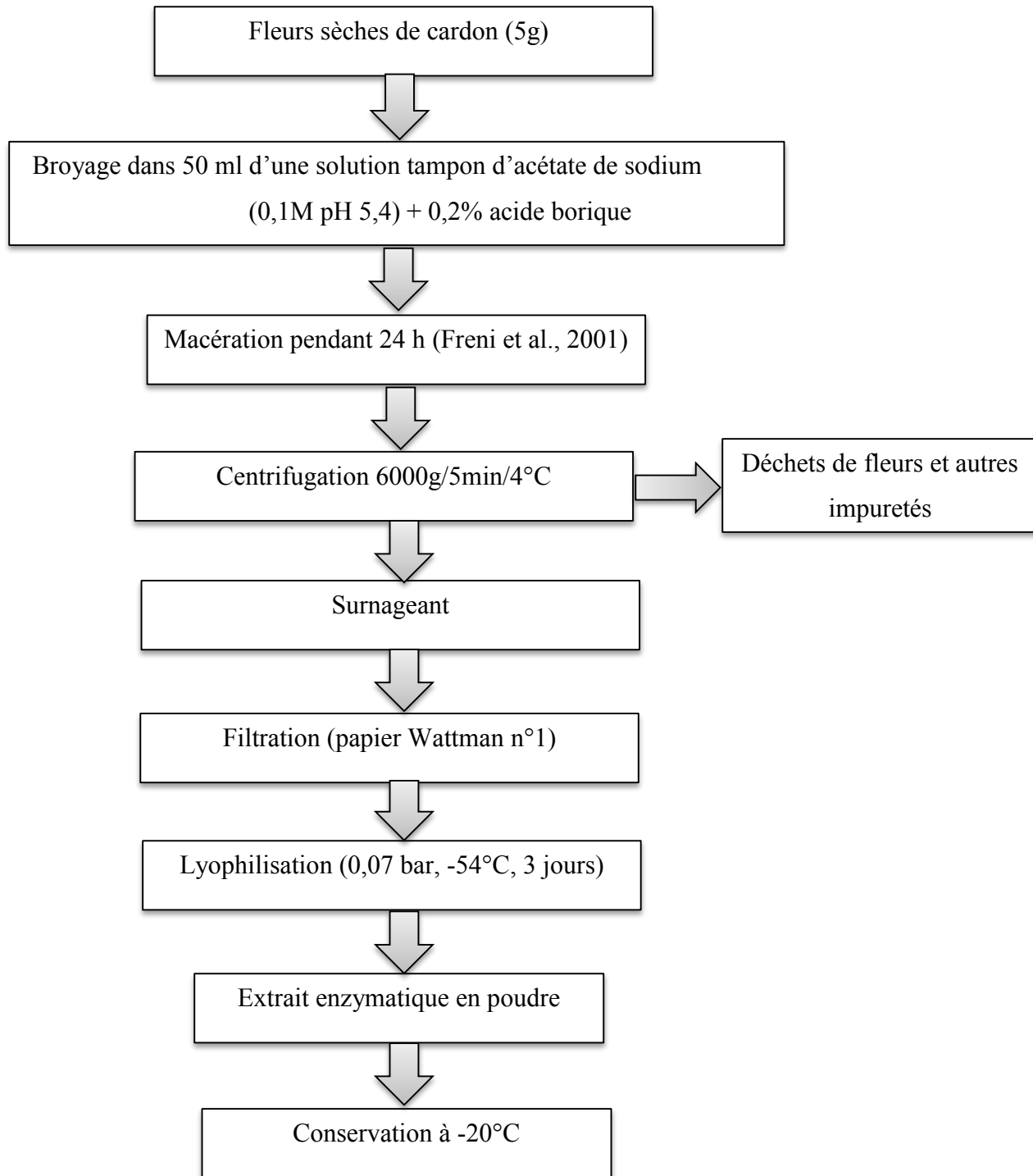


Figure 16 : Diagramme d'obtention de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon.

II. Caractérisation des extraits obtenus

II.1. Mesure du pH

La détermination du pH est réalisée à l'aide d'un pH-mètre (Hanna instruments, France) selon la méthode AFNOR, (1986). La valeur du pH est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser. Les mesures sont précédées d'une étape d'étalonnage qui consiste en un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution de pH connue (solution de pH étalon).

II.2. Extrait sec total

Le principe de la méthode utilisée consiste en une dessiccation par évaporation à l'étuve (105°C) de 1g de chaque extrait enzymatique (ANONYME, 1993), suivie d'une pesée du résidu sec total après refroidissement dans un dessiccateur. Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation :

$$\%MS = M_{\text{sec}} / M_i \times 100$$

M_i : masse de l'échantillon initial (g) ;

M_{sec} : masse de l'échantillon sec (g) après passage dans l'étuve à 105°C.

II.3. Détermination de la teneur en protéines

Le dosage des protéines de l'extrait enzymatique obtenu est déterminé selon la méthode de Bradford, (1976), dont le principe est basé sur la coloration des protéines de la solution par le bleu de Coomassie G250. Une fois lié aux protéines sa couleur vire du rouge vers le bleu. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à de faibles concentrations, inférieures à 20 µg/mL. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

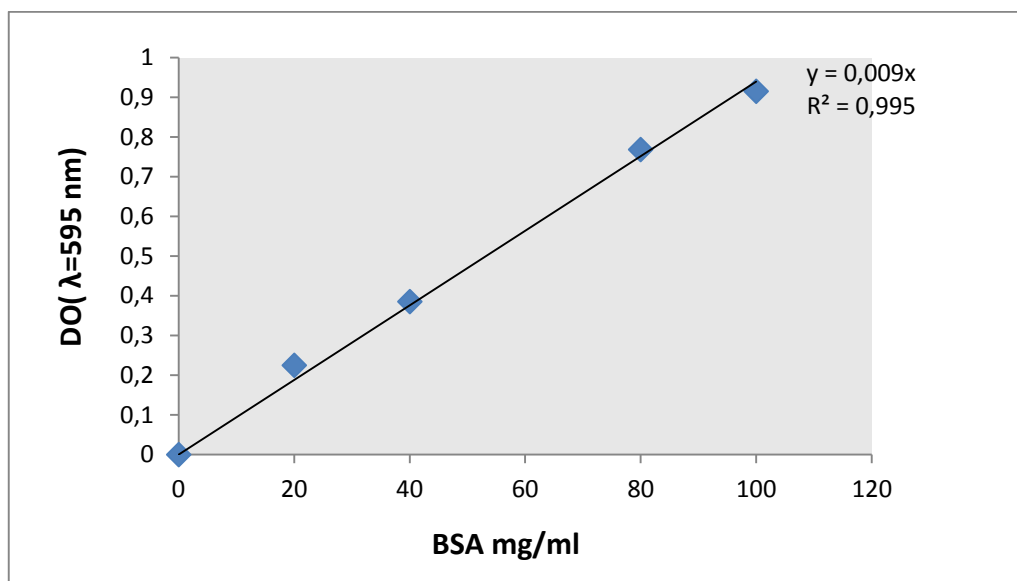
Les extraits enzymatiques sont dosés de la manière suivante :

Nous prenons 100 µl de l'extrait enzymatique végétale, auquel nous ajoutons 3ml du réactif de Bradford, le mélange est homogénéisé et laissé au repos à l'obscurité et à température ambiante pendant 5min. La densité optique des échantillons est mesurée au spectrophotomètre à 595 nm après 5min de réaction.

La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe étalon (fig.17) réalisé avec une solution mère contenant 1 mg/ml de BSA, une série de dilution est préparée (Tableau 4). La concentration en protéines est exprimée en mg de protéines /ml d'extrait enzymatique.

Tableau 4 : Gamme d'étalonnage de la solution BSA.

N° Tube	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Tampon (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif de Bradford (ml)	3					

**Figure 17** : Courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA

II.4. Détermination de l'activité coagulante

L'activité coagulante est mesurée selon la méthode de BERRIDGE (1945), modifiée par COLLIN et al, 1977. Elle est réalisée sur le substrat standard. La technique consiste à ajouter 1ml d'extrait coagulant à 10 ml de substrat puis à noter le temps de coagulation à 30°C.

Le substrat standard est préparé par dissolution de la poudre de lait type "low heat" (10 %, P/V) dans une solution de chlorure de calcium (CaCl_2 0,01 M) et ajustement du pH à 6,5 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 0,1 N).

Une unité d'activité enzymatique ou unité présure (UP) correspond, selon la formule de BERRIDGE (1945), au nombre d'unités de poids ou de volume de lait qui peuvent être coagulées par 1 ml de préparation coagulante en 100 secondes et à 30°C (BENGANA, 2001).

$$A.C. = \frac{10 \times V}{T \times V'}$$

Où : V : volume du lait ;

V' : volume de l'extrait enzymatique ;

T : temps de floculation.

L'activité coagulante des extraits, peut être également exprimée en « force coagulante de SOXHLET » (F), selon la relation suivante : $F=UP/0,0045$ (BOURDIER et LUQUET, 1981 ; SIBOUKEUR, 2005).

II.5. Dosage de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique de chaque extrait enzymatique brut est dosée par la méthode décrite par Lenoir et Auberger (1977) et modifiée par MECHAKRA *et al.*, (1999), avec quelques modifications nécessaires Cité par BELMESSIKH, (2011).

Principe

Les protéases catalysent l'hydrolyse des protéines et les polypeptides en libérant des acides aminés libres et des peptides simples qui se trouvent dans la phase soluble. Les molécules non hydrolysées sont précipitées par le TCA. La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, que l'on utilise comme standard de dosage colorimétrique de l'activité protéasique à l'aide du réactif de *Folin-Ciocalteu*. Celui-ci réagit avec la tyrosine et le tryptophane pour donner par réduction un complexe bleu.

Réaction enzymatique

Le mélange réactionnel est préparé par addition de :

- 1 ml de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ;
- 1.5 ml du tampon adéquat pour chaque extrait (le tampon acétate de sodium **(0.1M ; pH 5.4)** pour l'extrait de cardon et le tampon phosphate **(0.1M ; pH 7)** pour l'extrait de ficine)
- 2.5 ml de substrat (solution de caséine à 1% solubilisée dans le tampon adéquat pour chaque enzyme).

Après agitation et incubation 1 h au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid (4%) ; le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace ou à 4°C ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées. Les produits d'hydrolyse sont séparés par centrifugation à 6200g pendant 10 minutes, le culot est éliminé et le surnageant est récupéré pour estimer la quantité des produits d'hydrolyse par la méthode d'Anson (1938).

Protocole de dosage

Les composés azotés non protéiques solubles dans le filtrat sont dosés par la méthode d'Anson (1938). 0,5 ml du filtrat sont mélangés avec 2,5 ml de Na₂CO₃ à 2% dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 ml de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4^{ème} sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min.

L'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm ; l'activité est calculée par référence à une courbe d'étalonnage établie en utilisant la tyrosine comme standard avec une concentration de la solution mère de 100 µg/ml (voir fig. 18). Une unité de protéase est l'équivalent de 1µg de tyrosine libérée pendant 1h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.

L'activité protéolytique des deux extraits a été comparée avec celle d'une pepsine porcine commerciale.

Le blanc est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat (caséine). Chaque dosage est effectué en triple.

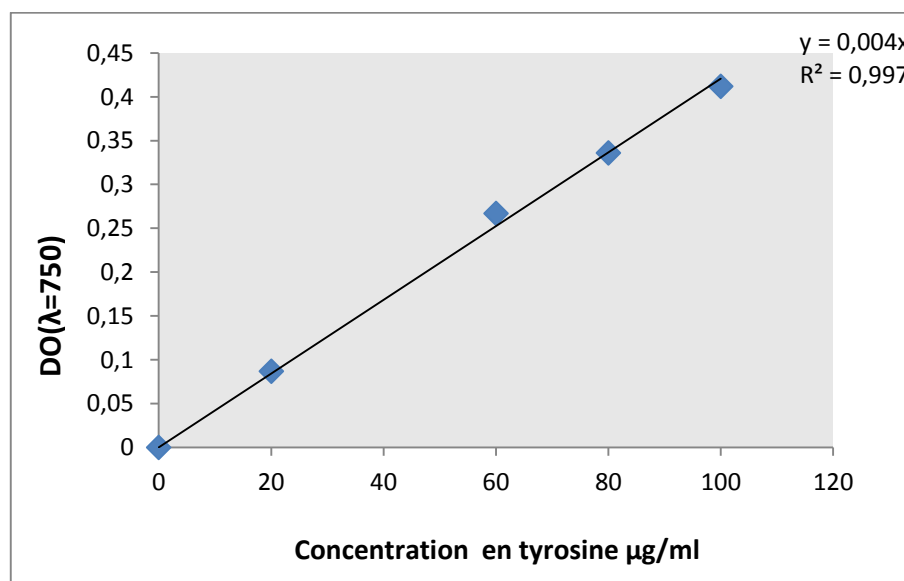


Figure 18 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la tyrosine

II.6. Activité spécifique

Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique et exprimée en U/mg :

Activité spécifique= activité enzymatique (U)/ teneur en protéines (mg).

II.7. Electrophorèse SDS-PAGE

La séparation des différentes fractions protéiques contenues dans l'extrait enzymatique est réalisée par électrophorèse en milieu dénaturant en présence de SDS ; Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par LAEMMLI, (1970) qui utilise deux gels de composition différente : un gel de concentration et un gel de séparation.

Principe

Dans l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécyl sulfate de sodium (SDS), la migration est déterminée non pas par la charge électrique intrinsèque des polypeptides mais par leur poids moléculaire. Le SDS est un détergent anionique, qui dénature les liaisons non covalentes des protéines en enveloppant la structure primaire des polypeptides. De ce fait, il leur confère une charge négative proportionnelle à leur longueur dans le rapport d'environ une molécule de SDS pour deux résidus d'acides aminés. Le mercaptoéthanol est ajouté afin de réduire les liaisons disulfures. Les complexes formés par les protéines et le SDS sont soumis à une électrophorèse dans un gel de polyacrylamide.

Mode opératoire

La séparation a été réalisée sur un gel de concentration de 7.5% et un gel de séparation de 15%, la composition des gels est donnée en annexe 2. La préparation des échantillons consiste à dénaturer les protéines dans un tampon de solubilisation (tris/HCl, SDS, β -Mercaptoéthanol, glycérol) : à 50 μ l de chaque extrait enzymatique, sont ajoutés 15 μ l de tampon et coloré au bleu de bromophénol qui est un indicateur coloré qui détermine le front de migration des protéines et permet de repérer la fin de l'électrophorèse, puis chauffé dans un bain Marie à une température de 90°C pendant 5 minutes afin d'accélérer la dénaturation.

Les échantillons ainsi préparés sont déposés à raison de 10 à 20 μ l dans chaque puits après avoir monté sur l'unité d'électrophorèse les 2 plaques renfermant le gel et remplis les cuves inférieures et supérieures de tampon d'électrode. L'unité est alors mise sous tension,

courant et voltage constants : 20 mA, 250V. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 15 à 76.1 KDa.

Après migration, les gels sont démoulés, puis traités dans une solution de fixation (Annexe 2) et colorés avec une solution de coloration (30% éthanol, 5% acide acétique, eau qsp 100% et 0,1 de bleu de Coomassie R250) pendant 2 heures sous agitation. Les gels sont ensuite décolorés avec la même solution de fixation.

III. Hydrolyse des caséines

III.1. Cinétique d'hydrolyse

L'hydrolyse d'une protéine par traitement enzymatique induit nécessairement un changement de la structure et de la conformation de la protéine d'origine, ce qui provoque des conséquences importantes sur les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de cette dernière (SINDAYIKENGERA et XIA, 2006).

Durant l'hydrolyse, les enzymes scindent les liens peptidiques par l'action d'une molécule d'eau, libérant ainsi des acides aminés libres et de nombreux peptides dont la taille et les propriétés sont très différentes de celles de la nature de la protéine initiale. La composition d'un hydrolysats enzymatique dépend principalement de la nature de la protéine hydrolysée, du type de protéase (s) utilisée (s), des conditions physicochimiques du milieu réactionnel et du traitement d'inactivation de l'enzyme appliqué à fin de réaction (ROUFIK, 2005).

Les caséines sont dissoutes à raison de 1.5% dans la solution tampon adéquate (1.5g de caséine en poudre dans 100 ml de tampon) ; le tampon phosphate (0.1M ; pH 7) pour l'hydrolyse par l'extrait de la ficine et le tampon acétate (0.1M ; pH 5.4) pour l'hydrolyse par l'extrait des fleurs de cardon, L'hydrolyse a été réalisé à 37 °C dans un bain marie thermostaté (DI PIERRO *et al.*, 2014). Des aliquotes ont été prises à différents intervalles de temps 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 45 min, 1h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h et 24 h.

La protéolyse a été effectuée à différents rapports enzyme/substrat 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000 (p/p).

Les rapports retenus pour chaque enzyme sont, 1/100 et 1/1000 (p/p) pour l'extrait de la ficine et 1/50 et 1/100 (p/p) pour l'extrait de fleurs de cardon.

L'arrêt de l'hydrolyse a été fait par chauffage des aliquotes prélevées à 90°C pendant 15 min pour dénaturer l'enzyme. Les protéolysats obtenus ont été conservées à -20°C jusqu'à caractérisation.

III.2. Evaluation de la protéolyse

III.2.1. Evaluation de la protéolyse par la méthode OPA

Le degré d'hydrolyse (DH), défini comme le pourcentage de liens peptidiques coupés, est généralement utilisé pour le contrôle de l'hydrolyse enzymatique et la caractérisation des hydrolysats protéiques. Le DH peut être déterminé en continu par la technique pH-stat ou en utilisant des réactifs spécifiques aux amines primaires comme l'acide trinitrobenzènesulfonique (TNBS) et l'O-phthaldialdéhyde (OPA) (TURGEON *et al.*, 1991).

Le dosage des groupes amines par la technique d'O-phthaldialdéhyde (OPA) selon la méthode de NIELSEN *et al.* ; (2001) est une technique spectroscopique sensible et simple à réaliser, la réaction conduit à la formation d'un isoindole qui absorbe fortement à 340 nm (figure 20).

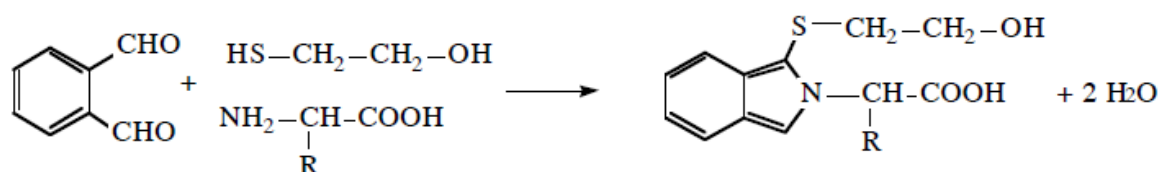


Figure 19 : Formation du composé isoindole.

Le réactif (50 ml) est préparé journalièrement en combinant du sodium tétraborate 0,1 M (25 ml), du SDS 20% P/V (2,5 ml), de l'OPA (40 mg dissout dans 1 ml de méthanol) et du β -mercaptoéthanol (100 μ l), ensuite le mélange est ajusté à 50 ml de l'eau distillée.

Pour mesurer le DH, 20 μ l d'échantillon sont ajoutés directement à une cuvette contenant 2ml du réactif OPA. La solution est agitée par inversion et incubée 2 min à température ambiante, puis la densité optique est lue à 340 nm. Une courbe étalon à la leucine (0 à 1mg/ml) (figure 20) est tracée en effectuant une série de dilution (Tableau 5).

Tableau 5 : Gamme d'étalonnage de la solution de la leucine.

N° tube	1	2	3	4	5	6
Volume de la solution mère (μ l)	0	20	40	60	80	100
Volume de l'eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
Volume de réactif OPA (ml)	2					

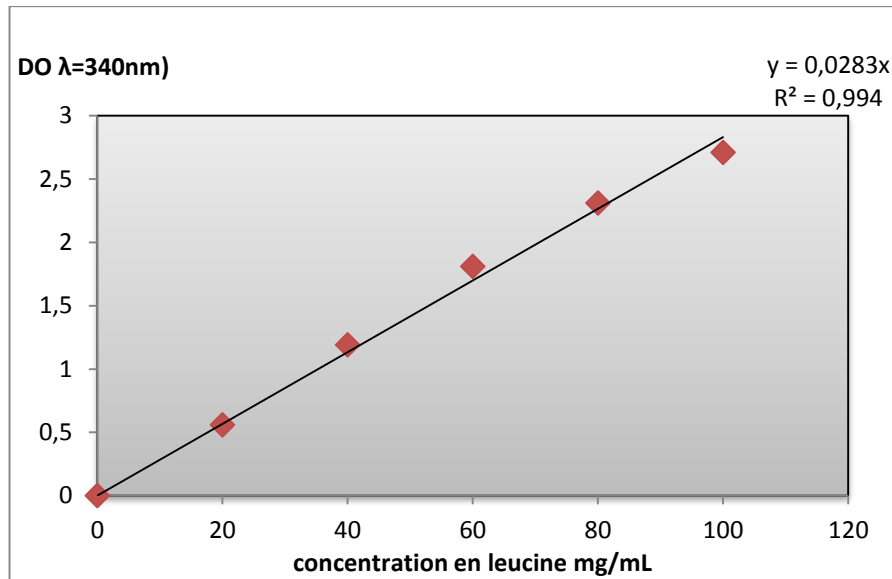


Figure 20 : Courbe d'étalonnage obtenue avec la Leucine

Le taux de groupements (NH₂) est ainsi exprimé en mg/ml. Les valeurs de DH sont les moyennes de trois répétitions.

Le degré d'hydrolyse est déterminé comme suit :

$$DH\% = \frac{[NH_2] - [NH_2]_0}{[NH_2]_T - [NH_2]_0} \times 100$$

[NH₂] : concentration de NH₂ de l'hydrolysate ;

[NH₂]₀ : concentration de NH₂ avant hydrolyse ;

[NH₂]_T : concentration de NH₂ de l'hydrolysate de 24h avec la pepsine porcine à un ratio de 5%.

III.2.2. Evaluation de la protéolyse par électrophorèse SDS-PAGE

Les profils électrophorétiques des hydrolysats caséiniques ont été déterminés par électrophorèse en milieu dénaturant en présence de SDS, une (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode décrite précédemment.

Cette technique nous permet d'évaluer la disparition des bandes correspondant aux caséines natives et l'apparition d'autres bandes correspondant aux nouveaux peptides générés suite aux différentes hydrolyses.

III.3. Evaluation de l'allergénicité des hydrolysats obtenus

Dans cette partie du travail, et afin d'évaluer l'immunoréactivité des hydrolysats obtenus après hydrolyse enzymatique des caséines bovines, nous avons appliqué la technique du western blot en utilisant des sérums de patients allergiques.

Sérums humains

Nous avons utilisés dans notre travail des sérums humains obtenus à partir des patients atteints d'APLV confirmée par des tests cliniques. Ces derniers proviennent du laboratoire **Ibn SINA** de Constantine.

Les 11 patients, 7 garçons et 4 filles, ayant un âge compris entre 21 jours et 6 ans (Tableau 6). Nous n'avons utilisé que les sérums des patients ayant un taux d'IGE spécifiques élevées et on a éliminé ceux qui présentent un taux faible.

Tableau 6 : Caractéristiques des 11 patients ayant une allergie avérée.

Prélèvement du	Age	Sexe	Taux IGE spécifiques
Tous les prélèvements ont été effectués durant l'année 2015.	6 ans	Masculin	385 U
	3 mois	Masculin	34 U
	21 jours	Masculin	0,21 U
	6 mois	Féminin	54 U
	14 mois	Masculin	12 U
	4 mois	Féminin	10,3 U
	11 mois	Féminin	72 U
	1an	Masculin	1,33U
	4ans	Masculin	8,79U
	2ans	Masculin	41,6U
	6mois	Féminin	0,52U

III.3.1. Détermination du profil immuno-électrophorétique par le western blot

Le western blot est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique (sérum ou autre extrait ou homogénat tissulaire). C'est un outil de diagnostic complémentaire.

- **Principe**

Après une électrophorèse standard sur plaque, le gel est recouvert d'une membrane de nitrocellulose. Le sandwich de gel et de membrane est replacé dans une chambre de transfert, de sorte que les protéines migrent du gel vers la nitrocellulose, où elles se lient irréversiblement. La membrane peut alors être ôtée et trempée dans une solution contenant

un anticorps de la protéine d'intérêt. Ce complexe protéine-anticorps, formé sur la membrane peut alors être détecté par ajout d'un anticorps marqué et qui se lie sur le premier anticorps utilisé (celui qui est à présent lié à la protéine d'intérêt).

Nous avons appliqué le protocole illustré dans la (figure 21), il se résume comme suit :

- **Electrophorèse SDS-PAGE**

Ce test comporte une étape initiale de séparation électrophorétique en SDS-PAGE des différents peptides issus de l'hydrolyse des caséines contenues dans les hydrolysats testés.

La séparation se fait au travers d'un gel de polyacrylamide avec un gel de concentration de 7.5% et un gel de séparation de 15%, en présence de sodium dodécylsulfate (SDS).

- **Transfert des peptides sur membrane de nitrocellulose**

Les hydrolysats séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur gel de polyacrylamide sont transférés sous l'action d'un champ électrique en présence de SDS sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane servira de support à la révélation par les anticorps.

Le transfert a lieu grâce à un tampon Tris 25mM, SDS 0,1%(p/v), glycine 192 mM, éthanol 20% en milieu liquide à une intensité de 300 mA pendant 1heure. Après transfert la membrane est colorée avec le rouge penseau (0,1% RP dans de l'acide acétique à 5 %) pour vérifier la migration des protéines du gel d'électrophorèse vers la membrane cellulosique, décolorée avec une solution de NaOH (0,1M), puis rincée avec du PBS (NaCl 0,136 M, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,46 mM, Na₂HPO₄ 81 mM).

- **Immunoblotting sur les membranes de nitrocellulose**

Suite au transfert des peptides sur la membrane, cette dernière est incubée avec le sérum du patient allergique car l'ajout d'un anticorps anti IgE humaine qui sera couplé à une enzyme spécifique à un substrat permettra de révéler la liaison des IgE avec un ou plusieurs protéines.

Une première étape de blocage pendant 4 heures dans une solution de saturation (PBS/Tween 80 à 0.1% (v/v), Polyvinylpyrrolidone (PVP) 4% (m/v)) est nécessaire afin de bloquer tous les sites libres de la membrane (ce qui évitera les faux positifs).

Trois rinçage de 10 minutes avec la solution de lavage (PVP/Tween 80 à 0.1% (v/v), Polyvinylpyrrolidone (PVP) 2% (m/v)) sont effectués. Le sérum du patient allergique dilué au 1/20^{ème} dans la solution de lavage est incubé avec la membrane pendant une nuit.

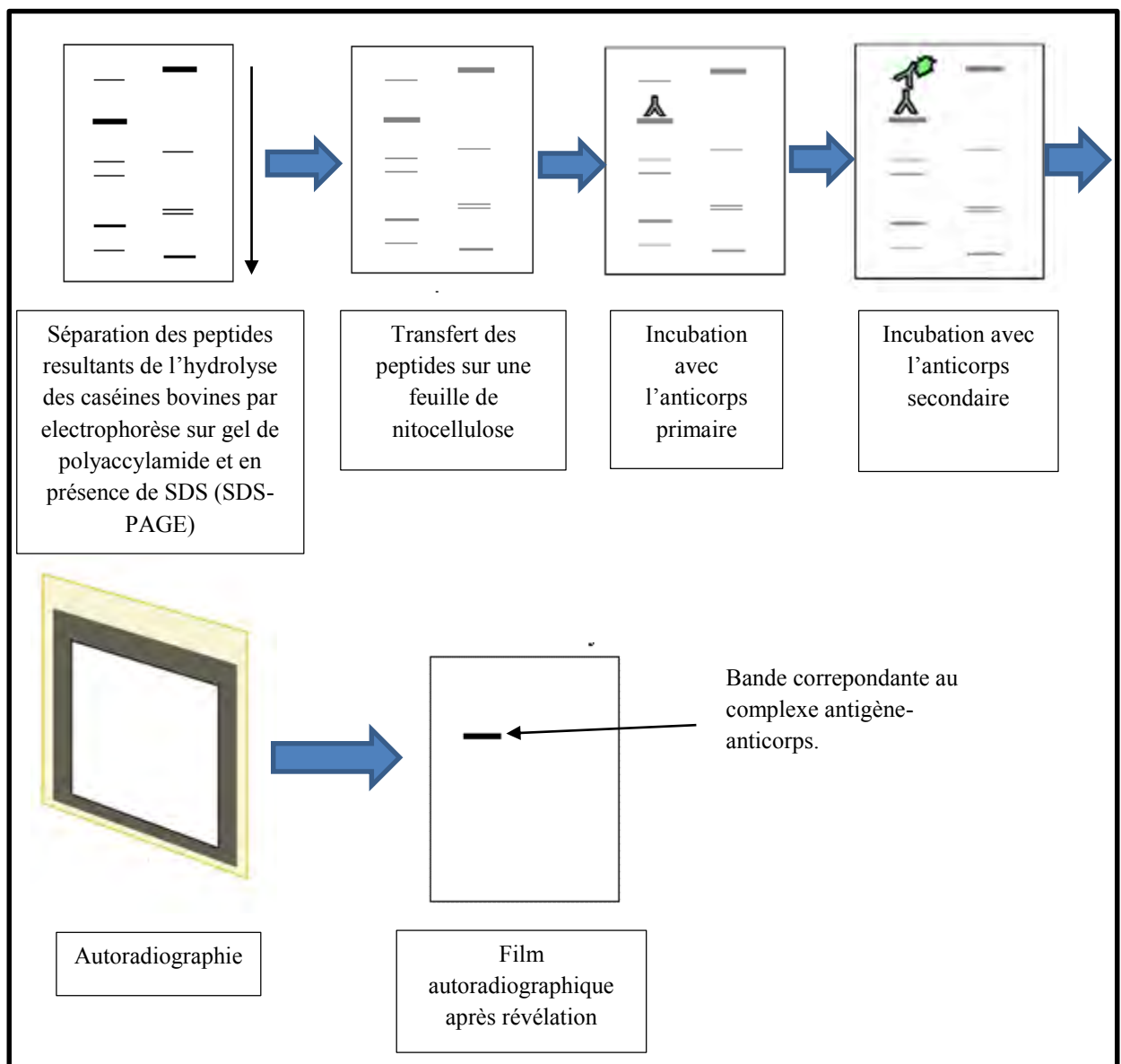


Figure 21 : Les principales étapes du test immunologique par le western blot.

A la fin de l'incubation, la membrane est de nouveau rincée 4 fois dans la solution de lavage. Le complexe antigène-IgE formé lors de l'incubation avec le sérum est détecté par l'utilisation d'un anticorps secondaire. Pour cela, un anticorps anti IgE humaine conjugué a été utilisé. Cet anticorps est dilué au 1/50.000^{ème} dans le tampon puis incubé avec la membrane pendant 1heure. La membrane est ensuite rincée 4 fois dans la solution de lavage, puis 1 fois dans le PBS seul.

Pour la révélation, elle se fait dans une chambre noire (à l'abri de la lumière), le substrat (1.5ml) est mis en contact avec la membrane pendant 5min. Le contact entre le film autoradiographique et la membrane dure 2 min à 1h30min. Ensuite le film résultant est

plongé dans la solution de révélation (15s), rincé avec l'eau de robinet pendant 30 secondes, puis il est plongé dans une solution de fixation pendant 30 secondes. Finalement il est laissé sécher sous la lumière rouge.

Résultats

et

Discussion

I. Caractéristiques des extraits enzymatiques

I.1. Extrait de la ficine

I.1.1. Rendement de l'extraction

L'extraction de la ficine à partir du latex est effectuée par centrifugation (14000g pendant 15 min à 4°C) selon le protocole décrit par DI PIERRO *et al.*, (2014). Le rendement est d'environ 85,71% (12 ml de la ficine brute pour 14 ml de latex) avec 14,29% (v/v) de matière gommeuse enlevée du latex après la centrifugation. Ce résultat est supérieur à celui obtenu par SIAR, (2014) estimé à 71,42%, ZARE *et al.*, (2013), dans une étude portant sur le latex de *ficus carica* ont déterminé que ce dernier contient environ 20% de gomme blanche. Cette différence peut être expliquée par les différences climatiques entre les régions de collection du latex ainsi que les caractéristiques du sol pouvant influencer sur la composition du latex.

I.1.2. Caractéristiques physicochimiques

L'extrait de la ficine obtenu est une solution visqueuse de couleur brune claire avec un aspect collant entre les doigts. Le pH de l'extrait est de 5.49, avec extrait sec total égal à 19 g/100g (tableau 6). La teneur en protéines est de 94,44 mg/ml, cette teneur est proche de celle trouvée par SIAR, (2014) estimée à 89,31mg/ml et inférieure à celles obtenus par FADYLOGLU, (2001) et DEVARAJ *et al.*, (2008b) évaluées à 116mg/ml et 150mg/ml respectivement. Elle est aussi supérieure à celle obtenue par NOUANI *et al.*, (2009) estimée à 22mg/ml.

Tableau 7 : Caractéristiques physicochimiques de l'extrait brut de la ficine.

Caractéristique	Extrait de la ficine
PH	5,49
Extrait sec total	19%
Taux de protéines (mg/ml)	94,44±5,56
Couleur	Brune clair
Texture	Visqueux

I.2. Extrait de fleurs de cardon

I.2.1. Rendement d'extraction

A partir d'un kilogramme de capitules frais (22 capitules de *Cynara cardunculus*) récolté en fin du mois de juin dans un champ situé près de la montagne Djebel Ansel, dans la commune d'Ain Makhoulf (Wilaya de GUELMA) avec un poids moyen de 41,62g par capitule,

la quantité de fleurs fraîches récupérée est de 250g soit un rendement en fleurs fraîches de 25 %.

Après lyophilisation, nous avons récupéré environ 100g de fleurs sèches, soit un rendement de 10% (10g de fleurs sèches pour 100g de capitule), ce rendement en fleurs sèches est supérieur à celui obtenu par ZIKIOU, (2013) estimé à 6%. Ceci est dû probablement, aux caractéristiques des capitules (poids moyen des capitules, la quantité de fleurs par capitule...) qui dépendent des conditions climatiques et environnementales des régions de collecte.

L'extraction du système enzymatique des fleurs de cardon a été réalisée selon le protocole décrit par Freni *et al.*, (2001), avec quelques modification, cette extraction consiste essentiellement, à une macération de 5g de fleurs sèches dans 50 ml du tampon citrate de sodium (0,1M et pH=5,4) soit un rapport de 1/10 (p/v). Après centrifugation et filtration, nous avons pu récupérer une quantité de 37 ml d'extrait brut soit un rendement de 74%, ce rendement en extrait brut est inférieur à celui obtenu par ZIKIOU, (2013) estimé à 86%.

En conclusion, les différences de rendement en matières premières végétales (latex de figuier et fleurs de cardon) dépendent généralement des caractéristiques des plantes d'origine.

I.2.2. Caractéristiques physicochimiques

L'extrait des fleurs de cardon obtenu, est une solution brunâtre, caractérisée par un pH égal à 5,59, d'un extrait sec total égal à 2 g/100g et d'une teneur en protéines de 2.88 mg/ml (tableau 8), cette teneur en protéine est proche de celle obtenue par SOUSA et MALCATA, (1998) estimée à 4,54mg/ml et inférieure à celles obtenue par ZIKIOU, (2013) et VERISSIMO *et al.*, (1996) Estimées à 26mg/ml et 7,33mg/ml respectivement. Elle est aussi inférieure à celle de *cynara scolymus* étudiée par NOUANI *et al.*, (2009) évaluée à 5,6mg/ml.

Tableau 8 : Caractéristiques physicochimiques de l'extrait des fleurs de cardon.

Caractéristique	Extrait de fleurs de cardon
PH	5.59
Extrait sec total	2%
Taux de protéines (mg/ml)	2.88 ± 0.169
Couleur	Brunâtre
Texture	Liquide

I.3. Activités enzymatiques des extraits

I.3.1. Activité coagulante

L'activité coagulante de l'extrait clarifié de la ficine est de 201,56 U.P (tableau 9). Dans une étude similaire sur un extrait enzymatique de la ficine de *Ficus carica* SIAR, (2014) a rapporté une activité coagulante de l'ordre de 121,09 U.P, DEVARAJ *et al.*, (2008b) ont estimé l'activité coagulante à 13,50 U.P pour l'extrait clarifié de *Ficus racemosa*, FADYLOGLU, (2001) a également rapporté une activité supérieure à celle que nous avons obtenue, estimée à 1500U.P.

Tableau 9 : Activités enzymatiques des enzymes extraites.

Activité enzymatique	L'extrait de fleurs de cardon	L'extrait de la ficine
Activité coagulante (UP)	1.25	201.56
Force coagulante (F)	1/278	1/46791.11
Activité spécifique (U/mg)	0.43	2.13

La force coagulante de l'extrait de la ficine est de 1/46791.11 ; en terme de quantité de lait coagulable, 1ml de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 46 litres de lait cette force est très proche de celles rapportés par SIAR, (2014) et NOUANI *et al.*. (2009) estimées à 1/42059,76 et 1/40000 respectivement.

L'extrait brut de fleurs de cardon est caractérisé par une activité coagulante de 1.25 U.P (tableau 9) ; une activité qui semble inférieure à celles rapportées par de nombreux auteurs dans des études similaires sur l'extrait brut de *Cynara cardunculus* ; ZIKIOU, (2013) a rapporté une activité de l'ordre de 3,23 UP et MARTINS *et al.* (1996), ont obtenu un extrait ait une activité de 47,64 UP/g de fleurs sèches.

La force coagulante de cet extrait est de 1/278, ce qui implique que 1ml de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 278 ml de lait, 5g de fleurs sèches peuvent coaguler 10,28 litre. En effet, selon ZIKIOU (2013), 10g de fleurs sèches peuvent coaguler environ 76,37 litres

de lait, selon ALAIS (1984), 10g de caillette de veau peut coaguler environ 830 litres, et selon ADOUI (2007), la même quantité de proventricules de poulet peut coaguler jusqu'à 125 litres de lait.

Nous remarquons que l'extrait brut de fleurs de cardon a une force coagulante trop faible par rapport à celle obtenue par ZIKIOU, (2013) pour un extrait de *Cynara cardunculus*, ainsi que pour les deux extraits d'origine animale. Cela est dû probablement au rendement de l'extraction en protéines où nous avons obtenu un extrait brut de cardon avec une concentration en protéines faible 2.88 mg/ml ce qui influence sur son activité enzymatique.

En comparant les deux extraits étudiés, nous remarquons que l'extrait clarifié de la ficine a une activité coagulante, une force coagulante et une activité spécifique (2.13 U/mg pour l'extrait de la ficine contre 0.43 U/mg pour l'extrait floral de cardon) élevée par rapport à l'extrait brut des fleurs de cardon.

En effet, si nous voulons optimiser le rendement d'extraction du système enzymatique des fleurs de cardon et avoir un extrait avec une activité élevée, il serait intéressant de tester d'autre protocole de macération tout en jouant sur les paramètres de la macération (temps, température, tampon et pH), nous pouvons également appliquer d'autres méthodes de conservation des fleurs fraîches du cardon dans le but d'optimiser la préservation du système enzymatique et prolonger sa durée de conservation.

I.3.2. Activité protéolytique

La mesure de cette activité est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines sous l'action enzymatique qui aboutit à la libération de peptides de faible poids moléculaire, et qui sont séparés des caséines non dégradées par addition d'acide trichloracétique (TCA) à 4%.

La mesure de l'absorption à 750nm permet d'apprécier la richesse en peptides du filtrat obtenu, celle-ci étant proportionnelle à l'activité protéolytique.

La figure 22 montre la quantité des produits d'hydrolyse libérés avec chacune des enzymes étudiées avec comparaison à celle de la pepsine porcine.

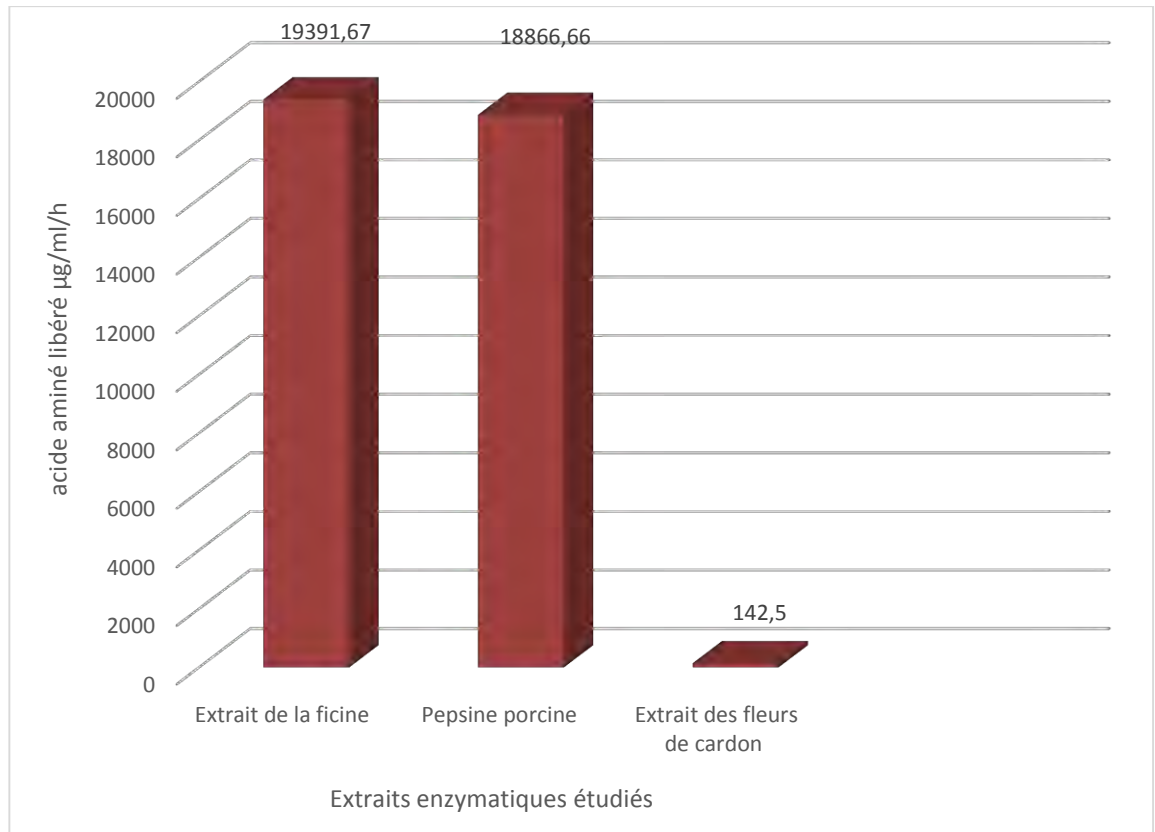


Figure 22 : Quantité des produits d'hydrolyse libérés par les extraits enzymatiques étudiés.

Pour cela, nous avons étudié l'activité protéolytique des extraits végétaux de la ficine et des fleurs de cardon par comparaison à la pepsine porcine par la méthode de Lenoir et Auberger (1977) modifiée par MECHAKRA et al. (1999). Les résultats ont montré que l'activité protéolytique de l'extrait de la ficine est très élevée et elle est proche de celle de la pepsine par contre celle de l'extrait de fleurs de cardon est très faible par rapport à ces derniers.

En effet, nous avons obtenu des valeurs de 19391,67 µg/ml/h pour l'extrait de la ficine contre 142,5 µg/ml/h pour l'extrait de fleurs de cardon et 18866,66 µg/ml pour la pepsine. Cette activité protéolytique excessive de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs. FADYLOGLU, (2001) l'a estimé à 19200 U/ml/h et SIAR, (2014) l'a estimé à 28182 µg/ml/h.

Concernant l'extrait floral de cardon qui possède une activité protéolytique d'environ 142,5 µg/ml/h, cette activité est trop faible par rapport à celle obtenus par ZIKIOU, (2013) évaluée à 1340,4µg/ml/h. En effet, plusieurs auteurs ont parlé d'une activité excessive de l'extrait floral comparé à celle de la présure. CORDEIRO *et al.* (1992) ont remarqué que l'extrait des fleurs de cardon a une activité protéolytique trois fois plus importante que celle de la présure. Le même résultat était constaté par MACEDO *et al.*, (1996). Quant à ROSEIRO *et*

al. (2003) et CLAVERIE *et* HERNANDEZ (2007) ont mentionné que l'activité protéolytique des extraits des fleurs du genre *Cynara* est environ le double de celle de la présure traditionnelle.

Ceci peut être expliqué par l'influence de la méthode de conservation des fleurs de cardon (lyophilisation) et d'extraction du système enzymatique qui semblent affecter les activités enzymatiques y compris l'activité coagulante et l'activité protéolytique.

I.4. Profils électrophorétiques

Une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée sur gel de polyacrylamide dénaturant, en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS). Elle permet la séparation rapide et sensible des fractions protéiques contenues dans chaque extrait enzymatique selon leur poids moléculaire.

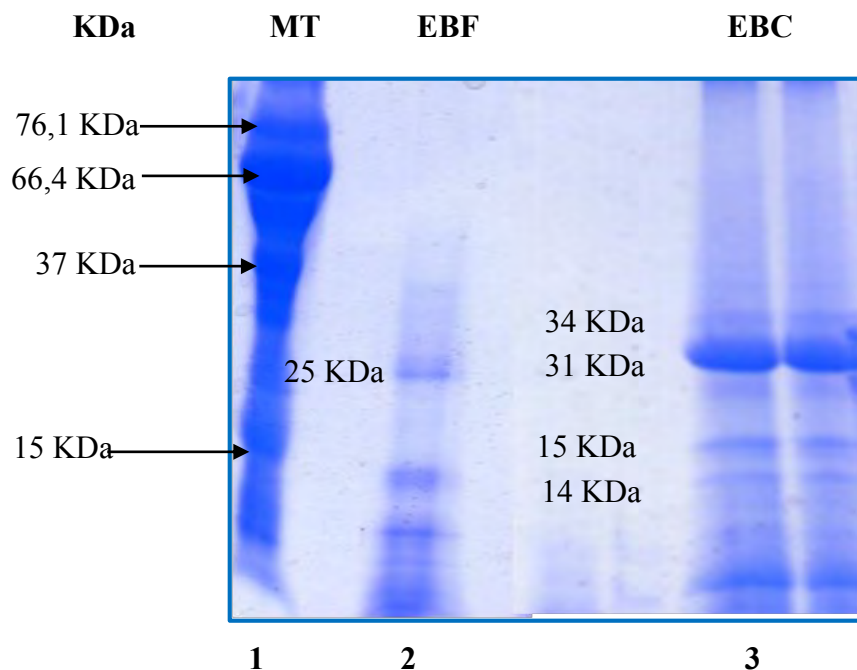


Figure 23 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des extraits enzymatiques (1 : MT : marqueurs de taille, 2 : EBF : extrait brut de la ficine et 3 : EBC : extrait brut de la cardosine).

Le profil électrophorétique de l'extrait de ficine (Figure 23) montre la présence de trois bandes, une de ces bandes protéiques a un poids moléculaire d'environ 25 KDa et qui pourrait être celle représentant la ficine dans l'extrait enzymatique, SIAR, (2014) a mentionné la présence de deux bandes ayant des poids moléculaires d'environ 23KDa et 24 KDa. En outre, Zare *et al.*,2013 ont purifié récemment une ficine homogène de *Ficus carica* cv. Sabz et qui se trouvait à partager un poids moléculaire de 23 kDa. DEVARAJ *et al.*, 2008b dans leur étude sur le latex de *Ficus racemosa* L. ont signalé la présence d'une seule bande protéique, la masse moléculaire apparente de l'enzyme purifiée estimée par SDS-PAGE est de $43\ 500 \pm 500$ Da.

Les autres bandes ayant un poids moléculaire inférieur à 15 kDa sont supposées être des impuretés ou des produits de dégradation de la ficine.

Dans le profil de l'extrait floral de cardon, nous remarquons la présence de quatre bandes ayant des poids moléculaires d'environ 34, 31, 15 et 14 kDa. Selon la littérature, les deux bandes ayant des poids de 31 et 15 kDa, représentent les deux fragments peptidiques de la cardosine A, les deux autres bandes, ayant des poids d'environ 34 et 14 kDa, elles représentent les deux fragments peptidiques de la cardosine B (VERISSIMO *et al.*, 1995). Les bandes protéiques ayant des poids moléculaires très faibles proches de 10kDa, pourraient être des impuretés.

II. Hydrolyse enzymatique de la caséine bovine

Les protéases hydrolysent les liaisons peptidiques, formant alors un mélange de peptides et d'acides aminés. La composition peptidique des mélanges varie selon la spécificité de la protéase utilisée et les conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse.

Différentes études ont été entreprises afin de réduire l'allergénicité des protéines laitières et spécialement des caséines par hydrolyse enzymatique afin de fragmenter ces protéines, ainsi que de couper les différents épitopes de ces allergènes.

Dans ce contexte, des cinétiques d'hydrolyse de la caséine bovine ont été effectuées en utilisant les deux extraits végétaux (extrait des fleurs de cardon et extrait de la ficine).

II.1. Hydrolyse par la ficine

II.1.1. Evolution du degré d'hydrolyse

La dégradation des caséines bovines par l'extrait de la ficine est réalisée à pH 7 (tampon phosphate 0,1M), à 37°C pendant 24 h dans un bain marie thermostaté pour deux ratios E/S : 1/100 et 1/1000. La cinétique de digestion est suivie par des prélèvements à différents temps (de 0 min à 24h) pour les analyses ultérieures. Pour chaque prélèvement, l'hydrolyse est arrêtée par chauffage de la partie aliquote prélevée à 90°C pendant 15min pour inactiver l'enzyme.

L'évolution du DH des caséines par l'extrait de la ficine a été suivie par la méthode OPA, le degré d'hydrolyse exprime le taux de liaisons peptidiques rompues par rapport au nombre total des liaisons. Le suivi de l'évolution du DH renseigne sur la vitesse avec laquelle l'enzyme dégrade le substrat.

La cinétique d'hydrolyse des caséines pour un ratio E/S= 1/100 montre un degré d'hydrolyse élevée à t_0 , après ajout de l'enzyme, de 3.24%, et après une heure d'hydrolyse le DH atteint 30.26%. A partir de la deuxième heure la vitesse d'hydrolyse devient faible et le DH

passé de 38.21% à 2h à 57.16% à 5h de temps. Le DH maximal atteint après 24 h de protéolyse dans les mêmes conditions est de 58.3%. Cette valeur est proche de celles obtenues par BOUGHELLOUT, (2014) après 4h d'hydrolyse évaluées à 58, 53 et 44% pour la chymotrypsine, la trypsine et la pepsine respectivement et cela pour un ratio enzyme substrat de 1%.

En ce qui concerne la cinétique d'hydrolyse pour le ratio 1/1000, le DH initial mesuré à t_0 est plus faible en le comparant avec celui de la cinétique précédente, il est de 2,4%, il atteint une valeur de 13,02% après une heure de protéolyse. Le degré d'hydrolyse maximal obtenu après 24h est de 32,91% avec une vitesse faible après 1h et jusqu'à 24h (figure 24). En outre, DI PIERRO *et al.*, (2014) ont trouvé que l'hydrolyse de caséinates de sodium (NaCN) par la ficine de *ficus carica*, était très rapide durant les premières minutes donnant d'abord un DH de 9%, ensuite il a augmenté pour atteindre progressivement un DH de 18% après 6 h d'incubation.

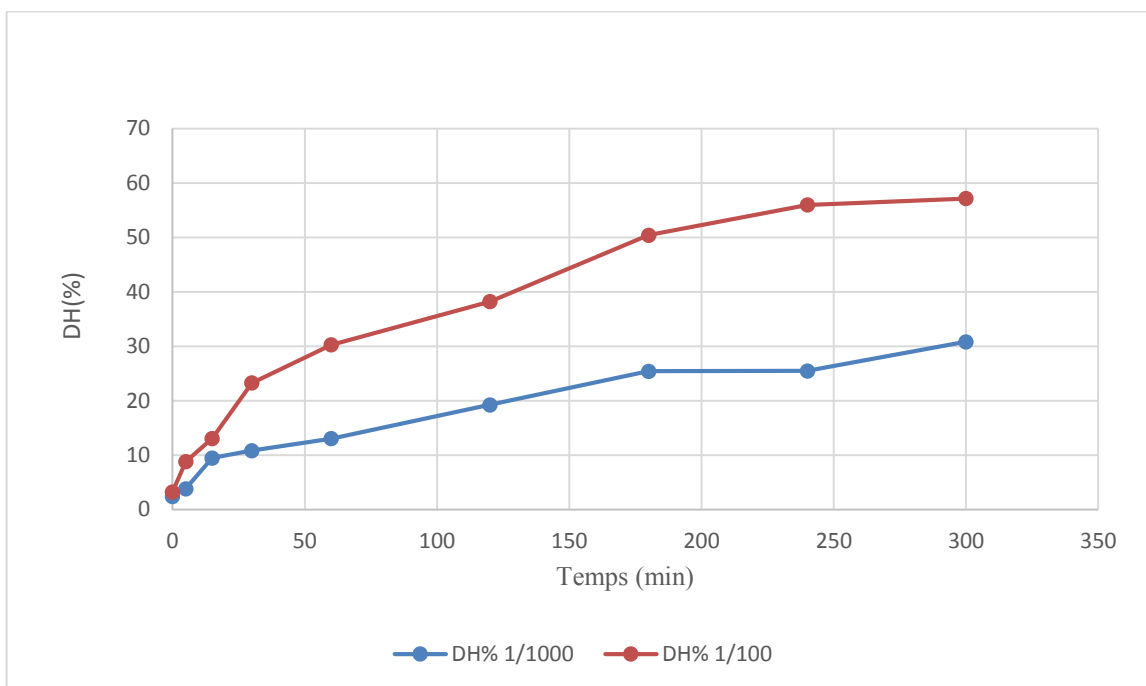


Figure 24 : Estimation du degré d'hydrolyse des caséines par l'extrait de la ficine (E/S : 1/100, 1/1000).

En comparant les deux cinétiques, nous remarquons que les valeurs de DH après 5h et 24h de temps sont très proches (30.83% à 5h et 32,91% après 24h pour un ratio de 1/1000 contre 57,16% à 5h et 58,3% pour un ratio de 1/100) et donc nous pouvons dire que l'hydrolyse par la

ficine est achevée avant 24 heures de réaction enzyme/substrat avec une vitesse de dégradation rapide au cours de la première heure d'hydrolyse.

II.1.2. Profil électrophorétique des hydrolysats

L'électrophorèse nous permet également d'évaluer qualitativement le degré d'hydrolyse des caséines, et d'identifier les fractions peptidiques qui en résultent.

Le profil électrophorétique pour la cinétique à un ratio E/S : 1/100 montre une vitesse d'hydrolyse rapide, on voit sur le profil (figure 25) la disparition des trois fractions caséiques (α -CN, β -CN, K-CN) et l'apparition de fragments peptidiques de faible poids moléculaire issus de leur hydrolyse. Ceci a été remarqué dès les premiers temps de l'hydrolyse et peut être expliqué par l'activité excessive de l'extrait de la ficine aussi par la quantité d'enzyme qui semble élevée par rapport à la quantité de substrat présente dans le mélange réactionnel. Après 24h de protéolyse aucun fragment peptidique n'est observé sur le profil électrophorétique (de PM > 10KDa).

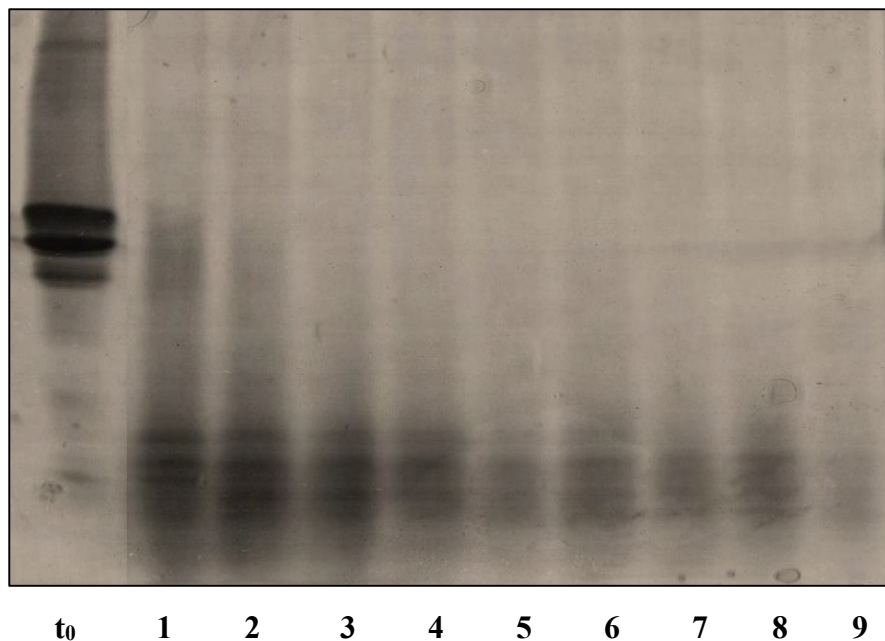


Figure 25 : Profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par la ficine : Profil A : E/S : 1/100 (t_0 : 0 min, 1 : 5min, 2 : 15 min, 3 : 30 min, 4 : 1h, 5 : 2h, 6 : 3h, 7 : 4 h, 8 : 5h, 9 : 24h)

Pour le ratio E/S : 1/1000, le profil électrophorétique (figure 26) montre une vitesse moins faible, à t_0 , les caséines (α -CN et β -CN) ont disparu complètement avec apparition de nouveaux fragments peptidiques de poids moléculaire inférieur à ceux des caséines, seule une fraction de la caséine k a résisté à l'hydrolyse par l'extrait de la ficine et cela jusqu'à 30min de protéolyse.

Des bandes correspondant aux peptides de faibles poids moléculaires ont persisté jusqu'à 24h d'hydrolyse.

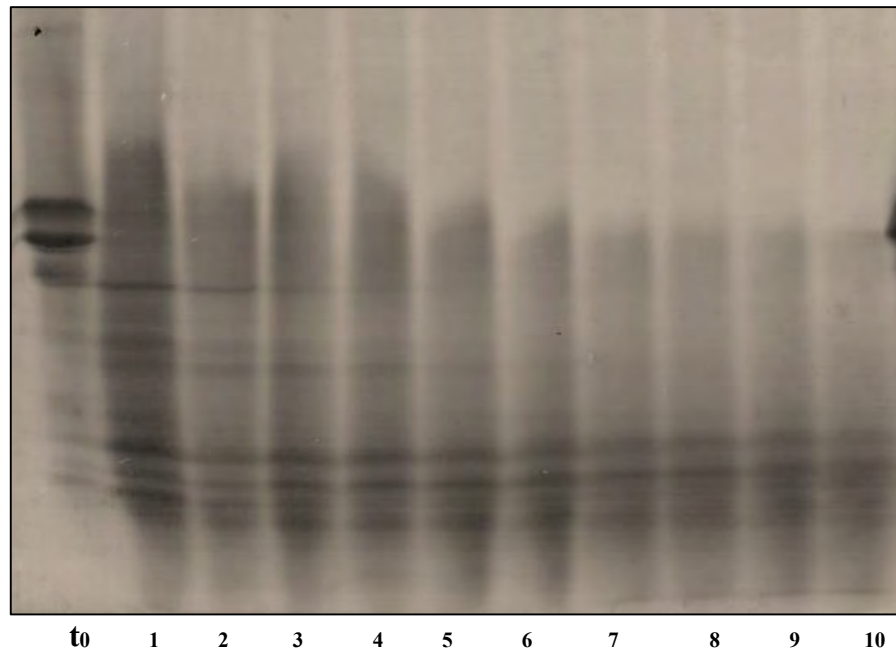


Figure 26 : Profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par la ficine, E/S : 1/1000, (t₀ : 0 min, 1 : 5min, 2 : 15 min, 3 : 30 min, 4 : 1h, 5 : 2h, 6 : 3h, 7 : 4 h, 8 : 5h, 9 : 6h, 10 :24h)

Très peu de références sont disponibles sur les aspects structuraux de la ficine jusqu'à ce jour par rapport à la papaïne, ainsi que d'autres protéases à cystéine connexes (DEVARAJ *et al.*, 2011). Selon Kumari *et al.*, (2012), les Protéinase de *F. carica* ont montré une spécificité large vers les acides aminés neutres et basiques, c'est-à-dire, Gln, Val, Leu, Ala, Arg, His, Ser et Asn. DI PIERRO *et al.*, (2014) ont montré que la ficine est une protéinase à cystéine avec une large spécificité qui hydrolyse les liaisons impliquant des acides aminés non chargés, aromatiques et / ou hydrophobes.

II.2.Hydrolyse par la cardosine

II.2.1.Evolution du degré d'hydrolyse

L'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de la cardosine a été effectuée à pH 5,4 (tampon acétate 0,1M), à 37°C et à 1/100 de rapport E/S. Une cinétique d'hydrolyse est réalisée en effectuant des prélèvements à des temps réguliers. Pour chaque prélèvement, l'hydrolyse est arrêtée par chauffage de la partie aliquote prélevée à 90°C pendant 15min pour inactiver l'enzyme.

Sous l'action de l'extrait de la cardosine, le DH passe de 0.45% à 0 min d'hydrolyse à 15.15% après 1h de réaction (figure 31), il est de 23.12 % après 6h d'hydrolyse. Le degré d'hydrolyse maximal obtenu après 24h est de 24.12 %, il est plus faible par rapport à celui de la ficine pour les deux ratios E/S 1/100 et 1/1000 évalués à 58.3 et 32.91 % respectivement.

Une autre cinétique a été réalisée à un ratio E/S : 1/50, le DH initial mesuré à t_0 est plus élevé en le comparant avec celui de la cinétique précédente, il est de 0.88%, il atteint une valeur de 18.94 % après 1h d'hydrolyse. Après 6h d'hydrolyse le DH est de 30.55%. Le degré d'hydrolyse maximal obtenu après 24h est de 32.42 %, cette valeur est très proche de celle obtenue par l'extrait de la ficine pour un ratio E/S : 1/1000. Cavalli *et al.*, 2008, ont trouvé qu'après 3h d'hydrolyse par la cardosine, un DH de 32% pour la β caséine et 55% pour l' α caséine.

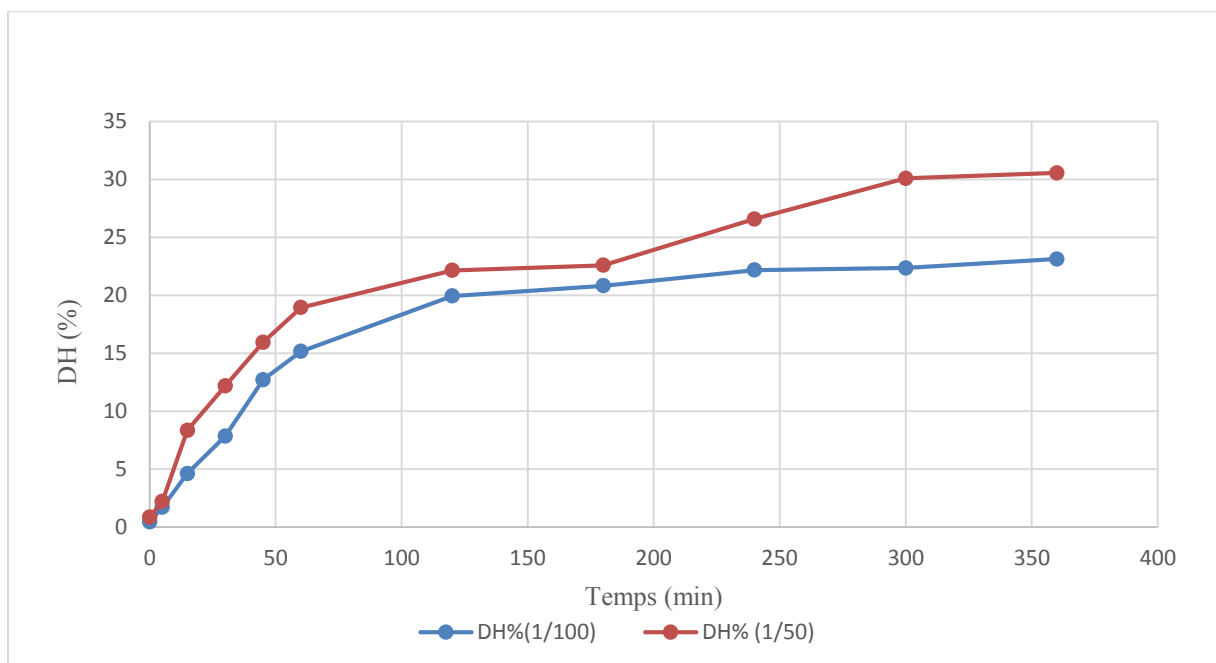
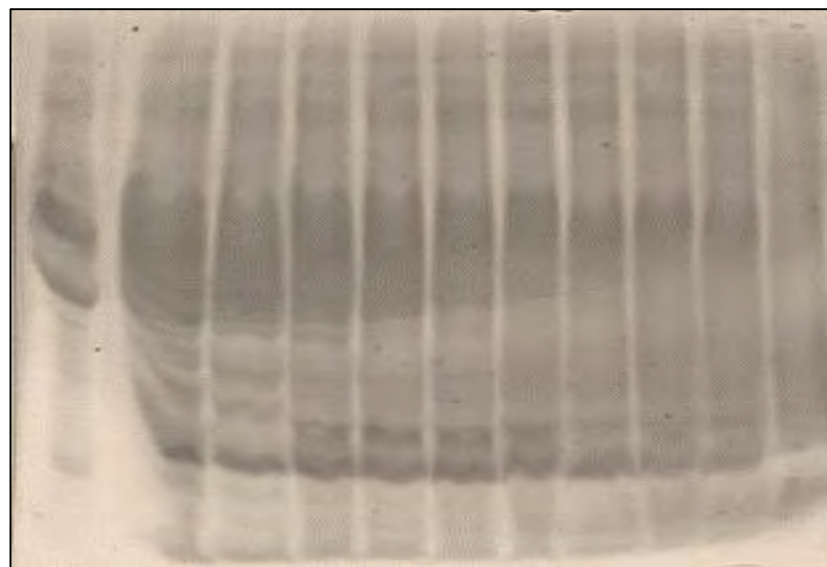


Figure 27 : Estimation du degré d'hydrolyse des caséines par l'extrait de cardon E/S : (1/100) et (1/50).

En comparant les deux cinétiques d'hydrolyse, nous pouvons dire que l'hydrolyse des caséines bovine par l'extrait de fleurs de cardon se traduit par un DH (%) faible durant les premières minutes de l'hydrolyse, ensuite, il augmente au fur et à mesure que l'hydrolyse progresse, avec une valeur maximale après 24h qui reste toujours faible par rapport à ceux notés pour l'hydrolyse avec l'extrait de la ficine.

II.2.2. Profil électrophorétique des hydrolysats

Les figures (28 et 29) montrent les profils électrophorétiques des protéolysats de la caséine bovine obtenus à différents intervalles de temps d'hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon. L'action de cet extrait se traduit par la dégradation des différentes fractions caséiniques donnant naissance à de nouveaux fragments peptidiques, on remarque que la caséine persiste à l'action des cardosines jusqu'à 6h d'incubation pour les deux rapports E/S : 1/100 et 1/50, après 24 h d'hydrolyse les bandes correspondant à notre substrat disparaissent complètement sur les deux profils.



t0 v 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figure 28 : profils électrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par l'extrait de cardon : E/S=1/100 (t₀ : 0 min, v : vide, 1 : 5 min, 2 : 15 min, 3 : 30 min, 4 : 45 min, 5 : 1 h, 6 : 2 h, 7 : 3 h, 8 : 4 h, 8 : 6 h, 9 : 24 h).

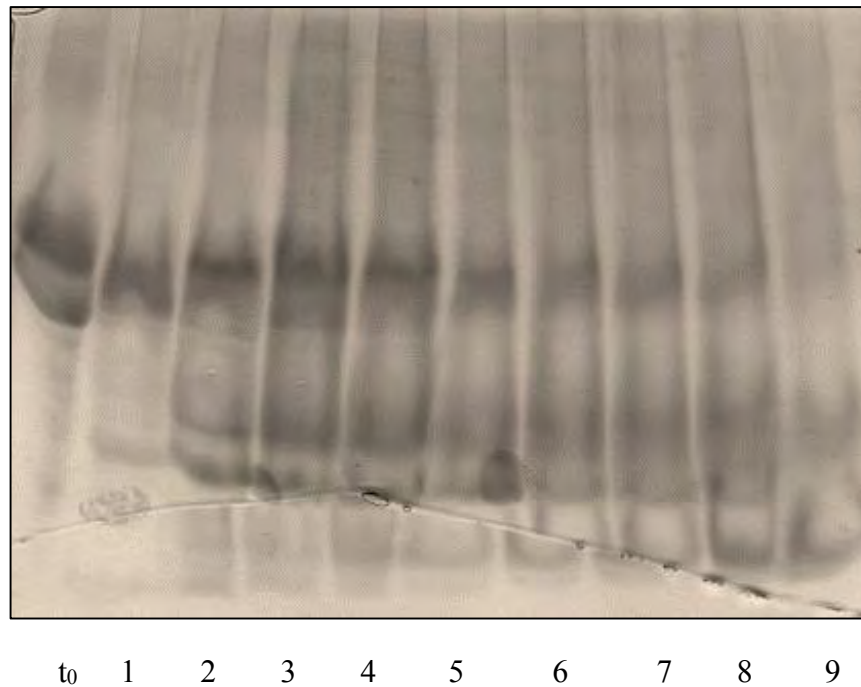


Figure 29 : profils éleetrophorétiques d'hydrolyse enzymatique par l'extrait de cardon : E/S=1/50 : (t_0 : 0 min, 1 : 5 min, 2 : 15 min, 3 : 30 min, 4 : 1 h, 5 : 2 h, 6 : 3 h, 7 : 4 h, 8 : 6 h, 9 : 24 h).

En comparant l'action des deux extraits enzymatiques étudiés sur les caséines bovines, en fonction de la vitesse de dégradation, nous pouvons constater que c'est l'extrait floral de cardon qui montre la vitesse d'hydrolyse la plus faible (persistance de fractions caséiniques jusqu'à 6h d'incubation). Alors que l'extrait de la ficine a montré une vitesse de dégradation très élevée (disparition complète des caséines au bout de 30 min d'hydrolyse). Alors qu'en fonction de la qualité de ces peptides issus de l'hydrolyse de la caséine bovine, nous pouvons supposé que l'hydrolyse par l'extrait de la ficine libère des peptides finaux dès les premiers temps d'hydrolyse et leur concentration augmente au fur et à mesure de la dégradation des fractions caséiniques. Contrairement à l'hydrolyse par l'extrait floral de cardon, il semble que ce dernier libère des peptides intermédiaire et qui donne naissance à leur tour à des peptides finaux donc il s'agit d'une dégradation progressive des fractions caséiniques et de leurs produits d'hydrolyse.

III. Evaluation de l'allergénicité des hydrolysats obtenus

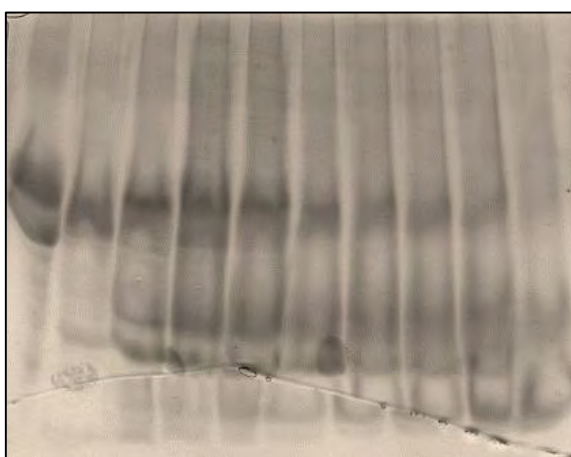
III.1. Profil immuno-éleetrophorétique par le western blot

Nous avons collecté dans cette partie de travail 11 sérums de patients atteints d'APLV confirmée par des tests cliniques dont 8 sérums retenus. Ces derniers ont servis d'anticorps

primaire afin d'évaluer l'allergénicité résiduelle des hydrolysats caséiniques après hydrolyse par les deux extraits enzymatiques (extrait floral de cardon et extrait clarifié de la ficine). Nous avons retenu deux cinétiques d'hydrolyse ; une correspondant à un rapport enzyme substrat de (1/50) pour l'extrait floral de cardon et une à (1/1000) pour l'extrait de la ficine.

L'évaluation de l'immunoréactivité des hydrolysats caséiniques a été effectuée par la technique Western blot ; une électrophorèse a été réalisée pour séparer les peptides à évaluer sur un gel de polyacrylamide, ensuite ces derniers sont transférés du gel de l'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose. Cette membrane servira de support à la révélation par les anticorps. Après révélation, la membrane est traitée par autoradiographie et le film résultant est interprété pour évaluer l'allergénicité résiduelle des échantillons caséiniques analysés.

Le profil immunoblot des caséines traitées par l'extrait de fleurs de cardon (E/S=1/50) montre des zones de spot dispersés sur le film réel ce qui n'est pas apparu après le scan (figure 30), ces zones peuvent être correspondantes aux fractions caséiniques et les peptides résultants de l'hydrolyse de ces dernières qui ont réagi avec les IgE humaines. BOUGHELLOUT, (2014) dans son étude sur les caséines traitées par une nouvelle technologie nommée « Détente instantanée contrôlée DIC » a indiqué que, l' α et β caséine ont montré une augmentation de l'immunoréactivité tandis que la fraction correspondante à la κ caséine n'a pas réagi. D'après les résultats obtenus et vu la mauvaise qualité des films autoradiographiques qu'on a obtenu, rien ne peut confirmer.



(A)



(B)

Figure 30 : Profils SDS-PAGE (A) et western blot (B) des caséines traitées par l'extrait de fleurs de cardon (E/S : 1/50).

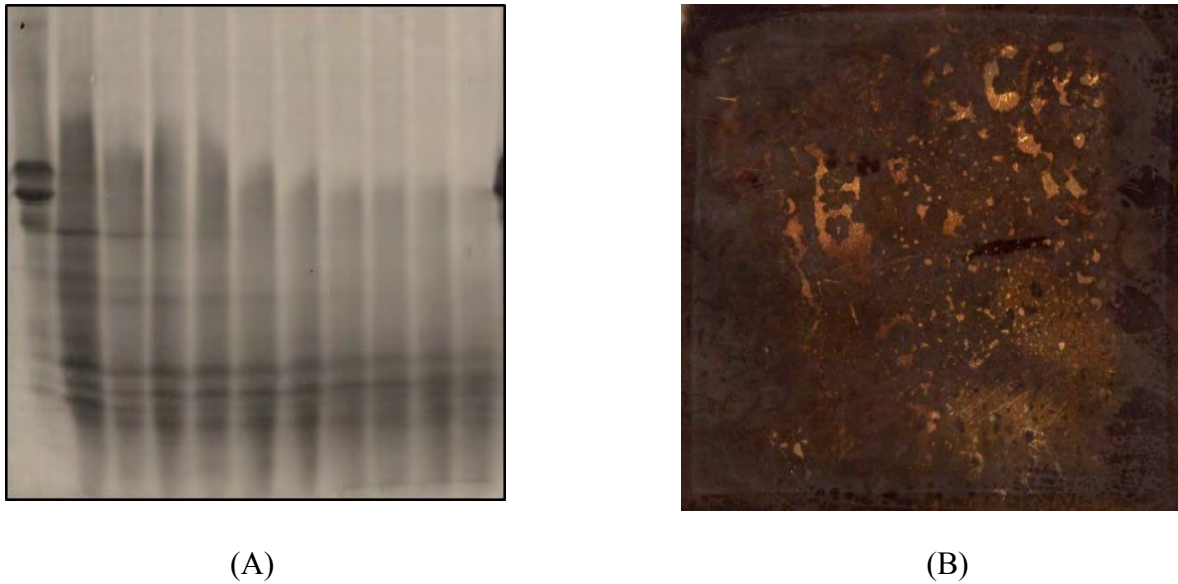


Figure 31 : Profils SDS-PAGE (A) et western blot (B) des caséines traités par l'extrait de la ficine (E/S : 1/1000).

Concernant le film autoradiographique correspond au profil immunoblot des caséines traités par l'extrait de la ficine (E/S=1/1000) (figure 29 B), il est de qualité mauvaise et nous ne permet pas de voir les zones de spot correspondantes aux protéines allergiques qui réagissent avec les IgE humains. Nous pouvons conclure que, ces films ne sont vraiment pas visibles ni interprétables et le test de l'immunoréactivité des hydrolysats caséiniques par les extraits enzymatiques mérite d'être poursuivi et confirmé dans des études ultérieures par d'autres méthodes d'évaluation de l'immunoréactivité citant comme exemple L'ELISA.

Selon les données disponibles sur la réduction de l'allergénicité des caséines et qui sont rapportés par la littérature, MAHMOUD *et al.*, (1992) ont observé que l'antigénicité des caséines a été rapidement et largement réduite dans la phase initiale de l'hydrolyse. PARK et ALLEN (2000) ont rapporté que la réduction de l'immunoréactivité des caséines est due essentiellement à la réduction de la masse moléculaire des hydrolysats et cela indépendamment du type d'enzyme utilisé. NAKAMURA *et al.*, (1993) ont constaté que la gamme de poids moléculaire qui réduit l'immunogénicité des caséines était de 1400 à 1500 Da. BOZA *et al.*, (1994) ont signalé que les hydrolysats de caséines débarrassés de peptides de poids moléculaires supérieurs à 2500 Da avaient une antigénicité considérablement réduite.

En outre, toutes les fractions caséiniques ont un caractère hydrophobe avec des degrés d'hydrophobicités différents (caséine α_1 , caséine α_2 , caséine β , caséine K ; 4.9, 4.64, 5.59, 5.12 (kJ mol⁻¹ / résidu) respectivement) ce qui constitue des sites de clivage préférentiel pour la ficine selon DI PIERRO *et al.*, (2014), qui ont montré que la ficine est une protéinase à cystéine

avec une large spécificité qui hydrolyse les liaisons impliquant des acides aminés non chargés, aromatiques et / ou hydrophobes. Selon Kumari *et al.*, (2012), les Protéinase de *F. carica* ont montré une large spécificité vers les acides aminés neutres et basiques, c'est-à-dire, Gln, Val, Leu, Ala, Arg, His, Ser et Asn.

Il a été affirmé que la cardosine A et la cardosine B sont similaires, en termes de spécificité et d'activité, à la chymosine et la pepsine, respectivement (PIRES *et al.*, 1994; FARO et PIRES, 1995). Les cardosines clivent la caséine au niveau des acides aminés aromatiques et hydrophobes.

En effet, la susceptibilité des caséines à l'hydrolyse est due essentiellement à leur plus grande flexibilité et leurs structures ouvertes à l'opposé des structures globulaires compactes difficilement accessibles par les protéases.

En comparant les sites de clivage théoriques des deux enzymes sur les différentes fractions caséiniques avec les épitopes identifiés des caséines (tableau 10) (CERECEDO *et al.*, 2008). Concernant la ficine, et en raison de sa large spécificité, théoriquement l'enzyme pourrait agir au niveau de la majorité des épitopes des différentes fractions caséiniques, le nombre de site de clivage diffère d'un épitope à un autre et cela selon sa composition en acides aminés et les possibilités de site de coupure par la ficine. Pour les cardosines, CAVALLI *et al.*, 2013, ont mentionné les spécificités d'action de la cardosine A et B sur les caséines bovines (tableau 3 dans la partie bibliographique), il paraît que les cardosines possèdent un nombre de sites de clivage des caséines bovines supposé faible. Egalement ils ne pourraient pas agir au niveau de certains épitopes citant l'exemple de κ caséine où les deux cardosines peuvent agir uniquement au niveau de l'épitope (95-127) par clivage de la liaison peptidique (Phe105-Met106).

Tableau 10 : Epitopes des fractions caséiniques.

Caséines	Epitope
α S1 caséine	17-37, 28-50, 83-102, 110-120 140-153, 160-194
α S2 caséine	1-32, 68-86, 85-100, 143-188 181-207
β caséine	26-74, 55-70, 83-92, 135-145 154-173, 185-208
κ caséine	9-44, 34-53, 47-88, 95-127, 137-166

En conclusion, d'une part et à partir des résultats de l'activité enzymatique élevée et les degrés d'hydrolyse élevés obtenus par l'extrait de la ficine, il semble que ce dernier pourrait réduire considérablement l'allergénicité des caséines bovines grâce à son activité enzymatique importante et le nombre de sites de clivage qui paraient plus élevé que celui des cardosines ce qui va probablement générer des peptides de faible poids moléculaire et avec une immunoréactivité réduite. D'autre part l'impact de ces deux extraits sur l'allergénicité des caséines bovine mérite d'être poursuivi et confirmé aussi que l'étude mérite d'être élargie sur d'autres protéines du lait tel que les protéines sériques et d'autres protéines alimentaires allergisantes.

Conclusion

et

Perspectives

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la modification du potentiel allergisant des caséines bovines et cela par hydrolyse par des enzymes d'origine végétale. Les enzymes utilisées sont : l'extrait brut des fleurs de cardon et l'extrait clarifié de la ficine.

Des cinétiques d'hydrolyses ont été réalisées à une concentration enzyme/substrat de 1/100 et 1/1000 pour l'hydrolyse par l'extrait de la ficine alors que pour l'hydrolyse par l'extrait floral de cardon les ratios E/S sont de 1/50 et 1/100. L'hydrolyse a été effectuée au pH optimum de chaque extrait enzymatique soit à pH 7 pour l'hydrolyse par la ficine, et 5.4 pour l'hydrolyse par l'extrait floral de cardon à une température de 37°C.

L'extrait des fleurs de cardon ; se caractérise par un pH égal à 5.59, d'un extrait sec total égal à 2 g/100g et d'une teneur en protéines de 2.88 mg/ml, alors que l'extrait de la ficine montre un pH égal à 5.49, un extrait sec total égal à 19 g/100g, et une teneur en protéines de 94.44 mg/ml. En termes d'activités enzymatiques, l'extrait clarifié de la ficine possède une activité coagulante de 201.56 U.P, et une activité protéolytique de 19391.67 µg/ml/h, l'extrait floral de cardon présente une activité coagulante de l'ordre de 1.25 U.P et une activité protéolytique de 142.5 µg/ml/h, et qui sont jugées trop faible par rapport à celles de l'extrait de la ficine.

L'évolution de l'hydrolyse de la caséine par les extraits étudiés a été suivie par détermination du degré d'hydrolyse (DH) par la méthode OPA. L'hydrolyse par la ficine a montré une vitesse très élevée avec disparition complète du substrat au bout de 30 min d'incubation, le DH maximal obtenu après 24h de réaction concernant les rapports enzyme E/S (1/100 et 1000) est de 58.3 % et 32.91% respectivement. Tandis que pour l'extrait floral de cardon, le DH atteint après 24h pour les deux ratios E/S (1/50 et 1/100) est de 32.42 % et 24.12 % respectivement.

Les profils électrophorétiques des deux enzymes étudiées montre une vitesse d'hydrolyse faible (persistance de fractions caséiniques jusqu'à 6h d'incubation) pour l'extrait floral de cardon. Alors que pour l'extrait de la ficine le profil a montré une vitesse de dégradation très élevée (disparition complète des caséines au bout de 30min d'hydrolyse).

Les résultats de l'évaluation de l'immunoréactivité de protéolysats caséiniques par la technique du western blot ont donné des profils immunoblots qui ne sont pas vraiment visibles ni interprétables et ce qui apparaît sur un des films autoradiographiques n'est pas suffisant pour confirmer la réaction hydrolysats caséiniques-anti IgE humaine, ceci nous permet de dire que cette partie du travail mérite d'être poursuivie et complétée dans des études ultérieures.

A partir de nos résultats obtenus dans les deux parties du travail, plusieurs études méritent d'être poursuivies pour compléter ce modeste travail et parmi ces études intéressantes nous pouvons citer et proposer les points suivants :

- L'optimisation de l'extraction des enzymes étudiés afin d'améliorer les rendements d'extraction et avoir aussi des extraits avec des activités plus importantes.
- La purification de ces derniers par des méthodes chromatographiques dans le but d'éliminer les impuretés et mieux caractériser les enzymes et également pour pouvoir contrôler la cinétique d'hydrolyse.
- L'utilisation des extraits dans la fabrication des fromages et d'autres fins industrielles
- La caractérisation des hydrolysats par des méthodes chromatographiques afin de mieux étudier et préciser l'action des enzymes étudiés sur les caséines bovines.
- Etudier l'immunoréactivité des hydrolysats par d'autres méthodes citant comme exemple l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Références

bibliographiques

A

ADLER-NISSEN J., (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers. 110-169.

ANONYME, (1993). Recueil de normes françaises AFNOR-DGCCRF. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Lait et produits laitiers, Analyse physicochimiques, 4^{ème} édition, 561p.

ANONYME, (2010).

http://www.inra.fr/inra_cepia/editions/recherches_et_innovations/allergie.

AQUILANTI L., BABINI V., SANTARELLI S., OSIMANI A., PETRUZZELLI A., CLEMENTI F., (2011). Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. Letters in Applied Microbiology, 52, 651–659.

AZARKAN M., MATAGN A., WATTIEZ R., BOLLE L., VANDENAMEELE J., BAEYENS-Volant D., (2011). Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso) forms from *Ficus carica* latex. Phytochemistry 72, 1718–1731.

B

BEAUDOUIN E., RENAUDIN J.M., MORISSET M., CODREANU F., KANNY G., MONERET-VAUTRIN DA., (2006). Food-dependent exercise-induced anaphylaxis-update and current data. Eur Ann Allergy Clin Immunol, 2006; 38: 45–5.

BENGANA M. (2001). Caractérisation des enzymes protéolytiques (pepsine/chymosine) isolées de caillettes de bovins adultes. Mémoire de Magister, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger.

BERNARD H., CREMINON C., YVON M., WAL J.M., (1998). Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. Int Arch Allergy Immunol 115, 235-244.

BELMESSIKH A., (2011). Optimisation de la production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* sur milieu à base de déchets de tomates. Comparaison entre milieu solide et milieu liquide. Mémoire de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine.

BOLLER T., (1986). Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In : Dalling, M. J. (Ed.), *Plant Proteolytic Enzymes*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 67–96.

BONNIER G., (1927). Flore complète de France, Suisse et Belgique. *Ed.* E.Orlhac, Paris, 675p.

BOUGHELLOUT H., ZIDOUNE M.N., (2010). Prévalence de l'allergie aux protéines au lait de vache dans la région d'Annaba. *Archives de Pédiatrie* ; 17 (6) : 86–87.

BOURDIER J.F. et LUQUET F.M. (1981). Dictionnaire Laitier. Tec. Doc. Lavoisier, Paris. In : **SIBOUKEUR O., (2005).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique El-Harrach-Alger.

BOZA JJ., JIMENEZ J., MARTINEZ O., SUAREZ D., GIRL A. (1994). Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates in rats and pigs. *J. Nutr.* 1994; 124: 1978-1996.

BRADFORD M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding, *Analyt Biochem.* Vol : 72. P 248-254.

BRAHIM C., (2010). Etude de l'antigénicité et de l'allergénicité d'une formule lactée Commerciale extensivement hydrolysée. Université d'Oran, Algérie ; 112P.

C

CAMPOS R., (1990). Chemical characterization of proteinases extracted from wild thistle *Cynara cardunculus* L. *food chemistry*, 35, 89-97.

CAVALLI S V., SILVA C., CIMINO C., MALCATA FX., PRIOLO N (2008). Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers, *Food Chemistry*, 106, pp 997- 1003.

CAVALLI S V., LUFRANO D., COLOMBO M L., PRIOLO N., (2013). Properties and applications of phytepsins from thistle flowers. *Phytochemistry* 92 (2013) 16–32.

CAYOT et LORIENT., (1998). Structures et techno-fonctions des protéines du lait. Tec & Doc Lavoisier, Paris ; 363 p7.

CERECEDO I., ZAMORA J., SHREFFLER W.G., LIN L., BARDINA L., DIEGUEZ M.C., WANG J., MURIEL A., DEL HOZ B., AND SAMPSON H.A., (2008). Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray-based immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 22:589-94.

CHABANON G., (2005). Hydrolyses enzymatiques d'isolats protéiques issus de tourteaux de colza : cinétique, modélisation, caractérisation et fonctionnalité des peptides. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Lorraine. Discipline : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires.

CHRISTEN C., VIRASORO E., (1935). Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le lait*, 144-145, 354-363.

CLAVERIE-MARTÍN F., HERNÁNDEZ M. C., (2007). Aspartic proteases used in cheese making *in* POLAINA J. et MACCABE A.P., *industrial enzymes*, pp: 207-219.

CORDEIRO M.C., JAKOB E., PUHAN Z., PAIS M.S., BRODELIUS P.E., (1992). Milk clotting and proteolytic activities of purified cynarases from *Cynara cardunculus*-a comparison to chymosin. *Milchwissenschaft* 47, 683-687.

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, 645-653.

D

DALGLEISH DG et CORREDIG M, (2012). The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annu.Rev.Food Sci. Technol*; 3: 449-467.

DAVIS PJ ., WILLIAMS SC., (1998). Protein modification by thermal processing. *Allergy*; 53: 102-5

DARWIN C., (1845). *The voyage of H.M.S. Beagle*. 2nd Ed. London: Murray.

DEBRY G., (2001). *Lait, Nutrition et santé*. . Jean-Pierre Poulin « Représentation sociales du lait ». Ed : Tec et Doc. Paris. Lavoisier., 498p.

DENIS M., LORAS-DUCLAUX I., LACHAUX A., (2012). Sensibilisation et allergie aux protéines du lait de vache chez l'enfant allaité. *Archives de Pédiatrie* ; 19:305-312.

DEVARAJ K.B., GOWDA LALITHA R. et PRAKASH V., (2008b). An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.) *Phytochemistry* 69: 647–655.

DEVARAJ K.B., RAMESH KUMAR P., PRAKASH V., (2009). Characterization of acid-induced molten globule like folding intermediate state of ficin. *Int J Biol Macromol*; 45:248–54.

DEVARAJ K.B., PARIGI RAMESH KUMAR, PRAKASH V., (2011). Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry* 46. 458–464.

DI PIERRO G., O'KEEFE M.B., POYARKOV A., LOMOLINO G, FITZGERALD R.J., (2014). Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica* L.-derived proteinase. *Food Chemistry* 156 (2014) 305–311.

DUTAU G., (2003). Epidémiologie de l'allergie alimentaire. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 2003 ; 43 : 501 – 506.

DUMOND P., MORISSET M., SERGEANT P., et al (2006). Allergie alimentaire au lait de vache ou intolérance au lactose ? *J Pediatr Puericul*, 2006; 19:256–60.

DOCENA G, ROZENFELD P, FERNANDEZ R, FOSSATI CA, (2002). Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow' s milk substitutes by in vitro tests. *Allergy*, 2002; 57:83-91.

DURAND P., (1982). Etude de la fraction azotée soluble de l'anchois salé au cours de la maturation. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 45 (4): 271-281.

E

EIWEGGER T., RIGBY N., MONDOULET L., BERNARD H., KRAUTH M-T., BOEHM A., DEHLINK E., VALENT P., WAL J.M., MILLS E.N., SZEPEFALUSI Z., (2006). Gastro-duodenal digestion products of the major allergen Ara h1 retain an allergenic potential. *Clinical and Experimental Allergy*, 36:1281–8.

EL MECHERFI K, (2011). Évaluation de l'immunoréactivité et de l'allergénicité des lactoprotéines bovines après hydrolyse enzymatique combinée à un traitement micro-ondes.

Intérêt des biopuces à allergènes dans la multi-détection des réponses IgE spécifiques chez des enfants poly sensibilisés aux protéines du lait de vache. Thèse de doctorat, Université d'ORAN.

F

FADYLOGLU S., (2001). Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/Food* 45 No. 2, pp. 143– 146.

FARO, C. J., VERISSIMO, P. C., LIN, Y., TANG, J., & PIRES, E. V., (1995). In K.Takahashi (Ed.), *Aspartic proteinases: Structure, function, biology and biomedical implications* (pp. 373–377). New York: Plenum Press.

FARRELL JR. H.M., JIMENEZ-FLORES R., BLECK G. T., BROWN E. M., BUTLER J. E., CREAMER L. K., HICKS C. L., HOLLAR C. M., NG-KWAI-HANG K. F., AND SWAISGOOD H. E., (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of Dairy Science.*, 87:1641–1674.

FEIJOO-SIOTA L. et VILLA T. G., (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* 4: 1066–1088.

FERNÁNDEZ-GARCÍA E., IMHOF M., SCHLICHTHERLE-CERNY H., BOSSET J.O., NUÑEZ M., (2008). Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant. *International Dairy Journal*, 18, 147-157.

FIOCCHI A., SCHUNEMANN H., BROZEK J., RESTANI P., BEYER K., TRONCONE R., MARTELLI A., TERRACCIANO L., BAHNA S.L., RANCE F., EBISAWA M., HEINE R.G., ASSA'AD A., SAMPSON H., VERDUCI E., BOUYGUE G.R., BAENA-CAGNANI C., CANONICA W., LOCKEY R.F.,(2010). Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA): a summary report. *J Allergy and Clinical Immunology*, 126:1119–28.

FRENI K., TAVARIA M., JOSÉÂ SOUSA F., XAVIER MALCATA., (2010). Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* on the degradation of ovine and caprine caseins. *Food Chemistry* 72 : 79-88.

G

GENIN N., RENÉ F., et CORRIEU G., 1996. A method for on-line détermination of residual water content and sublimation end-point during freeze-drying (Une méthode de détermination en ligne de la teneur en eau résiduelle et de l'instant de fin de sublimation pendant la lyophilisation), *Chemical Engineering and Processing*, 35, pp : 255-263.

GOUSSEN H., LEROY JF. et OZENDA P., (1982). Précis de botanique, tome II : végétaux supérieure. Masson: pp 558-560.

GRISVARD P., CHAUDUN V., (1964). Le bon jardinier 2, encyclopédie horticole, la maison rustique, Paris, 1667p.

GRZONKA ZBIGNIEW, KASPRZYKOWSKI FRANCISZE K and WICZK WIESŁAW., (2007). Cysteine proteases. CHAPTER 11. *J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), Industrial Enzymes*, 181–195.

H

HEINZMANN A., BLATTMANN S., SPUERGIN P., FORSTER J., DEICHMANN K.A., (1999). The Recognition Pattern of Sequential B Cell Epitopes of Beta-Lactoglobulin Does Not Vary with the Clinical Manifestations of Cow's Milk Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 120 (4) : 280-286

HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERSTSEN R., BRODELIUS P., DA SILVA FUGUEIREDO A.C., PAIS M.S.S., (1990). Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1405.

HILL DJ, FIRER M.A., SHELTON M.J, HOSKING C.S., (1986). Manifestations of milk allergy in infancy: clinical and immunologic findings, *J. Pediatr.* 109 (1986) 270-276.

HOCHWALLNER H., SCHULMEISTER U., SWOBODA I., FOCKE-TEJKL M., CIVAJ V., BALIC N., NYSTRAND M., HARLIN A., THALHAMER J., SCHEIBLHOFER S., KELLER W., PAVKOV T., ZAFRED D., NIGGEMANN B., QUIRCE S., MARI A., PAULI G., EBNER C., PAPAPOPOULOS N.G, HERZ U., VAN TOL E.A.F., VALENTA R. AND SPITZAUER S., (2010). Visualization of clustered IgE epitopes on α -lactalbumin. *Journal Allergy and Clinical Immunology*, June ; Vol 125, Issue 6 : 1279-1285.e9.

HOST A., (1994). Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol ; (Suppl 5):5-36.*

HOST A., (1997). Cow's milk allergy. *J R Soc Med; 90(Suppl. 30):34-9.2.*

HOST A., HALKEN S., JACOBSEN HP., CHRISTENSEN AE., HERSKIND AM., PLESNER K., (2002). Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood *Pediatr Allergy Immunol; 13(Suppl 15):23-8.*

J

JAFFUEL D., DEMOLY P., BOUSQUET J., (2001). Les allergies alimentaires. *Revue Française Allergol Immunol Clin 2001 ; 41 : 169-86.*

JANDER E.A., MACHADO K.C., (2008). Evolutionary ecology of figs and their associates: Recent progress and outstanding puzzles. *Ann. Rev. Evol. Syst. ; 39:439-458.*

JARLOT S., HOSOTTE M., DANO D, KANNY G., (2013). Allergie alimentaire. *EMC - Traité de Médecine Akos 2013 ; 8(4) :1-6.*

JÄRVINEN K.-M., BEYER K., VILA L., CHATCHATEE P., BUSSE P.J., AND SAMPSON H.A., (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology ; 110:293-7.*

JÄRVINEN K.M., CHATCHATEE P., BARDINA L., BEYER K., SAMPSON H., (2001). IgE and IgG Binding Epitopes on [alpha]-Lactalbumin and [beta]-Lactoglobulin in cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology ; Oct 2001 ; 126, 2 ; Research Library : 111.*

K

KAJOSAARI M., (1982). Food allergy in Finnish children aged 1 to 6 years. *Acta Paediatr. Scand., 71, 815-819.*

KANNY G., (2001). Food allergy. *Allerg Immunol ; 8:351-6.*

KANNY G., MONERET-VAUTRIN D., FLABBEE J., BEAUDOUIN E., MORISSET M., THEVENIN F., (2002). Population study of food allergy in France. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2001 ; 108(1) : 133-140.*

KATSAROS G.I., KATAPODIS P., TAOUKIS P.S., (2009). High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering* 91 42–48.

KELLY M., (2000). *Cynara cardunculus*. In : Bossard CC, Randall JM, Hoshorsky MC, editors. *Invasive plants of California wildlands*. Berkeley : University of California Press.

KHALDI S., SONNANTE G., EL GAZZAH M., (2012). Analyse moléculaire de la diversité génétique du cardon (*Cynara cardunculus* L.) en tunisie. *C. R. Biologies* 335 (2012) 389–397.

KIM, J. S., KIM, Y. O., RYU, H. J., KWAK, Y. S., LEE, J. Y., KANG, H., (2003). Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol.*, 44: 412–419.

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

L

LAMAS E.M., BARROS R.M., BALCÃO V.M., MALCATA F.X., (2001). Hydrolysis of whey proteins by proteases extracted from *Cynara cardunculus* and immobilized onto highly activated supports. *Enzyme Microb Technol.*, 28, pp : 642-652.

LANSKY, E. P., PAAVILAINEN, H. M., PAWLUS, A. D., NEWMAN, R. A., (2008). *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *J. Ethnopharmacol.*, 119 : 195–213.

LATRECHE., (2009). *Biologie et Physiologie Animales. L’approche diagnostic de l’allergie alimentaire dans l’Est algérien*. Université Mentouri Constantine, Algérie ; 94P.

LAUMONNIER R., (1960). *Culture fruitière méditerranéenne*. Paris, Jablière et Fils ; pp : 161-183.

LIASET B., LIED E., ESPE M., (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry ; chemical characterization and nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* ; 80: 581-589.

LIFRANI A., (2006). *Etude du risque allergique à différentes protéines alimentaires : Mise au point de modèle de souris allergiques à l’arachide, à l’albumine à la caséine et à la colle de poisson*. L’Institut National Agronomique, Paris-Grignon ; 123 P.

LUFRANO, D., FARO, R., CASTANHEIRA, P., PARISI, G., VERISSIMO, P., VAIRO-CAVALLI, S., SIMÕES, I., FARO, C., (2012). Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry* 81, 7–18.

M

MACEDO I.Q., FARO C.J., PIRES E.M., (1996). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1537–1540.

MADSEN., (1997). Prevalence of food allergy / intolerance in European Environment *Toxicology and Pharmacology* ; 4: 163-7.

MAHMOUD MI., MLONE WT., CORDLE CT (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Technology*, 48, 89-95.

MAIRESSE., (2002). Allergie alimentaire et protéines animales. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* ; 42 : 299 - 306.

MARTINE P., (2008). Contribution au développement d'un microsystème pour la séparation bidimensionnelle de protéines par électrophorèse. Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre. Université Paris VI – Pierre et Marie Curie ; 226 P

MARTINS A.P.L., VASCONCELOS M.M.P., SOUSA R.B., (1996). Thistle (*Cynara cardunculus* L.) flower as a coagulant agent for cheesemaking. Short characterization. *Le Lait*, 76, 473–477.

MAURI N., (1952). Les figuiers cultivés en Algérie. Documents et renseignements agricoles, bulletin n°105, Alger.57P.

MAWA S., HUSAIN K., et JANTAN I., (2013). *Ficus carica*L. (Moraceae): Phytochemistry, Traditional Uses and Biological Activities. Hindawi Publishing Corporation. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2013, Article ID 974256, 8 pages.

MEULENAER DE., (2006). Les allergènes alimentaires : “to be or not to be” – aspects technologiques liés aux propriétés allergéniques et à la détection. Symposium “Les allergies – maladies du future ?” Institut Danone, 2006.

MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F., LENOIR J., (1999). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, 19 ; 663–675.

MORALI A., (2004). Allergie aux protéines du lait de vache en pédiatrie. *Revue Française des Laboratoires*.47-55.

MONDOULET L., (2005). Microbiologie et Biocatalyse Industrielles : Diversité de la réponse IgE dans l'allergie à l'arachide : Caractérisation des allergènes et devenir de leur potentiel allergénique lors des traitements thermiques et des processus digestifs. Institut national des sciences appliquées INSA, Toulouse ; 249 P.

MONERET-VAUTRIN D.A., KANNY G., BEAUDOUIN E., MORISSET M., (2000). Méthodologie des tests de provocation orale standardisés double insu pour le diagnostic de l'allergie alimentaire. *Rev Fr Allergo*12000 : 40 : 237-50.

MORISSET M., RICHARD C., ASTIER C., JACQUENET S., CROIZIER A., BEAUDOUIN E., et al. (2012). Anaphylaxis to pork kidney is related to IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *Allergy*; 67: 699–704.

MORISSET M., (2008). Biogénèse et Structure/Fonction. Evaluation de l'allergénicité des aliments application au diagnostic de l'allergie alimentaire. Ecole doctorale biologie, santé, environnement. UNIVERSITE DE NANCY HENRI POINCARÉ I ; 145P.

N

NAKAMURA T, SYNUKUNOBE Y, SAKURAT T, IDOTA T (1993). Enzymatic production of hypoallergenic peptides from casein. *Milchwissenschaft* 1993; 48: 11-14.

NEMNI A; GRIMFELD A; JUST J; (2006). L'allergie alimentaire chez l'enfant. *Décision thérapeutique en médecine générale* ; 31 : 2 – 7.

NICOTRA G., VICENTINI S. et MAZZOLARI A., (2010). *Ficus carica*. Research and development of a dry extract. *Nutra Foods*. 9: 27-30.

NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE T 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. *J. Food Technol.*, 7(1), 20-29.

O

OLIVEIRA ANDREIA P., SILVA LUI'S R., FERRERES FEDERICO., PINHO PAULAGUEDES D.E., VALENTA PATRICIA O., BRANCA M. SILVA, JOSÉ A. PEREIRA, and ANDRADE PAULA B., (2010). Chemical Assessment and in Vitro Antioxidant Capacity of Ficuscarica Latex. *J. Agric. Food Chem.* 58: 3393–3398.

P

PARK O K., ALLEN J C., (2000). Antigenicity of casein phosphopeptides prepared with immobilized glutamic acid-specific endopeptidase or trypsin. *Nutrition Research* Volume 20, Issue 3, March 2000, Pages 3596-370

PAYNE T. C., (2009). Enzymes in Meat Systems Enzymes. Chapter 8. R. Tarté (ed.), *Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications.* 26p.

PENAS E., SNEL H., FLORIS R., PRESTAMO G., & GOMEZ R., (2006). High pressure can reduce the antigenicity of bovine whey hydrolysates. *International Dairy Journal*, 2006; 16, 969–975.

PESQUET E., (2012). Plant proteases-from detection to function. *Physiol. Plant.* 145, 1–4.

PIMENTEL C., VAN DER STRAETEN D., PIRES E., FARO C., RODRIGUES-POUSADA C., (2007). Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS J.* 274, 2523–2539.

PORTIS E, ACQUADRO A, COMINO C, MAUROMICALE G, SABA E, LANTERI S, (2005). Genetic structure of island populations of wild cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris* [Lamk] Fiori) detected by AFLPs and SSRs, *Plant Sci.* 169 199–210.

Q

QUEZEL P., SANTA S., (1963). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II. *Ed.* Centre national de la recherche scientifique, Paris, 1170p.

R

RAJ J.S., BABY J., (2011). Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn –An overview. *Inter. J. of Pharm. Tech. Research;* 3 (1): 08-12.

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, 204–212.

RANCE F., (2008). Food allergy in children suffering from atopic eczema. *Pediatr Allergy Immunol* ; 19:279-84.

RANCE F., DESCHILDRE A., (2006). Test de provocation par voie orale aux aliments chez l'enfant. Quand, pour qui et comment ? Introduction, définitions, lexique. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* ; 46 : 604 – 609.

RANCE F., DUTAU G., (2009). Actualités sur l'exploration et la prise en charge de l'allergie aux protéines du lait de vache (APLV). *Revue française d'allergologie* 49 ; S28–S33.

RANCE F., KANNY G., DUTAU G., MONERET-VAUTRIN D.A., (1999). Food hypersensitivity in children : clinical aspects and distribution of allergens. *Pediatr Allergy Immunol* ; 10:33-8.

RANCE F., (2004). L'allergie aux protéines du lait de vache : facteurs prédictifs de tolérance. *Pédiatrie Pratique* ; 156:1-5.

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S., DESHPANDE V.V., (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62 ; 597–635.

REBOUR, H., 1968 : Fruit méditerranéens autre que les agrumes. Ed. La maison rustique : pp : 190-206.

RENÉ F., GENIN N., et CORRIEU G., (1993). Procédé et dispositif de contrôle de la lyophilisation sous vide. Brevet Français no 94 0539, et Brevet Européen 959118658.6.

ROITT I., RABSON A., (2002). Immunologie médicale : l'essentiel, édition. Paris Maloine ; p184-185.

ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J., 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, 76-85.

ROTTENBERG A., (2014). The wild gene pool of globe artichoke. *Israel Journal of Plant Sciences*.

S

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. *J. Biosci. Bioeng.* 105, 305–312.

SAMPSON H., MENDELSON L., ROSEN J., (1992). Fatal and near-fatal anaphylactic reactions to food in children and adolescents. *N Engl J Med* ; 327 : 380-4.

SARMENTO A.C., LOPES H., OLIVEIRA C.S., VITORINO R., SAMYN B., SERGEANT K., DEBYSER G., VAN BEEUMEN J., DOMINGUES P., AMADO F., PIRES E., DOMINGUES M.R.M., BARROS M.T., (2009). Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L. *Planta* 230, 429–439.

SCHÄFER T., BÖHLER S., RUHDORFER S., WEIGL L., WESSNER D., HEINRICH J., FILIPIAK B., WICHMANN H-E., RING J., (2001). Epidemiology of food allergy/food intolerance in adults: associations with other manifestations of atopy. *Allergy* ; 56: 1172 9.

SCHMIDT D.G., (1982). Association of caseins and casein micelle structure. *In: Developments of dairy chemistry 1-proteins.* Applied science publishers: 61-86.

SELO I., CLEMENT G., BERNARD H., CHATEL J.M., CREMION C., PELTRE G., (1999). Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy* ; 29: 1055-1063.

SHAH MANZOOR A , SHABIR A. M. et ARAY M A. P., (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.* 94: 5–16.

SILVA, S.V., MALCATA, F.X., (1999). On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chem.* 67, 373–378.

SILVA S.V. and MALCATA F. X., (2005). 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. *J. Dairy Sci.* 88:1947–1954.

SIMÕES et FARO, (2004). Structure and function of plant aspartic proteinases. *FEBS J.* 271, 2067–2075.

SOUSA M.J., MALCATA F.X., (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Le Lait*, 82,151–170.

T

TAYLOR S.L., HEFLE S.L., (2001). Food Allergies and Other Food Sensitivities. *Food Technology* ; 55: 68-83.

TSOULI J., (1974). Etude comparée de l'activité enzymatique de 3 variétés d'artichauts du genre *Cynara Cardunculus* L. sur la coagulation du lait. *Le lait*, 537, 415-421.

TURGEON S. L., BARD C., GAUTHIER, S. F. (1991). Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Can. Inst. Sci. Technol. J.*, 24(1/2), 14-18.

U

UHLIG H., (1998). Description of enzymes. In : Uhlig, H. (Ed.), *Industrial Enzymes and their Applications*. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 146–151.

V

VIEIRA M., PISSARA J., VERISSIMO 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, 529–539.

VERISSIMO P., ESTEVES C., FARO C., and PIRES E., (1995). The vegetable rennet of *cynara cardunculus* l. Contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnology letters*, vol.17, pp: 621-626.

VIOLA S., (2012). Traitement diététique de l'allergie aux protéines de lait de vache. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Pédiatrie, 4-002-H-35.

W

WAL J.M., BERNARD H., CREMINON C., HAMBERGER C., DAVID B., PELTRE G., (1995). Cow's milk allergy: the the humoral immune response to eight purified allergens. *Advances in Experimental Medicine Biology* ; 371 B: 879-881.

WAL J.M., (1998). Cow's milk allergens. *Allergy* ; 53: 1013-1022.

WAL J.M., (2001). Structure and function of milk allergens. *Allergy* ; 56: 35-38.

WAL J.M., (2002). Cow's milk proteins/Allergens. *Annals of Allergy Asthma and Immunology*; 89 (Suppl): 3-10.

WAL J.M., (2011). Allergénicité des protéines laitières. *Innovations agronomiques* ; 13: 25-43.

Z

ZARE H., MOOSAVI-MOVAHEDI A. A., SALAMI M., MORTEZA M., SABOURY A. A. et SHEIBANI N., (2013). Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica* cv. Sabz) latex. *Phytochemistry* 87: 16–22.

ZUBERBIER T., EDENHARTER G., WORM M., EHLERS I., REIMANN S., HANTKE T., ROEHR C.C., BERGMANN K.E., NIGGEMANN B., (2004). Prevalence of adverse reactions to food in Germany -a population study. *Allergy* ; 59(3) :338-45.

ZIKIOU A., (2013). La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*). Mémoire magister, université Mentouri constantine, 119p.

Annexes

Annexe 01

Préparation de réactif de Bradford

- 100 mg de bleu de Coomassie G250 ;
- 100 ml d'acide phosphorique à 85% ;
- 50 ml d'éthanol à 95% ;
- Qsp 1000 ml d'eau distillée.

Ce réactif doit être conservé à 4°C et à l'abri de la lumière.

Préparation des solutions tampon

La solution tampon acétate de sodium (pH=5.4, 0.1M) est préparée comme suit : (pour 1L de solution tampon).

- Dissoudre une quantité de 6.645g de $[\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2]$ dans une fiole jaugée de 1L.
- Mesurer le pH, ajuster le avec de l'acide acétique puis compléter le volume avec l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

La solution tampon phosphate de sodium (pH 7, 0.01M) est préparée de la manière suivante :

- Dissoudre 0.865g de $[\text{Na}_2\text{HPO}_4]$ et 0.464g $[\text{NaH}_2\text{PO}_4]$ dans une fiole jaugée de 1L.
- Ajuster le pH avec de l'HCL 1N ou de l'NaOH 1N, puis compléter le volume à 1L.

Annexe 02

Electrophorèse SDS-PAGE

1. Solutions mères

Solution d'acrylamide

Acrylamide 30%29g
 Bis acrylamide 0,8%.....1g
 Eauqsq100

Tampon de séparation pH 8.8

Tris.....6.34g
 SDS.....0.8
 β -Mercaptoéthanol.....0.4ml
 Eauqsq100ml

Tampon de concentration pH 6.8

Tris.....6.075g
 SDS.....0.4g
 β -Mercaptoéthanol.....200ml
 Eau200 μ l

Ajuster à 6.8 avec du HCl

APS (Ammonium persulfate) : Faire dissoudre 0.15g d'APS dans 1ml d'eau distillée et il doit être fraîchement préparé.

2. Préparation des gels

Gel de séparation à 15%

Produit	Quantité pour 2 gels
Solution d'acrylamide	5ml
Tampon de séparation	2.5ml
SDS 10%	0.1ml
TEMED	0.004ml
APS (Ammonium persulfate)	0.1ml
Eau	2.3ml

Gel de Concentration 7.5%

Produit	Quantité pour 2 gels
Solution d'acrylamide	2.5ml
Tampon de concentration	2.5ml
TEMED	10 μ l
APS	100 μ l
Eau	10ml

3. Tampon de migration pH 8.3

Tris.....1.06g
 Glycine5.04g
 SDS.....0.35g
 β -Mercaptoéthanol.....175 μ l
 Eauqsp 350 ml

4. Solution de fixation et de décoloration

Acide acétique5%
 Alcool30%
 Eau65%

Préparer 200ml par plaque

Solution de coloration

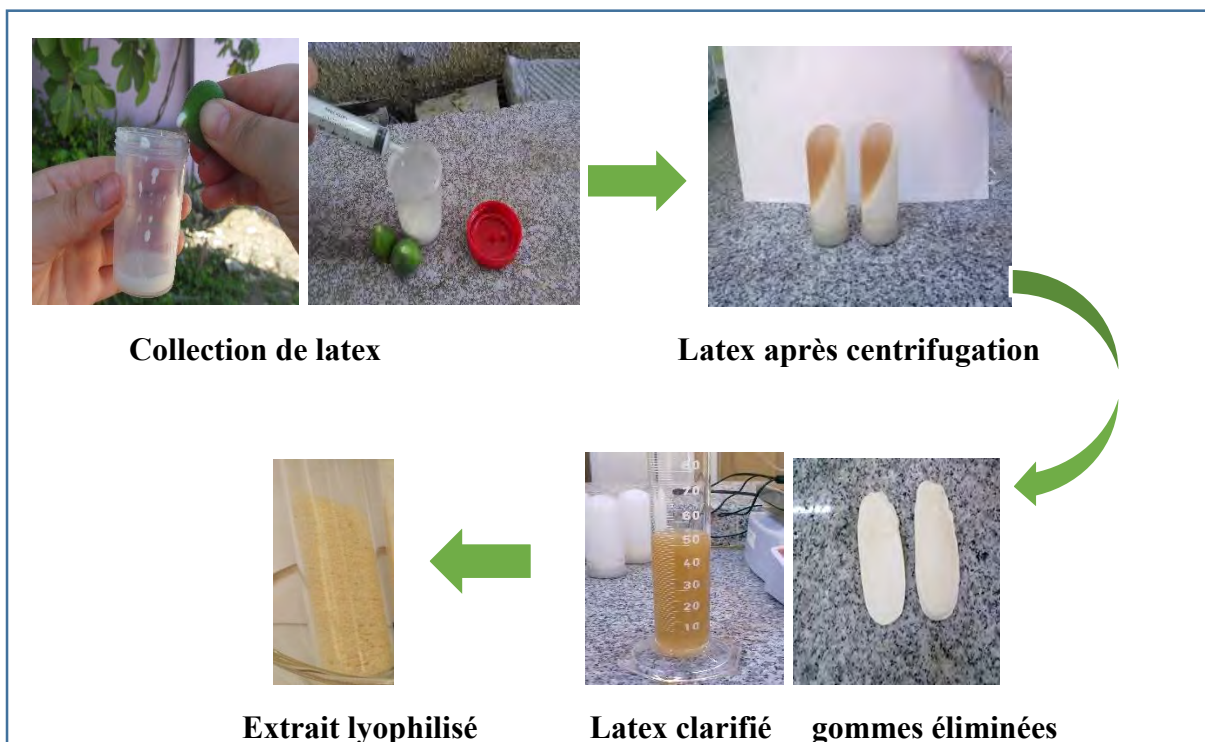
Ajouter 0.12% de bleu de coomassie à la solution précédente

Préparer 50ml par plaque.

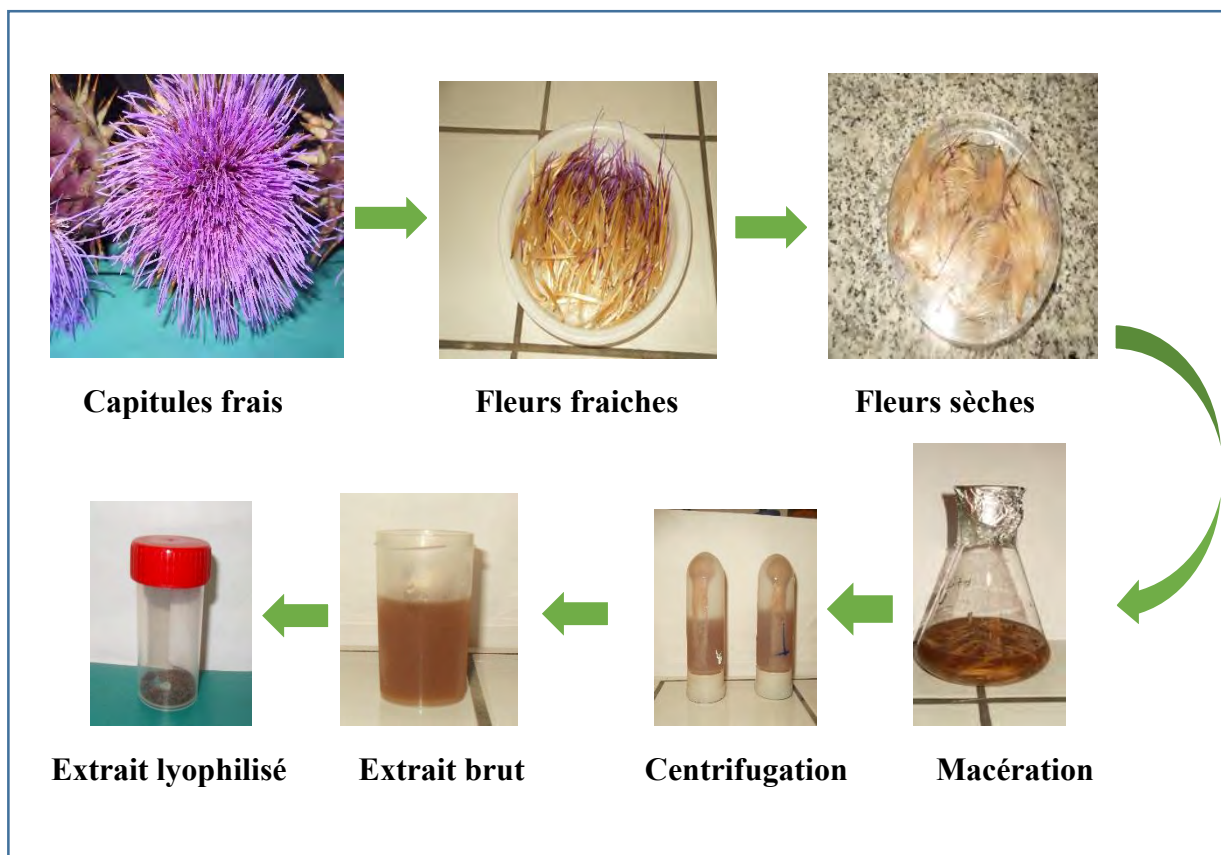
Annexe 03

Extraction des systèmes enzymatiques

1. Extrait clarifié de la ficine



2. Extrait brut des fleurs de cardon



Résumé

ملخص

الهدف من هذا العمل هو تحليل الكازيين البقري بواسطة مستخلص الفيسين ومستخلص أزهار الخرشف البري من أجل دراسة تأثير هذه المستخلصات على حساسية الكازيين البقري.

الجزء الأول من هذا العمل مكرس لاستخرا وتوصيف محتوى النظام الانزيمي في كل نبات (*cynara cardunculus et ficus carica*) والتوصيف يهدف أساسا الى تحديد، النشاط التخثري وقوة اماهة البروتينات والبروفيل ، الكهربائي للمستخلصات التي شملتها الدراسة. أظهرت النتائج الرئيسية المتحصل عليها، من حيث الأنشطة الإنزيمية ان مستخلص الفيسين يمتلك نشاط تخثري يقدر بـ 201.56 P.U وقوة اماهة البروتينات تقدر بـ 19391.67 µg من التيروزين لكل ملتر من الفيسين في حين ان مستخلص ازهار الخرشف البري فهو يتميز بنشاط تخثري يقدر بـ 1.25 U.P وقوة اماهة البروتينات تقدر بـ 142.5 µg من التيروزين لكل ملتر من الكاردوزين.

الجزء الثاني من الدراسة والذي يهدف إلى إجراء تحليل الكازيين البقري بواسطة المستخلصات التي تم تحضيرها مسبقا ومتابعته بواسطة تقنية O-PhthaldiAldehyde لتحديد درجة التحلل ومن ثم توصيف المتحللات المتحصل عليها عن طريق التحليل الكهربائي. مستخلص الفيسين أظهر أقصى درجة تحلل بعد 24 ساعة تقدر بـ 58.3% و 32.91% فيما يتعلق بنسبتي الانزيم 100/1 و 1000/1 على التوالي. في حين ان مستخلص ازهار الخرشف البري أظهر درجة تحلل قصوى تقدر بـ 24.12% و 32.42% فيما يخص نسبتي الانزيم 100/1 و 50/1 لى التوالي. انطلاقا من البروفيلات الكهربائية للمتحللات يمكن القول ان مستخلص الفيسين يتميز عن مستخلص ازهار الخرشوف بسرعة تحلل أكبر للكازيين والمتمثلة في اختفائها بعد 30 دقيقة من التحلل، عكس مستخلص ازهار الخرشف اين نلاحظ ان الكازيين قاوم عملية التحلل إلى غاية 6 ساعات.

أخيرا، فان تقييم مناعية المتحللات عقب المعالجة الإنزيمية قد تمت عن طريق تحديد البروفيلات المناعية-الكهربائية بواسطة تقنية western blot، النتيجة لم تكن كافية لمناقشة مناعية متحللات الكازيين وبناء على ذلك فانه يتطلب إعادة تقييم المناعية ، وتأكيدها بطرق أخرى. من ناحية أخرى فان دراسة تأثير المستخلصات الإنزيمية على البروتينات المسببة للحساسية، يستحق أن يمتد إلى بروتينات الحليب الأخرى مثل بروتينات مصل الحليب وغيرها من البروتينات المسببة للحساسية الغذائية.

الكلمات المفاتيح: التحلل، الكازيين البقري، الحساسية، مستخلص أزهار الخرشف، مستخلص الفيسين.

Résumé

L'objectif du présent travail est l'hydrolyse des caséines bovines par l'extrait clarifié de la ficine et l'extrait brut des fleurs de cardon dans le but d'étudier l'impact de ces derniers sur l'allergénicité des caséines bovines.

La première partie de ce travail est consacré à l'extraction et la caractérisation du système enzymatique contenu dans chaque végétal (*Ficus carica* et *cynara cardunculus*), la caractérisation a visé principalement la détermination de l'activité coagulante et l'activité protéolytique ainsi que la détermination des profils électrophorétiques des enzymes étudiées. Les principaux résultats obtenus ont montré qu'en termes d'activités enzymatiques, l'extrait clarifié de la ficine possède une activité coagulante de 201.56 U.P, et une activité protéolytique de 19391.67 µg/ml/h alors que l'extrait floral de cardon se caractérise par une activité coagulante de l'ordre de 1.25 U.P et une activité protéolytique de 142.5 µg/ml/h.

Une deuxième partie qui a pour objectif, la réalisation des cinétiques d'hydrolyse des caséines bovines par les extraits préparés précédemment. Le suivi des cinétiques a été effectué par la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA) pour déterminer le degré d'hydrolyse à chaque temps de prélèvement, ensuite une caractérisation des hydrolysats obtenus a été réalisée par une méthode électrophorétique SDS-PAGE. L'extrait de la ficine montre un degré d'hydrolyse après 24 h de 58.3 % et 32.91 % concernant les deux ratios E/S = 1/100 et 1/1000 respectivement, alors que celui de l'extrait des fleurs de cardon montre un DH de 32.42 % et 24.12 % pour les rapports E/S = 1/100 et 1/50 respectivement. A partir des profils électrophorétiques nous pouvons dire que l'extrait de la ficine se distingue de celui des fleurs de cardon par une vitesse de dégradation des caséines plus rapide qui se traduit par leur disparition au bout de 30 min d'hydrolyse contrairement à l'extrait brut de cardon où les caséines persistent jusqu'à 6 heures d'hydrolyse.

Enfin, l'évaluation de l'immunoréactivité des protéolysats après le traitement enzymatique a été réalisé par détermination du profil immuno-électrophorétique par le western blot et le résultat n'était pas suffisant pour l'interpréter et par conséquent ce test nécessite d'être répété et confirmé par d'autres méthodes. D'autre part l'étude de l'impact des extraits enzymatiques sur l'allergénicité des protéines, mérite d'être élargie sur d'autres protéines du lait tel que les protéines sériques et d'autres protéines alimentaires allergisantes.

Mots clés : Hydrolyse, caséines bovines, allergie, extrait de fleurs de cardon, extrait clarifié de la ficine.

Abstract

The objective of this work is the hydrolysis of casein bovine by the clarified extract of ficin and the crude extract of thistle flowers in order to study the impact of these on the allergenicity of bovine caseins.

The first part of this work is dedicated to the extraction and characterization of the enzyme content system in each plant (*Ficus carica* and *Cynara cardunculus*); the characterization aimed mainly determining the physicochemical characteristics, coagulant activity, proteolytic activity and the determination of the electrophoretic profiles of the studied enzymes. The main results showed that, in terms of enzymatic activities, the clarified extract of ficin has a coagulant activity of 201.56 UP, and a proteolytic activity of 19391.67 $\mu\text{g} / \text{ml} / \text{h}$, the cardoon flower extract has coagulant activity of 1.25 U.P and a proteolytic activity of 142.5 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$.

A second part which aims, the achievement of kinetic hydrolysis of bovine casein by extracts previously prepared and followed by the O-phthaldialdehyde method (OPA) to determine the degree of hydrolysis at each sampling time then a characterization of hydrolysates obtained was conducted by a method électrophoritique SDS-PAGE. The extract of ficin shows a maximum degree of hydrolysis after 24 hours of 58.3 % and 32.91 % for both ratios $E / S = 1/100$ and $1/1000$ respectively, while that of the extract of the flowers of cardoon shows a DH maximum of 24.12 % and 32.42 % for both ratios $E/S = 1/100$ and $1/50$ respectively. From the profiles électrophoritiques we can say that the extract of ficin differs from that of cardoon flowers by a speed faster degradation of caseins and resulting in their disappearance after 30min of reaction unlike the extract crude cardoon where caseins persist to 6 hours of hydrolysis.

Finally, the evaluation of immunoreactivity proteolysates after the enzyme treatment was performed by determination of the immuno-electrophoretic profiles by the Western blotting and the result was not sufficient to interpret, and consequently this test necessitate to be repeated and confirmed by other methods. On the other hand, the study of the impact of enzyme extracts on the allergenicity of proteins should be extended to other milk proteins such as whey proteins and other allergenic food proteins.

Key words: Hydrolysis, bovine caseins, allergy, extract of thistle flowers, extract clarified of ficin.