



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi -Tébessa-  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département : Biologie Appliquée



## MEMOIRE DE MASTER

**Domaine:** Sciences de la nature et de la vie

**Filière:** Sciences alimentaires

**Option:** Qualité des produits et sécurité alimentaire

### Thème:

**Etude de l'effet d'un extrait enzymatique  
protéolytique d'*Aspergillus niger* sur la gliadine  
(gluten)**

Présenté par:

**Chahrazad BOUGHERARA  
Mabrouk ALIANI**

### Devant le jury:

Président :	Khalida	BENHAMLAOUI	MAA	Université de Tébessa
Rapporteur :	Fatima	BOUKEZOULA	MCB	Université de Tébessa
Examineur :	Saoussene	SMAALI	MAA	Université de Tébessa

**Année universitaire: 2016 - 2017**

## **REMERCIEMENTS**

*Nos vifs remerciements vont à la directrice de ce travail M<sup>me</sup> BOUKEZOULA Fatima, pour son encadrement très efficace dans la conduite de cette petite recherche, pour ses encouragements, ses conseils, sa confiance, sa patience, elle a constamment porté un regard critique ouvert et constructif sur ce travail. En dépit d'un emploi du temps fort chargé, nous avons conscience des efforts qu'elle a dû fournir pour se rendre disponible.*

*Nous souhaitons également présenter nos remerciements chaleureux à M<sup>me</sup> BENHAMLAOUI Khalida d'avoir accepté de présider le jury et M<sup>me</sup> SMAALI Saoussene pour nous avoir fait l'honneur d'expertiser ce travail.*

*Notre gratitude et notre reconnaissance vont particulièrement à tous les membres du laboratoire de contrôle de qualité, aussi le laboratoire de Biochimie au niveau de l'Université Larbi Tebessi, Tébéssa pour leur dévouement, leur soutien et pour nous avoir facilité l'accès au laboratoire ce qui nous a permis de mener bien ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier très chaleureusement M<sup>me</sup> KECHE Moufida, pour sa gentillesse et sa disponibilité, elle nous a beaucoup aidé au niveau du laboratoire de contrôle de qualité.*

*... A tous, nous adressons l'expression de notre profonde gratitude.*

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste les figures

Liste des tableaux

Liste des photos

Introduction..... 1

### Synthèse bibliographique

<b>I. Le gluten.....</b>	<b>4</b>
I.1. Définition du gluten.....	4
I.2. Composition du gluten.....	5
I.3. Propriétés du gluten.....	5
I.4. Protéines de gluten.....	6
I.4.1. Gliadines.....	7
I.4.2. Gluténines.....	7
I.5. Extraction de gluten.....	9
I.5.1. Analyse quantitative.....	9
I.5.2. Analyse qualitative par l'alvéographe chopin.....	9
I.6. Intolérance au gluten.....	9
I.6.1. Physiopathogénie.....	10
I.6.2. Symptômes.....	12
I.6.3. Diagnostic.....	12
I.6.4. Traitement.....	12
I.7. Utilisation des enzymes digestives pour les maladies cœliaques.....	13
<b>II. Les protéases.....</b>	<b>15</b>
II.1. Définition des protéases.....	15
II.2. Sources des protéases.....	15
II.2.1. Protéases végétales.....	15
II.2.1.1. Papaïne.....	15
II.2.1.2. Bromelaïne.....	15
II.2.1.3. Ficine.....	16
II.2.1.4. Kératinases.....	16
II.2.2. Protéases animales.....	16
II.2.2.1. Trypsine.....	16

II.2.2.2. Chymotrypsine.....	16
II.2.2.3. Pepsine.....	16
II.2.2.4. Rénine.....	16
II.2.3. Protéases microbiennes.....	17
II.2.3.1. Protéases bactériennes.....	17
II.2.3.2. Protéases fongiques.....	17
II.2.3.3. Protéases de levures.....	18
II.2.3.4. Protéases virales.....	18
II.3. Nomenclature et classification des protéases.....	18
II.4. Différents groupes de protéases.....	18
II.4.1. Exopeptidases.....	18
II.4.1.1. Aminopeptidases.....	18
II.4.1.2. Carboxypeptidases.....	19
II.4.2. Endopeptidases.....	19
II.4.2.1. Protéases sérines.....	19
II.4.2.2. Protéases cystéines.....	19
II.4.2.3. Protéases aspartiques.....	20
II.4.2.4. Métalloprotéases.....	20
II.5. Mode d'action des protéases.....	22
II.6. Inhibiteurs de protéases.....	22
II.7. Fonctions physiologiques des protéases.....	22
II.8. Applications industrielles des protéases.....	23
II.8.1. Industrie alimentaire.....	24
II.8.1.1. Fromageries.....	25
II.8.1.2. Boulangeries.....	25
II.8.1.3. Préparation de produits à base de soja.....	25
II.8.1.4. Synthèse de l'aspartame.....	26
II.8.1.5. Attendrissage de la viande.....	26
II.8.2. Industrie pharmaceutique et médicale.....	26
II.8.3. Détergents.....	27
II.8.4. Tanneries.....	27
II.8.5. Industrie de la photographie.....	28
II.8.6. Traitement des déchets.....	28

II.8.7. Autres applications.....	29
II.9. Propriétés des enzymes protéolytiques.....	29
I.10. Diagramme général d'obtention d'une enzyme.....	30
<b>III. <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>31</b>
III.1. Définition et caractéristiques générales.....	31
III.1.1. Les <i>Aspergillus</i> .....	31
III.1.2. <i>Aspergillus niger</i> .....	31
III.2. Croissance et cycle fongique.....	32
III.3. Taxonomie.....	33
III.4. Ecologie.....	33
III.5. Morphologie.....	34
III.5.1. Caractères cultureux.....	34
III.5.2. Aspect microscopique.....	34
III.6. Importance industrielle d' <i>Aspergillus niger</i> .....	35
III.6.1. Production des acides citriques.....	35
III.6.2. Application dans l'environnement .....	36
III.6.3. Production des enzymes.....	36

### **Matériel et méthodes**

I. Matériel biologique.....	39
II. Prélèvement et purification de la souche.....	39
II.1. Prélèvement.....	39
II.2. Repiquage et purification.....	39
II.3. Méthodes d'identification.....	39
II.3.1. Critères d'identification macroscopique.....	40
II.3.2. Critères d'identification microscopique.....	40
III. Préparation de l'inoculum.....	41
III.1. Préparation de la suspension de spores.....	41
III.2. Dénombrement des spores.....	41
IV. Etude du potentiel protéolytique.....	41
IV.1. Inoculation du milieu de fermentation.....	41
IV.2. Extraction de la protéase.....	42
IV.3. Dosage de l'activité protéolytique de l'extrait brut .....	42
IV.3.1. Courbe étalon de la tyrosine.....	43

IV.3.2. Détermination de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut.....	43
IV.4 Caractérisation de l'extrait enzymatique brut.....	44
IV.4.1. Détermination du pH optimum.....	44
IV.4.2. Détermination de la température optimale.....	44
IV.4.3. Stabilité à la température optimale.....	44
V. Etude de l'action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine (gluten).....	45
V.1. Extraction des gliadines.....	45
V.2. Incubation de l'extrait enzymatique brut avec la gliadine.....	45

### **Résultats et discussion**

I. Isolement et purification de la souche.....	46
II. Identification de la souche.....	46
II.1. Identification macroscopique.....	46
II.2. Identification microscopique.....	47
III. Potentiel protéolytique de l'extrait enzymatique brut.....	52
III.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut.....	52
III.2. Caractéristiques de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut.....	53
III.2.1. Effet du pH .....	53
III.2.2. Effet de la température.....	54
III.2.3. Stabilité à la température optimale.....	56
IV. Mise en évidence de l'effet protéolytique de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine (gluten).....	58
<b>Conclusion</b> .....	61
<b>Références bibliographiques</b> .....	63

### **Annexes**

#### **Résumés**

**A** : absorbance  
**aw** : activité de l'eau  
**°C** : degré celsius  
**cm** : centimètre  
**DFP** : di-isopropyle fluorophosphate  
**DO** : densité optique  
**EC** : enzyme commission  
**EDTA** : acide éthylène diamine tétraacétique (éthylène diamine tétra acétate)  
**FDA** : food and drug administration  
**FPM** : faible poids moléculaire  
**gr** : gramme  
**h** : heure  
**HIV** : virus de l'immunodéficience humaine  
**HPM** : haut poids moléculaire  
**kDa** : kilo dalton  
**M** : molarité  
**mg** : milligramme  
**ml** : millilitre  
**mM** : millimolaire  
**mm** : millimètre  
**min** : minute  
**nm** : nanomètre  
**N** : normalité  
**NaCl** : chlorure de sodium  
**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : carbonate de sodium  
**nm** : nanomètre  
**pCMB** : *p*-chloromercure benzoate  
**pH** : potentiel d'hydrogène  
**PM** : poids moléculaire  
**PMSF** : phényle méthyle sulphonyle fluoride  
**P/V** : poids / volume  
**r.p.m** : rotation par minute (round per minute)  
**SG** : sous unité de gluténine  
**SSF** : solide state fermentation (fermentation solide)  
**TCA** : tri-chloroacetic acid (acide trichloracétique)  
**TH** : taux d'humidité  
**TLCK** : tosyl- L- lysine chlorométhyle kétone  
**UP** : unité protéolytique  
**µg** : microgramme  
**µm** : micromètre

<b>Figure 01.</b> Structure du gluten (gliadines + gluténines), <b>a:</b> schéma représentatif montre l'interaction entre les protéines du gluten, <b>b:</b> image de la structure du gluten sur un microscope électronique à balayage .....	4
<b>Figure 02.</b> Représentation graphique de la composition du gluten .....	5
<b>Figure 03.</b> Schéma représente la formations des ponts disulfures entre les protéines du gluten.....	6
<b>Figure 04.</b> Composition protéiques de la farine de blé.....	8
<b>Figure 05.</b> Processus physiopathologiques de la maladie cœliaque.....	11
<b>Figure 06.</b> Deux enzymes d'hydrolyse le gluten (ALV003: est un mélange de deux glutenases; une endoprotéase cystéine de germination des graines d'orge et prolyl endopeptidase de <i>Sphingomon capsulata</i> ; Asp: <i>Aspergillus</i> .....	14
<b>Figure 07.</b> Distribution des ventes des enzymes.....	23
<b>Figure 08.</b> Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme.....	30
<b>Figure 09.</b> Développement d' <i>Aspergillus niger</i> surveillés par microscope électronique à balayage.....	32
<b>Figure 10.</b> Aspect microscopique ( <b>a</b> ) et représentation schématique ( <b>b</b> ) de la conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> .....	35
<b>Figure 11.</b> Courbe d'étalonnage du nombre de spores d' <i>Aspergillus niger</i> .....	41
<b>Figure 12.</b> Courbe d'étalonnage de la tyrosine.....	43
<b>Figure 13.</b> Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d' <i>Aspergillus niger</i> selon le pH.....	54
<b>Figure 14.</b> Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d' <i>Aspergillus niger</i> selon la température.....	56
<b>Figure 15.</b> Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d' <i>Aspergillus niger</i> selon la durée d'incubation à température optimale.....	57
<b>Figure 16.</b> L'activité relative protéolytique d' <i>Aspergillus niger</i> utilisant deux substrats différents (caséine et gliadine).....	60

<b>Tableau 01.</b> Propriétés analytiques des quatre types de protéases.....	21
<b>Tableau 02.</b> Quelques protéases et leurs applications industrielles.....	24
<b>Tableau 03.</b> Production des enzymes par <i>Aspergillus niger</i> .....	37
<b>Tableau 04.</b> Composition chimique du son de blé dur utilisé.....	41
<b>Tableau 05.</b> Résultats de l'examen macroscopique de la souche isolée et purifiée.....	47
<b>Tableau 06.</b> Résultats de l'examen microscopique de la souche isolée et purifiée.....	48

<b>Photo 01.</b> Types de cadrillage de la cellule de Malassez.....	41
<b>Photo 02.</b> Préparation du son de blé.....	41
<b>Photo 03.</b> Extraction de la caséine.....	43
<b>Photo 04.</b> Aspect macroscopique de l' <i>Aspergillus niger</i> cultivé sur milieu Sabouraud, culture agée de 5 jours.....	50
<b>Photo 05.</b> Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> . <b>a:</b> Aspect microscopique des colonies d' <i>Aspergillus niger</i> objectif (×100), <b>b:</b> Aspect microscopique des spores d' <i>Aspergillus niger</i> objectif (×40).....	50
<b>Photo 06.</b> Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> objectif (×40).....	51
<b>Photo 07.</b> Aspect microscopique d' <i>Aspergillus niger</i> (tête et conidiophore), <b>a:</b> Aspect de tête conidienne radié d' <i>Aspergillus niger</i> , objectif (×100), <b>b :</b> Aspect et structure de conidiophore d' <i>Aspergillus niger</i> , objectif (×40).....	51

# *Introduction*

Le questionnement sur le gluten est de plus en plus présent dans notre société, ces dernières années. En effet, un nombre croissant de personnes souffrent de problèmes digestifs liés au gluten, allant d'une sensibilité au gluten jusqu'à la maladie cœliaque. Un régime sans gluten tout au long de la vie est actuellement le seul traitement disponible pour les personnes intolérantes au gluten. Bien que efficace, un tel régime est difficile à maintenir en raison de l'utilisation fréquente du gluten dans l'industrie alimentaire.

La composition unique des prolamines de céréales dans le blé, l'orge et le seigle les rend résistantes aux enzymes protéolytiques gastro-intestinales. Cela s'explique principalement par une teneur élevée en glutamine et en résidus de proline qui entraîne une dégradation incomplète de ces protéines au cours de la digestion humaine normale (**Bruce *et al.*, 1984 ; Hausch *et al.*, 2002**). Une telle dégradation partielle est considérée comme un facteur crucial dans l'activation de la réponse immunitaire dans la muqueuse du petit intestin et la progression de la maladie cœliaque chez les personnes génétiquement sensibles (**Shan *et al.*, 2002 ; Sollid, 2002**).

Des stratégies alternatives pour détruire complètement ou diminuer au moins partiellement l'activité cœliaque des gliadines de blé fait l'objet d'une recherche approfondie. Celles-ci comprennent l'exploration du blé ancien (**Van Den Broeck *et al.*, 2010**), l'inhibition de Transglutaminase 2 (**Maiuri *et al.*, 2005**), prévention de peptides immunogènes à travers les jonctions étroites telles que les antagonistes de la zonuline (**Leffler *et al.*, 2012**), l'induction de la tolérance utilisant des anti-cytokines telles que l'anti-IFN- $\gamma$  (**Bethune *et al.*, 2009**). Enfin, le plus prometteur une approche thérapeutique alternative semble le clivage enzymatique des gliadines en utilisant les Prolyl-endopeptidases spécifiques (PEP) d'origine différente (**Shan *et al.*, 2002 ; Mitea *et al.*, 2008**), dégradation de peptides immunogènes par germination des enzymes céréalières et transamidation de farine de céréales. Cependant, la complexité de la molécule de gliadine de blé a rendu la procédure une tâche très difficile (**Matysiak-Budnik *et al.*, 2005**).

Ces dernières années, ont connu une croissance exponentielle dans l'utilisation des enzymes comme catalyseurs industriels en raison de leur robustesse et aptitude à être utilisées dans diverses industries telles que l'industrie alimentaire, pharmaceutique, tanneries, des détergents et chimique, ainsi que pour le traitement des déchets (**Raghunath et al., 2010 ; Abhijit, 2012**).

La thérapie de supplémentation de protéases par voie orale, basée sur le principe d'une poursuite de la digestion de peptides de gluten en petits peptides non toxiques avant qu'ils n'atteignent l'épithélium intestinal, est l'approche la plus largement étudiée pour des traitements alternatifs de la maladie cœliaque (**Bousquet, 2015**).

Cependant, grâce à leur grande diversité biochimique, les microorganismes représentent une source exceptionnelle de protéases. En effet, 40 % des enzymes industrielles sont produites par les microorganismes (**Kirti et al., 2012**).

Les *Aspergillus* constituent un groupe de moisissures qui a montré une diversité considérable et une dominance dans la production de métabolites bioactifs comme les antibiotiques et les enzymes, ces composés ont témoigné d'un grand intérêt par leurs applications aux différents domaines biomédicaux et biotechnologiques (**Prakash et al., 2013**).

L'*Aspergillus niger*, le groupe dominant des *Aspergillus*, sont largement utilisés comme producteurs d'enzymes, entre autres les protéases. Une variété de molécules issues de cet espèce est employée comme additifs détergents, pour épilation des peaux dans l'industrie de cuir et dans la production des acides citriques dans le domaine agroalimentaire (**Chavan et al., 2013**).

Nous avons à travers ce travail abordé ce volet thérapeutique qui ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de l'approche enzymatique visant à éliminer l'immunogénicité du gluten. Dans ce travail, nous nous sommes concentrés sur la capacité de clivage de nouvelles protéases d'origine fongique qui peut servir d'outil potentiel pour dégrader les gliadines de blé.

C'est dans ce contexte que nous avons fixé comme objectif principal de rechercher une enzyme protéolytique capable de dégrader la gliadine à partir d'une souche d'*Aspergillus niger*.

Pour atteindre cet objectif nous avons structuré notre travail selon l'ordre suivant:

- Identification de la souche appartenant au genre *Aspergillus*, espèce: *Aspergillus niger* ;
- Extraction de l'enzyme protéolytique à partir de la souche d'*Aspergillus niger* ;
- Mise en évidence de l'activité protéolytique de la souche par fermentation sur milieu solide ;
- Caractérisation physicochimique de l'extrait enzymatique de la souche ;
- Etude de l'action de la protéase extraite d'*Aspergillus niger* sur la gliadine (gluten).

*Partie*  
*bibliographique*

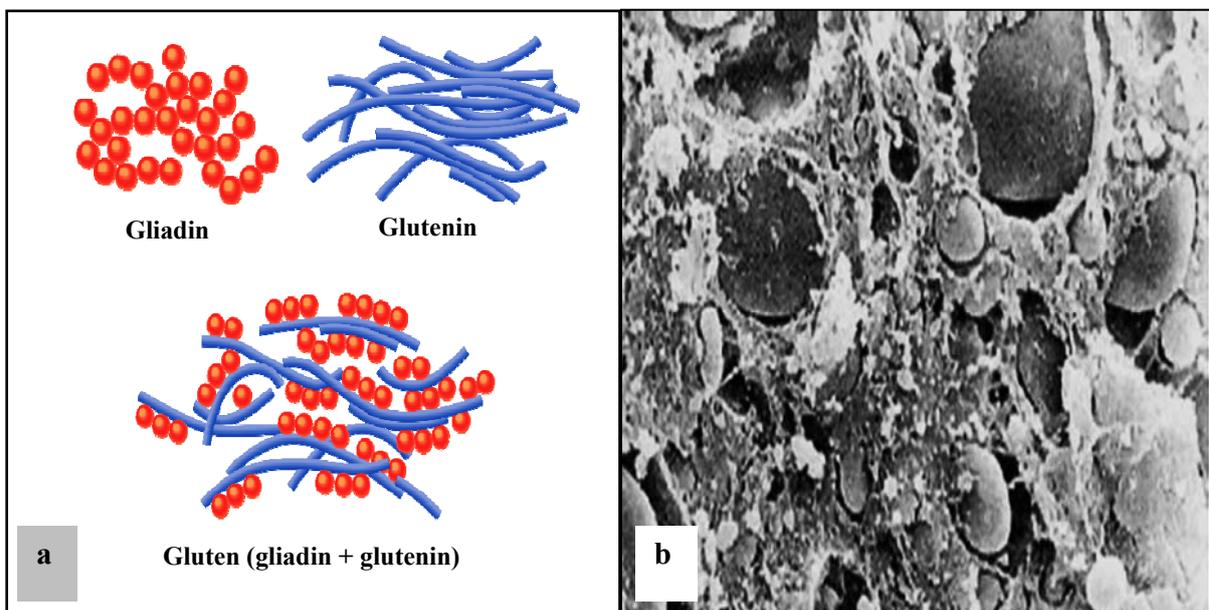
## I. Le gluten

### I.1. Définition du gluten

Le gluten est le terme utilisé pour décrire la fraction protéique extraite du blé, orge et seigle, responsable de la maladie cœliaque. Il s'agit d'une fraction protéique alcool-soluble (insoluble dans l'eau) de céréale qu'on appelle prolamine, constituée de 33 acides aminés riche en glutamine (environ 15%) et proline (environ 30%) et dont le nom varie selon l'origine de la céréale: gliadine pour le blé, hordéine pour l'orge et sécaline pour le seigle (**Sturges *et al.*, 1991**).

En raison de sa richesse en glutamine et proline (gliadine), cette fraction protéique n'est pas digérée par l'intestin humain, c'est-à-dire qu'elle n'est pas dégradée par les enzymes gastriques, pancréatiques ou de la bordure en brosse de l'intestin (**Shan *et al.*, 2002**).

La macromolécule du gluten est, en effet, une agrégation de monomères de gliadines et de polymères de gluténines, qui constituent « les protéines de réserve » de l'albumen (**Fasano, 2011**) (voir figure 01).



**Figure 01.** Structure du gluten (gliadines + gluténines), **a**: schéma représentatif montre l'interaction entre les protéines du gluten, **b**: image de la structure du gluten sur un microscope électronique à balayage (**Fasano, 2011**).

## I.2. Composition du gluten

Le gluten est un matériel viscoélastique obtenu par lixiviation d'une pâte de blé (malaxage en présence d'une eau salée et tamisage pour retenir les parties non solubles) (Feillet, 2000 ; Branlard, 2012).

Le gluten est principalement constitué de protéines (75 à 85%), il contient également de l'amidon (8 à 10 %), des sucres réducteurs (0.5 à 2%), des lipides (5 à 10%), des pentosanes (2%) et des matières minérales (1%) (Dacosta, 1986) (voir figure 02).

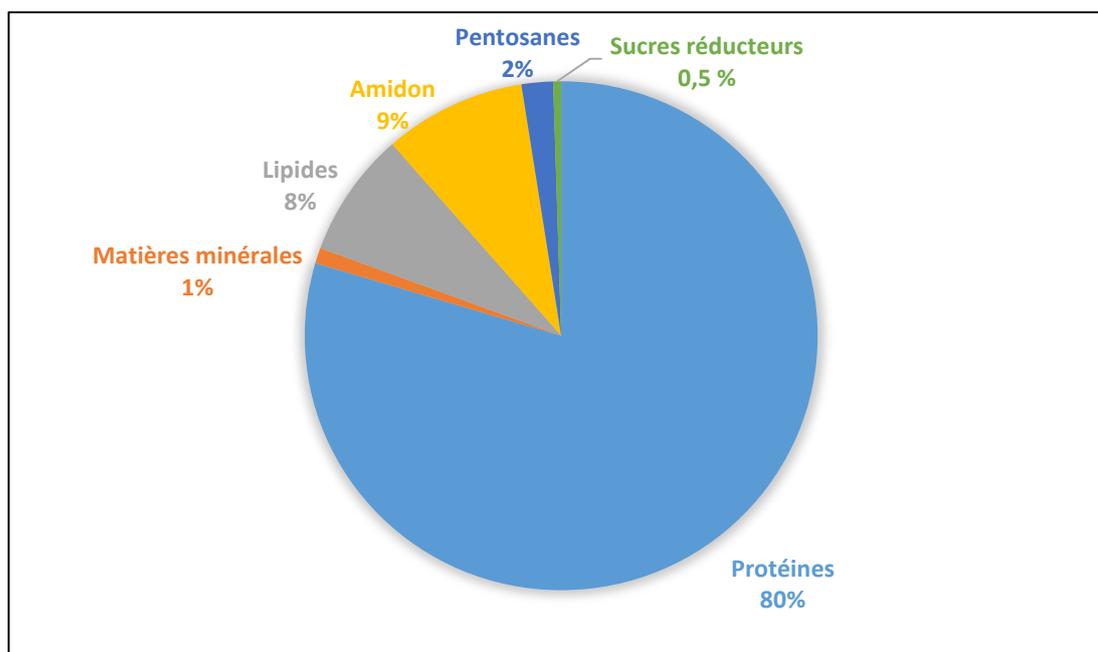


Figure 02. Représentation graphique de la composition du gluten (Feillet, 2000).

## I.3. Propriété du gluten

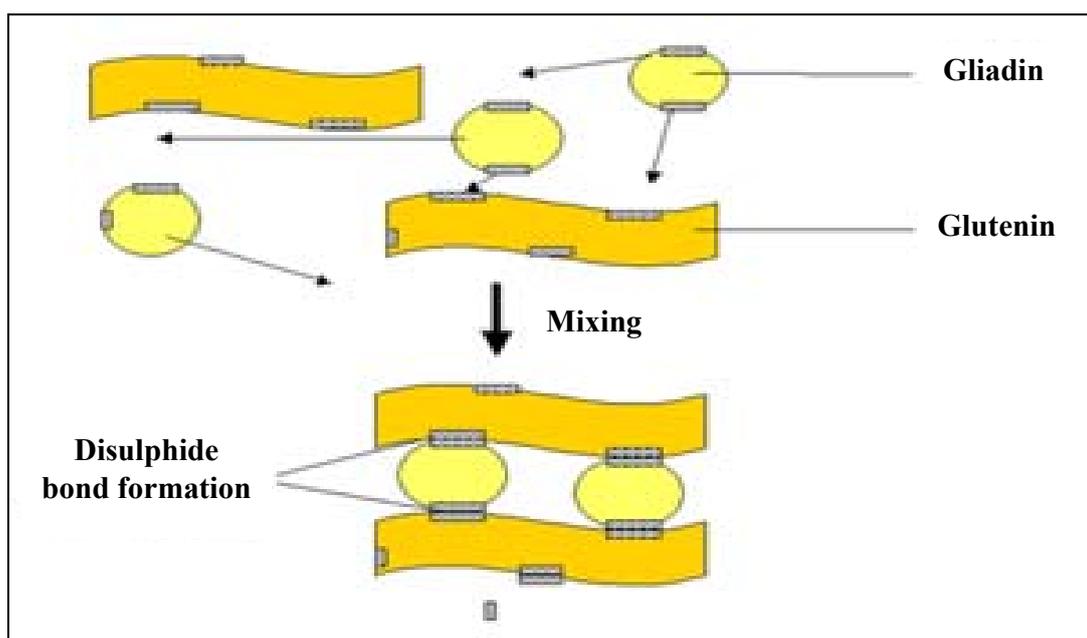
Il est impossible de déterminer les caractéristiques du gluten dans le blé sans d'abord créer une pâte. Pour former du gluten, il faut obligatoirement de la farine, de l'eau, et l'énergie du pétrissage (Branlard, 2012).

Les propriétés du gluten deviennent évidentes quand la farine est hydratée, donnant une pâte extensible, avec de bonnes propriétés de rétention de gaz (Fould, 1996).

Le gluten a des propriétés de cohésion, d'élasticité, de viscosité et de plasticité qui lui permette au cours de la panification, de former un réseau tridimensionnel imperméable, capable de retenir le gaz carbonique et de s'étirer sous sapression pour former la structure et la texture alvéolée de la pâte (Fould, 1996).

Il se forme au cours du pétrissage: les gluténines s'unissent par ponts disulfures formant une grande surface sur laquelle de nombreuses liaisons non covalentes peuvent apparaître avec des gliadines (plus lâchement associées) (Godon, 1991) (voir figure 03).

Ainsi, les gluténines sont responsables de la tenacité et de l'élasticité de la pâte et les gliadines de l'extensibilité. La quantité de gluten et la qualité de ses protéines font la valeur boulangère de la farine (Godon, 1991).



**Figure 03.** Schéma représente la formation des ponts disulfures entre les protéines du gluten (Kerfal *et al.*, 2010).

#### I.4. Protéines de gluten

Les gliadines et les gluténines sont d'abord regroupées en une grande famille de prolamines (des protéines de réserve riches en proline et en glutamine).

Les gluténines sont constituées de deux sous-groupes: les sous unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) et les sous unités de gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM).

D'une manière générale, la proportion entre ces différentes prolamines est la suivante: 40% de gliadines, 40% SG-FPM et 20% de SG-HPM. Ces protéines ont aussi été classées selon leur composition: les prolamines riches en soufre qui représentent 70% des prolamines et sont constituées des gliadines de type  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et des SG-FPM, les prolamines pauvres en

soufre qui représentent entre 10 et 12% des prolamines totales et sont exclusivement constituées des gliadines de type  $\omega$  (**Wrigley et al., 2006**) (voir figure 04).

#### **I.4.1. Gliadines**

Les gliadines sont des protéines monomériques de poids moléculaires allant de 15 à 85 kDa (**Branlard, 2012**).

Il y a quatre gliadines dans le blé :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\omega$ . Elles sont pauvres en acides aminés basiques et très riches en glutamine et proline (surtout  $\alpha$ ). Il y a quasi absence d'acides aminés soufiés dans les  $\omega$ -gliadines. La présence d'acides glutamique et aspartique sous forme amidée et la pauvreté en acides aminés basiques font de la gliadine une protéine à faible charge, qui avec une forte hydrophobicité expliquent les propriétés de solubilité particulières de cette protéine (**Alais et Linden, 1994**).

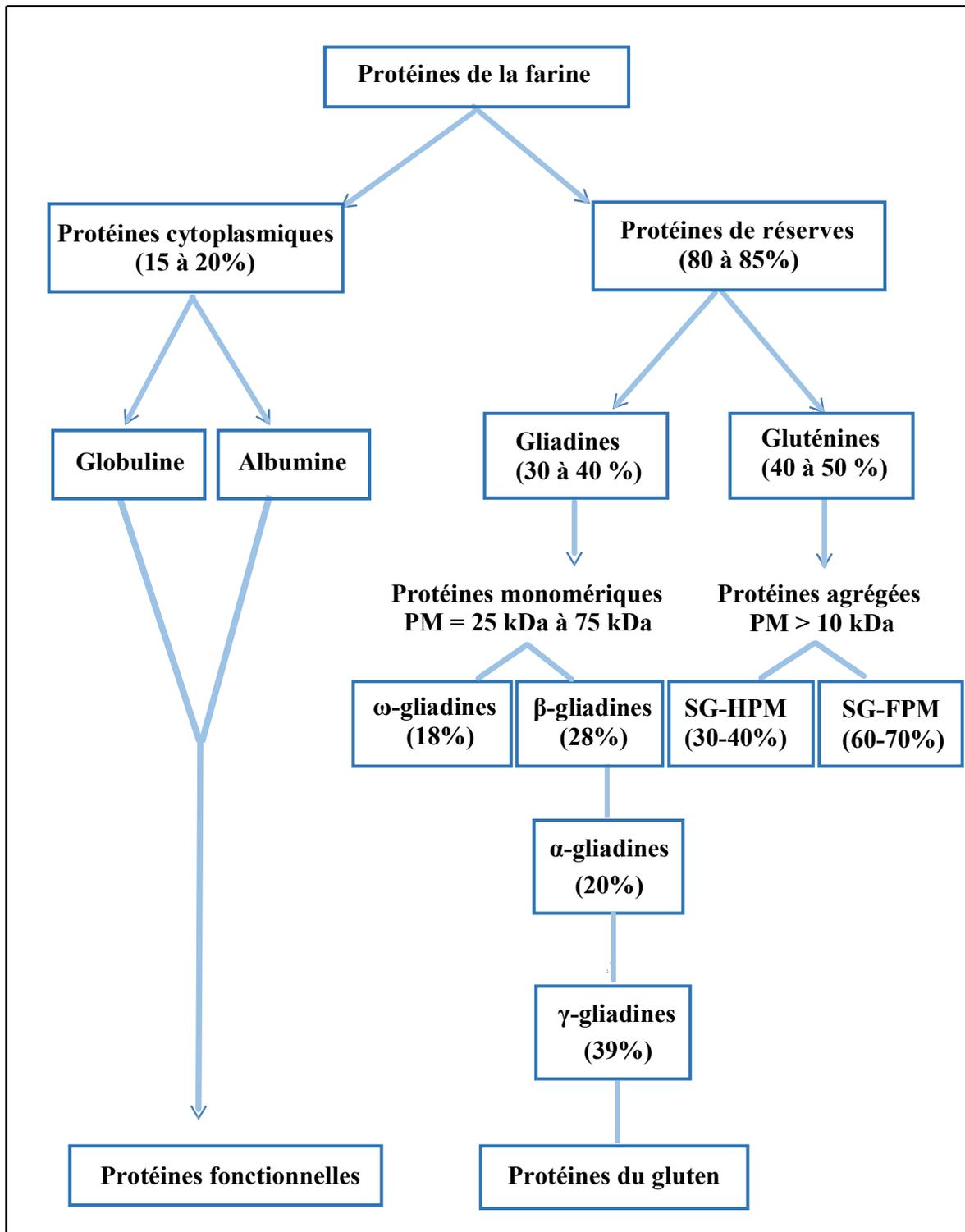
Les  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -gliadines sont stabilisées par des ponts disulfures intra-moléculaires, par de nombreuses liaisons H. Les gliadines sont extrêmement collantes lorsqu'elles sont déshydratées et n'ont pas ou peu de résistance à l'extension (**Alais et Linden, 1994**).

#### **I.4.2. Gluténines**

Ce sont des protéines polymérisées par des liaisons covalentes (disulfures) et leurs poids moléculaires varie de 200 kDa à plus de 45 000 kDa (**Branlard, 2012**).

Les gluténines ont une teneur en résidus lysine, glycine, alanine, sérine et tyrosine fortement supérieure à celles des gliadines, mais leur teneur en acide glutamique, proline et cystéine est inférieure (**Alais et Linden, 1994**).

Il existe deux types de gluténines, les gluténines à faible poids moléculaire (FPM) et les gluténines à haut poids moléculaires (HPM). Les deux sont associées par liaisons non covalentes, essentiellement des liaisons hydrophobes. Les gluténines sont résistantes à l'extension. Le rapport entre gliadines et gluténines est considéré comme important dans le comportement des pâtes (**Alais et Linden, 1994**).



**Figure 04.** Composition protéique de la farine de blé (rapprochement entre classification) (Osborne, 1924 ; Shewry, 1986).

## **I.5. Extraction de gluten**

Pendant la fabrication des pâtes, les caractéristiques qualitatives et quantitatives du gluten de la farine détermine la qualité du produit fini. Ce sont les protéines de blé constituantes du gluten qui lui apportent ses caractéristiques techniques. Elles ont chacune leur rôle :

- ❖ Les gliadines donnent à la pâte ses propriétés d'extensibilité et de fluidité.
- ❖ Les gluténines lui apportent élasticité, cohésion et résistance aux déformations.

Les gliadines et les gluténines forment le réseau de gluten dont le comportement affecte considérablement les propriétés rhéologiques des pâtes (**Buche, 2011**).

### **I.5.1. Analyse quantitative**

Le gluten représente la fraction insoluble d'un pàton de farine recueillie, sous un filet d'eau par malaxage et essorage. La masse plastique obtenue est pesée à l'état humide puis, après dessiccation (**Buche, 2011**).

### **I.5.2. Analyse qualitative par l'alvéographe chopin**

L'approche de la valeur boulangère d'une pâte et la prédiction de ses propriétés panifiables peuvent se faire empiriquement, à travers la mesure de leur force et de leur expansion par l'alvéographe chopin, c'est un appareil utilisé pour la mesure de la valeur boulangère d'une farine. On fabrique un petit pàton ferme sans levure et on l'installe dans l'alvéographe (**Del Frate, 2005**).

La méthode de l'alvéographe chopin consiste à enregistrer graphiquement sous forme d'une courbe la transformation d'un pàton préparé dans des conditions standardisées par la pression de l'air insufflé sous le pàton. Le pàton se distend et forme une bulle qui éclate lorsque la limite d'élasticité est atteinte (**Del Frate, 2005**).

Cette courbe permet de déterminer les paramètres suivants : la ténacité de la pâte « **P** », l'extensibilité « **L** », le rapport « **P/L** », le gonflement **G** et le travail de déformation « **W** » (**Del Frate, 2005**).

## **I.6. Intolérance au gluten**

Une partie de la population humaine ne peut pas tolérer le gluten. Par conséquent, un nouveau groupe de produits sans gluten basés sur les farines sans gluten issues de céréales, pseudo-céréales ou autres est développés et consommé non seulement par un nombre de plus en plus important des cœliaques mais également par d'autres qui souhaitent exclure les

produits à base de gluten de leur régime pour des raisons de santé (**Hager et al., 2012 ; Lucisano et al., 2012**).

La maladie cœliaque est une entéropathie chronique à lésions inflammatoires de la muqueuse de l'intestin grêle. Elle est la conséquence d'une réaction auto-immune contre le gluten alimentaire chez des individus génétiquement prédisposés. Elle se caractérise principalement par une infiltration inflammatoire du duodénum et jéjunum et une atrophie villositaire intestinale entraînant une malabsorption et d'autres manifestations cliniques, régressives après exclusion alimentaire du gluten de blé et des prolamines équivalentes des autres céréales réputées toxiques (**Clot et al., 2001 ; Mouterde et al., 2008 ; Armstrong et al., 2009 ; Weber, 2012 ; Roujon et al., 2013**).

### **I.6.1. Physiopathogénie**

Les protéines responsables d'intolérance au gluten sont les prolamines. Ces dernières (gliadine du blé, sécaline du seigle et hordéine de l'orge, collectivement désignée sous le nom du gluten) ont été identifiées comme le composant de ces céréales capable d'induire des dommages chez les cœliaques (**Crowe, 2008**).

Les séquences toxiques des prolamines (gliadine, sécaline et hordéine) ont plusieurs caractéristiques uniques qui contribuent à leurs propriétés immunogènes. Elles sont extrêmement riches en acides aminés proline et glutamine (**Mouterde et al., 2008**).

Ces deux acides aminés sont à la base des deux étapes majeures dans la cascade inflammatoire de la maladie cœliaque:

1) ils confèrent une résistance à la dégradation enzymatique, car l'intestin humain n'a pas une prolyl-endopeptidase qui peut aisément couper les peptides du gluten riches en prolines.

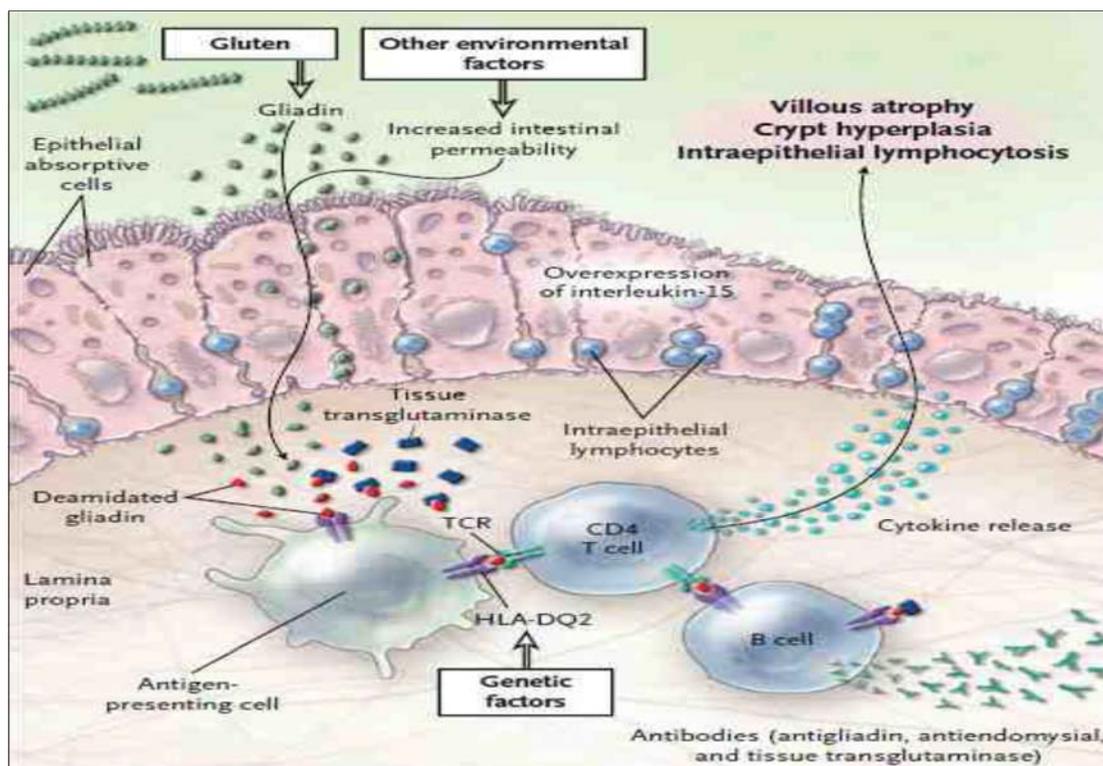
2) les peptides du gluten riches en glutamine sont un substrat idéal pour la désamination par la transglutaminase tissulaire (**Lerner, 2010**).

Après l'ingestion du gluten, il est dégradé en plusieurs segments. Les peptides de gluten résistants aux enzymes digestives traversent la barrière épithéliale et pénètrent au niveau du chorion suite à une augmentation de la perméabilité intestinale.

La transglutaminase tissulaire, grâce à sa fonction de désamination (transformation de la glutamine en acide glutamique), crée des charges négatives au niveau des peptides de la gliadine favorisant leur ancrage dans les poches à peptides des molécules DQ2 et DQ8, qui

contiennent des acides aminés chargés positivement. Ces peptides désaminés sont présentés par les cellules présentatrices d'antigène, qui disposent de poches d'affinité DQ2 ou DQ8 (telles que les cellules dendritiques, les macrophages, ou les lymphocytes B), aux lymphocytes T du chorion (de type CD4) qui sont activés et induisent une réaction inflammatoire avec production d'interféron gamma et une réaction immunitaire de type humoral avec production d'anticorps anti-gliadine et anti-transglutaminase tissulaire.

Une hyperplasie des lymphocytes T intra-épithéliaux (de type CD8) est constante et semble liée à une sécrétion exagérée d'une cytokine (interleukine 15) par les cellules épithéliales qui est impliquée dans la genèse de l'atrophie villositaire (cytotoxicité directe des lymphocytes intra-épithéliaux sur les cellules épithéliales) et dans la survenue des complications lymphomateuses (lymphome invasif et sprue réfractaire) (voir figure 05) (Cerf-Bensussan et Jabri, 2001 ; Hue *et al.*, 2004 ; Briani *et al.*, 2008 ; Tkoub, 2008).



**Figure 05.** Processus physiopathologiques de la maladie cœliaque (Green *et al.*, 2007).

### **I.6.2. Symptômes**

La maladie cœliaque atypique est habituellement vue chez des enfants plus âgés et les caractéristiques de la malabsorption sont absentes. Les symptômes peuvent être intestinaux ou extra-intestinaux. Les symptômes intestinaux peuvent inclure la douleur abdominale récurrente, la stomatite aphteuse récurrente et la constipation **(Catassi et Fasano, 2008)**.

Il y a aussi des symptômes extra-intestinaux apparemment non reliés (retard pubertaire chez l'adolescent, anémie, asthénie, atteintes osseuses et dentaires, atteintes cutano-muqueuses, troubles endocriniens, neuropathies, troubles de la fertilité, ménopause précoce).

Les malades cœliaques présentent aussi fréquemment des troubles de l'humeur ou la dépression **(Malmut et al., 2009)**.

### **I.6.3. Diagnostic**

Les premiers critères de diagnostic ont été établis en 1969. La maladie cœliaque se définissait alors selon 3 caractéristiques; une muqueuse anormale sous diète normogluténique; une amélioration des tissus; suite au retrait du gluten de l'alimentation du patient; une détérioration lors de la réintroduction **(Di Sabatino et al., 2007)**.

La diversité des symptômes représente un défi pour les praticiens qui ne sont pas familiers avec la maladie cœliaque. Dans la pratique, le diagnostic des maladies cœliaques repose sur des biopsies intestinales et la présence concomitante d'une sérologie positive **(Smecuol et Bal, 2011)**.

### **I.6.4. Traitement**

Il n'existe aucun traitement médicamenteux contre la maladie. Seule une diète sans gluten permet de diminuer, voire supprimer, les symptômes, de pallier les carences et de prévenir d'éventuelles complications. Le régime sans gluten doit être poursuivi à vie. Le gluten est présent sous différentes formes dans les produits du commerce, ces traces peuvent être évidentes dans la farine ou masquées dans les excipients de médicaments ce qui rend ce régime compliqué et contraignant **(Weber., 2012)**.

L'objectif du régime sans gluten chez les cœliaques est double ; d'une part corriger les anomalies cliniques, biologiques, histologiques de la maladie et d'autre part diminuer le risque de complication néoplasique à long terme notamment le lymphome hodgkin de l'intestin grêle **(Hager et al., 2012 ; Lucisano et al., 2012)**.

Une supplémentation vitaminique, en fer, en folates, en calcium et en vitamine D est souvent nécessaire à la phase initiale du traitement (**Farell et al., 2002**).

L'application du régime alimentaire sans gluten se heurte à de nombreuses difficultés. Il est beaucoup plus coûteux et le surcoût des produits de substitution en particulier pour les milieux modestes est très élevé (**Stevens et Rashid, 2008 ; Thompson et al., 2005 ; Boukezoula, 2016**).

De plus, les produits sans gluten ne sont pas pris en charge par la sécurité sociale algérienne (**Berrah et al., 2000**). La faible palatabilité est due à la mauvaise qualité des produits sans gluten commercialisés sur le marché Algérien (**Benatallah, 2009**).

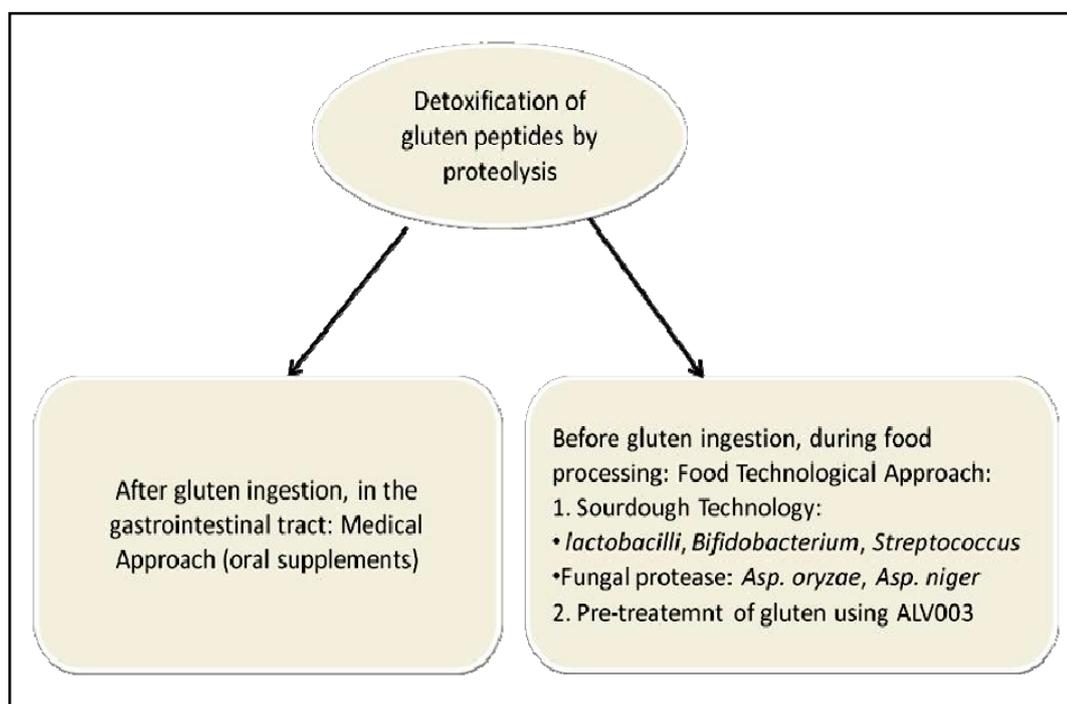
Le problème principal rencontré dans la préparation des aliments destinés aux cœliaques lors de la substitution du blé par le maïs et le riz, est la difficulté d'obtenir une pâte qui tienne. Ceci est essentiellement dû au fait que les produits de substitution (maïs et riz) sont exempts de gluten. Ce dernier, est un déterminant majeur des caractéristiques rhéologiques de la pâte, telles que l'élasticité, l'extensibilité et la capacité de rétention de gaz carbonique produit lors de la fermentation dans le cas de la panification (**Lazaridou et al., 2007**).

Les enfants sont souvent attirés par le pain et les pâtisseries contenant du gluten et leur régime est difficile à suivre dans les cantines scolaires et les collectivités. Le manque d'appétit est lié à la prise individuelle des repas, donc la perte du plaisir lors des prises alimentaires collectives (**Khalafalla et Bushara, 2005 ; Hadjivassiliou et al., 2010**).

### **I.7. Utilisation des enzymes digestives pour les malades cœliaques**

La digestion incomplète des protéines du gluten par les enzymes digestives libère des peptides immunogènes qui peuvent pénétrer dans la muqueuse. De nouvelles enzymes ont été identifiées qui sont actives dès l'estomac et permettent une digestion plus efficace du gluten. ALV003, combine EB-P2 une cystéine-protéase dérivée de l'orge à la prolyl endopeptidase de *F. meningosepticum* initialement (**Gass et al., 2007**).

D'autres enzymes d'origine différente ont été proposées et qui sont actives dès l'estomac. Leur efficacité a été testée de façon originale dans un modèle mécanique de tractus gastro-intestinal en l'administrant simultanément avec une tranche de pain ou un repas type « fast-food » (**Stepniak et al., 2006**) (voir figure 06).



**Figure 06.** Deux enzymes d'hydrolyse le gluten (ALV003: est un mélange de deux glutenases; une endoprotéase cystéine de germination des graines d'orge (EP-B2) et prolyl endopeptidase de *Sphingomonas capsulata* (SC-PEP); Asp: *Aspergillus* (M'hir *et al.*, 2012).

## II. Les protéases

### II.1. Définition des protéases

Les protéases, protéinases ou peptidases, sont aussi appelées enzymes protéolytiques ou hydrolases. Elles sont rassemblées dans le groupe des enzymes catalytiques et constituent un des plus grands groupes utilitaires des protéines (**Kirti et al., 2012**).

Les protéases sont des enzymes qui catalysent des réactions hydrolytiques dans lesquelles les molécules de protéines sont dégradées en peptides et acides aminés, aussi elles peuvent catalyser plusieurs réactions métaboliques. Elles interviennent dans toutes les réactions vitales (**Sumantha et al., 2006**).

### II.2. Sources de protéases

Les protéases sont largement distribuées dans l'environnement. Le taux le plus élevé (43,85 %) est extrait des végétaux, suivi par les bactéries (18,09 %), les moisissures (15,08 %), les animaux (11,15 %), les algues (7,42 %) et les virus (4,41 %) (**Raghunath et al., 2010**).

De nos jours, les enzymes issues des plantes et des animaux, la plupart du temps des protéases, sont toujours sur le marché et certaines d'entre elles sont d'importance commerciale mais la plus grande part du marché mondial des enzymes industrielles est occupée par des enzymes protéolytiques d'origine microbienne (**Illanes, 2008**).

#### II.2.1. Protéases végétales

Les protéases peuvent être extraites de plusieurs parties de la plante : racines, graines, fleurs, tiges, fruits, ...etc. Parmi les protéases d'origine végétale les mieux connues sont : la papaïne, la bromélaïne, la ficine et les kératinases (**Kirti et al., 2012**).

##### II.2.1.1. Papaïne

Elle a un poids moléculaire de 25 kDa (**Sumantha et al., 2006**). Elle est extraite du latex des fruits de *Carica papaya*, cette protéase végétale est traditionnellement utilisée surtout dans l'industrie des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisées qui sont actifs entre un pH 5 et 9 (**Jisha et al., 2013**).

##### II.2.1.2. Bromélaïne

Elle est extraite à partir de l'ananas (*Ananas comosus*) et elle est moins thermostable que la papaïne (**Sumantha et al., 2006**).

### II.2.1.3. Ficine

Elle est issue de la figue (*Ficus glabrata*) (Singh *et al.*, 2004 ; Raghunath *et al.*, 2010).

### II.2.1.4. Kératinases

Elles produites par certains groupes de plantes pour dégrader les cheveux et la laine. Cette digestion est importante pour la production des acides aminés essentiels, tels que la lysine, et pour la prévention du colmatage des systèmes de traitement des eaux usées (Kirti *et al.*, 2012).

## II.2.2. Protéases animales

La plupart des protéases d'origine animale sont pancréatiques: la trypsine, la chymotrypsine, la pepsine et la rénine. 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 auto-catalytique dans des conditions bien déterminées (Kirti *et al.*, 2012).

### II.2.2.1. Trypsine

Elle a un poids moléculaire de 23,3 kDa, c'est une protéase a sérine (Kirti *et al.*, 2012). Elle est la principale enzyme digestive intestinale responsable de l'hydrolyse des protéines alimentaires. L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du gout très amer qu'elle entraîne (Jisha *et al.*, 2013).

### II.2.2.2. Chymotrypsine

Elle a un poids moléculaire de 23,8 kDa (Kirti *et al.*, 2012). Elle est préparée par des extraits pancréatiques de chymotrypsine animale pure. C'est une enzyme très couteuse, elle est utilisée uniquement pour les applications de diagnostic et d'analyse (Jisha *et al.*, 2013).

### II.2.2.3. Pepsine

Elle a un poids moléculaire de 34,5 kDa (Kirti *et al.*, 2012). C'est une protéase acide présente dans l'estomac de presque tous les vertébrés. Seules les pepsines bovines et porcines présentent un intérêt industriel (Jisha *et al.*, 2013).

### II.2.2.4. Rénine

Elle a un poids moléculaire de 30,7 kDa), appelée aussi *pepsin-like* protéase ou chymosine (Kirti *et al.*, 2012), c'est une constituante majeure de la présure utilisée en

industrie laitière comme agent principal de caillage du lait (**Jisha et al., 2013**). La rénine est une protéase aspartique, elle a la propriété de couper la liaison entre la phénylalanine et la méthionine dans la  $\kappa$ -caséine pour générer une *para*- $\kappa$ -caséine et un glycopeptide C-terminal (**Adinarayana et al., 2003 ; Raghunath et al., 2010**).

### II.2.3. Protéases microbiennes

Les microorganismes représentent une excellente source d'enzymes du fait de leur diversité biochimique et susceptibilité génétique. Les protéases microbiennes sont préférées à celles des autres sources car elles possèdent presque toutes les caractéristiques désirées pour leurs applications biotechnologiques. Elles sont produites par une grande variété de bactéries, de moisissures et de levures. Elles représentent 40 % des enzymes du marché mondial (**Gupta et al., 2002 ; Raghunath et al., 2010 ; Kiran et al., 2012**).

#### II.2.3.1. Protéases bactériennes

La plupart des protéases commercialement disponibles, principalement les protéases neutres et alcalines, sont dérivées de bactéries, en particulier de souches de *Bacillus* à titre d'exemple les espèces: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus subtilis* (**Sinsuwan et al., 2008 ; Madhavi et al., 2011 ; Kirti et al., 2012**). Les protéases neutres bactériennes sont actives dans une gamme de pH étroite (de pH 5 à 8), elles produisent moins d'amertume dans l'hydrolyse des protéines alimentaires. Les protéases alcalines bactériennes sont caractérisées par leur haute activité à un pH alcalin, par exemple pH 10 et une température optimale autour de 60 °C (**Kirti et al., 2012**).

#### II.2.3.2. Protéases fongiques

Une large variété des protéases sont élaborées par les moisissures. Les enzymes d'origine fongiques sont des enzymes extracellulaires, produites dans le milieu de fermentation ce qui permet leur séparation, du mycélium, par une simple filtration. Elles sont actives dans une large gamme de pH (de pH 4 à 11) (**Wu et al., 2006 ; Jisha et al., 2013**).

Les protéases fongiques acides ont un pH optimal entre 4 et 4,5 et sont stables entre un pH 2,5 et 6. Elles sont particulièrement utilisées dans l'industrie des fromages. Les protéases fongiques neutres sont des métalloprotéases actives à pH 7, utilisées dans l'industrie alimentaire, des tanneries et pharmaceutique, elles sont inhibées par des agents chélateurs (**Kirti et al., 2012**).

### II.2.3.3. Protéases de levures

Certaines levures produisent aussi des enzymes protéolytiques, il s'agit essentiellement du genre *Saccharomyces* qui, par exemple, produit trois types des protéases, une protéase sérine, une protéase aspartique et une métalloprotéase. L'activité protéolytique de ce genre est utilisée particulièrement pour l'affinage des fromages (**Raghunath et al., 2010**).

### II.2.3.4. Protéases virales

Les protéases virales ont gagné une importance particulière due à leur participation dans le traitement des virus qui causent certaines maladies fatales, telles que le sida et le cancer (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

## II.3. Nomenclature et classification des protéases

Selon la classification de la commission d'enzyme (EC) les protéases appartiennent au groupe 3 (hydrolases) et au sous-groupe 4 (qui hydrolysent les liaisons peptidiques), ce qui leur donne le code (EC 3:4, 11-19, 20-24, 99) (**Sumantha et al., 2006 ; Jisha et al., 2013**).

Les protéases sont aussi distinguées par la présence ou l'absence de groupements chargés dans les positions relatives au site de liaison, et sont classées sur la base de plusieurs critères : leur pH optimum (acide, neutre ou alcalin), leur substrat spécifique comme exemple : les collagénases, kératinases, élastases,...etc, ou leur homologie de bien étudier les protéines comme exemple : la tripsine, la pepesine,...etc (**Sumantha et al., 2006**).

## II.4. Différents groupes de protéases

Les protéases sont généralement subdivisées dans deux groupes majeurs (**Lopes et al., 2008 ; Raghunath et al., 2010**).

### II.4.1. Exopeptidases

Les exopeptidases agissent seulement sur les liens peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité, N ou C terminale, elles sont classées, respectivement, en amino et carboxypeptidases (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

#### II.4.1.1. Aminopeptidases

Les aminopeptidases agissent à l'extrémité N libre terminale de la chaîne polypeptidique et libèrent un seul acide aminé, un di ou un tripeptide. Elles sont des enzymes

intracellulaires, leur activité dépend souvent de la présence d'ions métalliques et elles sont produites par une large variété des espèces microbiennes (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

#### **II.4.1.2. Carboxypeptidases**

Les carboxypeptidases agissent à l'extrémité C terminale de la chaîne peptidique et libèrent un seul acide aminé, un di ou un tripeptide. Elles sont divisées, selon la nature des acides aminés dans le site actif, en 3 groupes: carboxypeptidases de la sérine, de la cystéine et de métallopeptidases (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

#### **II.4.2. Endopeptidases**

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique. Elles représentent la plupart des enzymes utilisées industriellement (**Kumar et al., 2008 ; Kirti et al., 2012**). Celles-ci sont divisées, sur la base du mécanisme catalytique, en quatre familles: les protéases sérines, les protéases cystéines, les protéases aspartiques et les métalloprotéases. Ces dernières forment le groupe de protéases le plus varié. Les propriétés analytiques de ces quatre types de protéases sont rassemblées dans le tableau 01 (**Raghunath et al., 2010**).

##### **II.4.2.1. Protéases sérines**

Les protéases sérines sont très répandues dans la nature, aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Parmi ces protéases, on trouve la chymotrypsine, la trypsine, l'élastase et la subtilisine. Elles ont un groupe de sérines au niveau du site actif et sont généralement de faibles poids moléculaire (entre 18,5 – 35 kDa). Ces protéases sont actives à pH neutres et alcalins, avec un optimum se situant entre 7 et 11 (**Kirti et al., 2012**). Elles sont inhibées par le di-isopropyle fluorophosphate (D.F.P.) et le phényle méthyle suphonyle fluoride (P.M.S.F.), et aussi inhibées par les agents avec un groupement thiols, tels que le *p*-chloromercure benzoate (*p*C.M.B.) (**Raghunath et al., 2010**).

##### **II.4.2.2. Protéases cystéines**

L'activité catalytique de ces protéases nécessite la présence d'histidine, d'aspartate et de la cystéine. Elles comprennent, entre autres, la papaïne, la bromélaïne, la ficine et les cathepsines (B, L et H) du complexe lysosomal qui participent au renouvellement des protéines dans la cellule. La plupart de ces enzymes sont actives à pH entre 5 et 8, et aussi

activées par les agents réducteurs, tels que le cyanide de potassium ou la cystéine, le dithiothreitol et l'(E.D.T.A.). Les protéases cystéines sont sensibles aux agents sulfurés, tels que le *p*C.M.B., la tosyl-L lysine chlorométhyle kétone (T.L.C.K.), l'acide iodoacétique, l'iodoacétamine et les métaux lourds (**Raghunath *et al.*, 2010 ; Kirti *et al.*, 2012**).

#### II.4.2.3. Protéases aspartiques

Les protéases aspartiques sont des enzymes répandues chez les eucaryotes: les champignons ou les vertébrés, mais elles sont rarement retrouvées chez les bactéries et les protozoaires (**Kirti *et al.*, 2012**).

Généralement les protéases aspartiques ont un poids moléculaire de 30 à 45 kDa. La pepsine et la chymosine (rénine) appartiennent aussi à cette famille. Toutes ces enzymes sont caractérisées par la présence de deux résidus essentiels d'aspartate et sont inhibées par la pepstatine ou par des époxydes en présence d'ions cuivre. Les protéases aspartiques sont caractérisées par leur activité maximale à de faibles pH (entre 3 et 4) et leur insensibilité aux inhibiteurs des trois autres groupes d'enzymes. La plupart des protéases aspartiques fongiques sont instables à des pH supérieurs à la neutralité (**Raghunath *et al.*, 2010**).

#### II.4.2.4. Métalloprotéases

Les métalloprotéases sont des hydrolases qui contiennent des cations métalliques dans leur site actif, généralement du zinc. L'atome de zinc est essentiel pour l'activité enzymatique. Elles sont caractérisées par l'exigence en cations divalent, requis pour stabiliser la structure de la protéine (**Kirti *et al.*, 2012**). La plupart des métalloprotéases bactériennes et fongiques contiennent du zinc (**Jakubowski, 2001 ; Beynon et Oliver, 2004**).

Les métalloprotéases de ce groupe ont un pH optimum se situant entre 5 et 9. Les métalloprotéases neutres montrent une haute spécificité vers les acides aminés hydrophobes et sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts, comme exemple l'éthylène diamine tétra acétate (E.D.T.A.) ou la phénanthroline (**Raghunath *et al.*, 2010**).

**Tableau 01.** Propriétés analytiques des quatre types de protéases (Raghunath *et al.*, 2010).

Propriétés	Protéases sérines	Protéases cystéines	Protéases aspartiques	Métalloprotéases
<b>Ancien nom</b>	Protéases sérines	Thiol protéases	Carboxyl protéases	Métalloprotéases
<b>Nomenclature</b>	3.4.21	3.4.22	3.4.23	3.4.24
<b>Site actif</b>	Sérine	Cystéine	Aspartate	Zn <sup>++</sup>
<b>pH optimum</b>	7-11	5-8	3-4	5-9
<b>Température optimale (°C)</b>	20-80	25-55	50-70	65-85
<b>Masse moléculaire (kDa)</b>	18-35	34-65	30-45	19-37
<b>Inhibiteurs</b>	P.M.S.F., D.F.P.	<i>p</i> C.M.B., E.D.T.A.	Pepstatine	E.D.T.A.
<b>Sources</b>	<i>Bacillus</i> <i>Aspergillus</i> <i>Tritirachium</i> <i>album</i>	<i>Aspergillus</i> <i>Sreptococcus</i> <i>Clostridium</i> Latex des fruits (figue, ananas)	<i>Aspergillus</i> <i>Mucor</i> <i>Penicillium</i> Tissue animale (estomac)	<i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Streptomyces</i> <i>Penicilium</i> <i>Aspergillus</i>

\*D.F.P : Di-isopropyle fluorophosphate

\*E.D.T.A : éthylène diamine tétra acétate

\*kDa: kilo dalton

\*P.M.S.F: phenyl methyl sulfonyl fluoride

\**p*C.M.B: *p*-chloromercure benzoate

## II.5. Mode d'action des protéases

Le mode d'action des protéases diffère d'une enzyme à l'autre par la nature de leur site actif, bien qu'elles aient toutes le même principe de base. Ce processus catalytique est résumé en trois étapes:

\* dans les deux premières étapes, l'enzyme déforme la liaison peptidique et renforce la polarité du carbonyle, ce qui facilite son attaque nucléophile conduisant ainsi à la formation d'une liaison covalente transitoire entre la fraction portant le carbonyle du substrat et l'enzyme avec la libération d'une autre fraction (c'est le premier produit) protonée par un proton cédé d'un résidu enzymatique ;

\* dans la troisième étape, une nouvelle substitution nucléophile est exercée par le OH<sup>-</sup> d'une molécule d'eau et libère, ainsi, le deuxième produit de la réaction, où le site actif de l'enzyme se trouve régénérer par un proton (de l'H<sub>2</sub>O) (**Raghunath et al., 2010**).

## II.6. Inhibiteurs de protéases

Les inhibiteurs de protéases sont des protéines très répandues dans la nature, en général de petites tailles moléculaires (de 3 à 47 kDa), monomériques ou multimériques. Ils sont présents chez les animaux, les plantes et les micro-organismes. La nomenclature actuelle répartit les inhibiteurs de protéases dans 21 familles, dans la plupart des cas, les membres d'une sous famille d'inhibiteurs sont dirigés contre des protéases cibles possédant le même mécanisme catalytique (**Raghunath et al., 2010**).

Il existe très peu d'inhibiteurs bifonctionnels, où les deux domaines, hétérologues, inhibent deux enzymes de classes différentes. Deux cas sont décrits: l'inhibiteur qui inhibe une trypsine et une  $\alpha$ -amylase, et l'équistatine qui est isolée d'une anémone de mer, et inhibe simultanément les enzymes de la famille de la papaïne et de la cathepsine D (protéase acide) (**Birk, 2003 ; Raghunath et al., 2010**).

## II.7. Fonctions physiologiques des protéases

Les protéases jouent un rôle dans beaucoup de processus physiologiques et pathologiques tel que la coagulation du sang, l'arrangement du tissu, l'inflammation, l'augmentation de la teneur métastase et le transport des protéines sécrétées à travers les membranes. Elles peuvent réaliser aussi une grande variété de fonctions physiologiques complexes (régulatrices et métaboliques) (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

En générale, les protéases extracellulaires catalysent les réactions hydrolytiques des protéines en petits peptides pour une ultérieure absorption par les cellules, dont les protéases intracellulaires jouent un rôle critique dans le réglage du métabolisme (**Raghunath *et al.*, 2010 ; Kirti *et al.*, 2012**)

## II.8. Applications industrielles des protéases

Les protéases occupent une grande part du marché des enzymes industrielles, soit environ 60 % (figure 07) (**Ahmad et Ansari, 2013**). Les principaux secteurs industriels employant des protéases sont les fromageries, les boulangeries, l'usage médical et pharmaceutique, les détergents, l'industrie chimique et les tanneries (tableau 02).

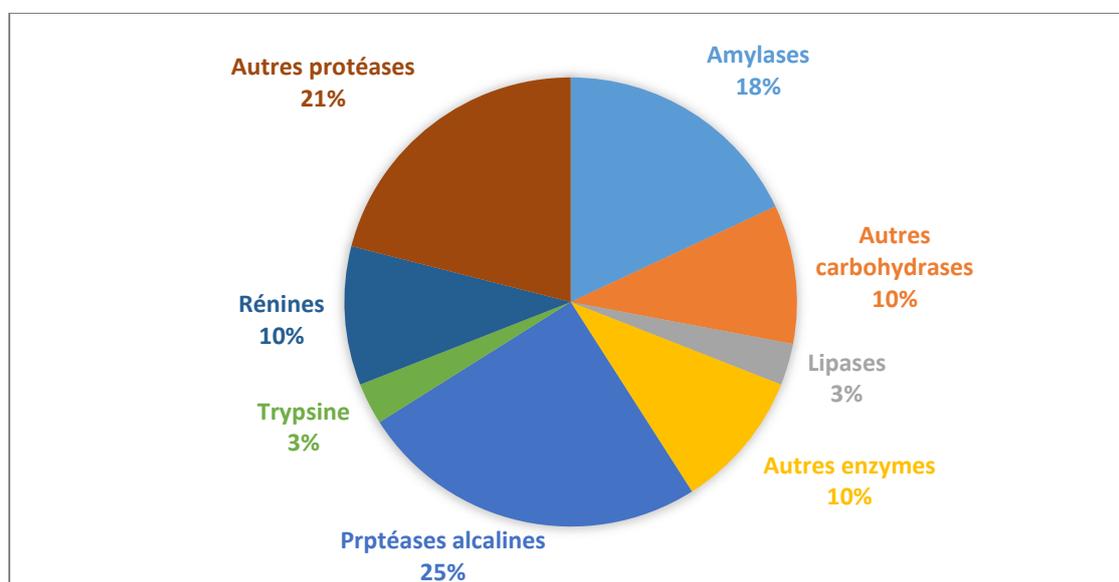


Figure 07. Distribution des ventes des enzymes (**Ahmad et Ansari, 2013**).

**Tableau 02.** Quelques protéases et leurs applications industrielles (**Ragunath et al., 2010**).

<b>Industries</b>	<b>Applications</b>	<b>Enzymes</b>
<b>Tannerie</b>	Rabattre de cuirs Épilation des peaux	Trypsine Autre protéases
<b>Boulangerie</b>	Modification des protéines (protéine de soja ou gluten du blé)	Plusieurs protéases
<b>Fromageries</b>	Coagulation des protéines du lait (production du fromage) Production des enzymes qui modifient le fromage (traitement du lactosérum) Remplacement de rénine des veaux Composant actif de la présure des veaux	Rénine de veaux et autres  Trypsine, Chymotrypsine, Ficine Protéases fongiques Chymotrypsine
<b>Détergents</b>	Utilisation intensive dans les détergents à lessive pour l'élimination des taches de protéines	Protéases alcaline
<b>Viande</b>	Attendrissage de la viande	Papaïne, Protéases fongiques
<b>Boissons</b>	Élimination de la turbidité	Papaïne
<b>Confiseries</b>	Hydrolyse inverse dans la synthèse de l'aspartame	Thermolysine
<b>Pharmaceutique</b>	Élimination des tissus morts et la dissolution des caillots de sang Traitement de certains types de maladies Conversion de l'insuline de porc Production de l'insuline humaine	Trypsine  Chymotrypsine Carboxypeptidase Trypsine

### II.8.1. Industrie alimentaire

Au cours des fermentations alimentaires, ce sont les enzymes des cellules microbiennes qui provoquent les modifications complexes observées. Il est également possible de faire intervenir des enzymes seules, en l'absence de toute cellule vivante. Ces enzymes microbiennes jouent plusieurs rôles dans les productions alimentaires industrielles (**Spinnler, 2008**).

Les industries alimentaires constituent le principal domaine d'application des protéases microbiennes en technologies enzymatiques (**Spinnler, 2008 ; Raghunath et al., 2010**). Les principales industries alimentaires utilisant les protéases sont:

#### **II.8.1.1. Fromageries**

L'industrie fromagère emploie une quantité importante de protéases. Les protéases employées sont surtout des protéases acides (**Abhijit, 2012**).

La majorité des protéases employées sont produites par *Mucor* sp., *Bacillus subtilis* et *Endothica parasitica*. Elles sont utiles pour la coagulation des protéines du lait. La présure de veau a longtemps été l'enzyme utilisée à cette fin. Cependant, elle est de moins en moins utilisée car elle provient du système digestif de très jeunes veaux. Comme il n'est pas économiquement viable de tuer les veaux aussi jeunes, elle tend à être remplacée par des protéases microbiennes (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

Les protéases fongiques acides, alcalines et neutres, produites par *Aspergillus oryzae* ont également été utilisées en industrie laitière (**Sumantha et al., 2006 ; Aguilar et al., 2008**).

#### **II.8.1.2. Boulangeries**

La farine de blé est très utilisée en boulangerie. Cette farine contient du gluten, une protéine insoluble, qui est responsable des propriétés de la pâte. Les endo et les exo protéinases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées pour hydrolyser le gluten du blé par une protéolyse limitée selon les caractéristiques désirées de la pâte (**Aguilar et al., 2008**).

Le traitement enzymatique de la pâte facilite sa manipulation et permet de réduire le temps de pétrissage. Pareillement, des protéases bactériennes sont souvent utilisées pour améliorer l'élasticité et la force de la pâte (**Aguilar et al., 2008 ; Kirti et al., 2012**).

#### **II.8.1.3. Préparation de produits à base de soja**

Les protéases neutres ou alcalines d'origine fongiques sont utilisées depuis très longtemps pour préparer la sauce de soja, ainsi que d'autres produits à base de soja. Les modifications des protéines du soja par les protéases aident à augmenter leurs propriétés fonctionnelles. Ainsi, le traitement de ces protéines par la protéase alcaline "*alcalase*" à pH 8 permet la mise au point d'hydrolysats solubles avec des propriétés nutritives très intéressantes. Ces hydrolysats sont utilisés comme additifs protéiniques dans les jus et les boissons fruitées et dans la formulation des aliments diététiques (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

La Kojizyme™ est un complexe d'exopeptidases et d'endopeptidases dérivées d'*Aspergillus oryzae* utilisée dans la fermentation de la sauce du soja (**Sumantha et al., 2006**).

#### II.8.1.4. Synthèse de l'aspartame

L'aspartame est un dipeptide composé d'un résidu acide L-aspartique et d'un résidu L-phénylalanine. La configuration en *L* de la molécule est responsable du goût sucré. Le maintien de cette configuration est donc crucial, mais engendre des coûts très importants lorsque des méthodes de synthèses chimiques sont employées (**Raghunath et al., 2010**).

La synthèse enzymatique de l'aspartame est donc préférable. Si les protéases sont considérées comme des enzymes hydrolytiques, elles peuvent parfois catalyser la réaction inverse, sous certaines conditions cinétiquement contrôlées. Une préparation immobilisée de thermolysine, provenant de *Bacillus thermoprotolyticus*, est utilisée pour la synthèse de l'aspartame (**Leisola et al., 2001 ; Raghunath et al., 2010**).

#### II.8.1.5. Attendrissement de la viande

Les protéases jouent un rôle prédominant dans l'attendrissement de la viande de bœuf. Une élastase alcaline et une protéase alcaline thermostable, ont montré leur efficacité à attendrir la viande puisqu'elles possèdent la capacité d'hydrolyser les tissus connectifs ainsi que les fibres protéiques des muscles (**Raghunath et al., 2010**).

Ainsi, l'hydrolysate de la viande est un produit qui a montré d'excellentes propriétés organoleptiques et peut être utilisé en tant qu'additif aromatique dans les concentrés de soupe. Une hydrolyse d'environ 20 % n'a pas montré d'amertume lorsque cette combinaison d'enzymes est utilisée. Ceci pourrait être due au fait qu'une spécificité préférentielle a été favorable quand les métalloprotéinases et les sérines protéinases ont été utilisées simultanément (**Abhijit, 2012**).

La papaïne et certaines enzymes protéolytiques microbiennes, telle que la protéase alcaline d'*Aspergillus oryzae*, sont employées comme des additifs pour augmenter la digestibilité des aliments et l'attendrissement des viandes (**Bekhit et al., 2013**).

#### II.8.2. Industrie pharmaceutique et médicale

La grande diversité et spécificité des protéases est un avantage qui permet à ces enzymes d'être utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques efficaces. Par exemple, des protéases d'*Aspergillus oryzae* sont utilisées comme aide à la digestion chez

certaines individus souffrants de déficits en enzymes lytiques au niveau du système digestif. Également, des collagénases provenant de *Clostridium* sp. ou des subtilisines sont utilisées en combinaison avec des antibiotiques dans le traitement des brûlures, plaies et des ulcères dermiques ; une asparaginase provenant de *Escherichia coli* est utilisée pour éliminer l'asparagine dans la circulation sanguine de certains patients atteints de certaines formes de leucémie ; la brinase (une protéase acide *plasmin-like*) permet l'hydrolyse de la fibrine et le fibrinogène chez les patients souffrant d'une hémodialyse (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

Enfin, une élastotérase provenant de *Bacillus subtilis* peut être utilisée pour le traitement de furoncles, d'abcès et de plaies profondes, et une protéase alcaline ayant une activité fibrinolytique a été utilisée comme agent thrombolytique (**Abhijit, 2012**).

### II.8.3. Industrie des détergents

Les protéases sont ajoutées comme des ingrédients clé dans la formulation des détergents pour usage domestiques (détergents à lessive et à vaisselles), les produits de nettoyage pour usage industriels, pour les lentilles cornéennes et les appareils dentaires. Outre les protéases, les détergents peuvent contenir des lipases, des amylases et des cellulases. Néanmoins, les protéases sont les enzymes les plus utilisées dans les détergents ; la grande majorité sont des protéases sérines alcalines et thermophiles (**Raghunath et al., 2010 ; Kirti et al., 2012**).

Bien que la pepsine soit utilisée depuis 1913, la plupart des protéases actuellement ajoutées dans les détergents sont produites par des souches de *Bacillus* (**Gupta et al., 2002 ; Hajji et al., 2007 ; Kumar et al., 2008 ; Jisha et al., 2013**).

### II.8.4. Tanneries

Les protéases sont utilisées pour leur capacité à libérer les poils et la laine des peaux. Cette opération se fait à des pH élevés (pH 11), et nécessite donc des protéases alcalines, comme celles produites par *Bacillus licheniformis* (**Abhijit, 2012**).

Après l'enlèvement des poils, les peaux subissent le reverdissage, étape essentielle afin de rendre la peau douce et élastique. Les préparations enzymatiques servant pour le reverdissage peuvent contenir des protéases de *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefasciens* ou *Bacillus licheniformis*. Cependant, l'usage des protéases a été limité car

leur emploi est souvent plus coûteux que l'utilisation de produits chimiques. Par contre, l'emploi de produits chimiques comporte plusieurs inconvénients, dont des impacts majeurs sur la sécurité des travailleurs et sur l'environnement. De plus, le traitement des eaux usées de ces industries cause de sérieux problèmes (**Madhavi et al., 2011 ; Abhijit, 2012**).

Par conséquent, l'emploi d'enzymes dans les procédés est maintenant privilégié. De plus, l'amélioration des procédés, la découverte et la mise au point de nouvelles protéases plus performantes permettent l'emploi grandissant des enzymes dans cette industrie (**Gupta et al., 2002 ; Kirti et al., 2012**).

#### **II.8.5. Industrie de la photographie**

Les protéases alcalines sont aussi employées dans les bioprocédés utilisant les films de rayons X usés pour la récupération de l'argent. En effet, ces pellicules contiennent approximativement 1,5 à 2 % d'argent dans leurs couches de gélatine. La pratique conventionnelle de récupération de l'argent consiste à brûler les films ce qui provoque des problèmes de pollution environnementale. Pour cela, l'utilisation des enzymes hydrolytiques permet de recycler non seulement l'argent mais aussi la base en polyester du film (**Abhijit, 2012 ; Jisha et al., 2013**).

L'addition des enzymes protéolytiques à une température de 50 °C et pH 8 dégrade la gélatine rapidement et permet la séparation des particules d'argent, à titre d'exemple la protéase alcaline de *Bacillus subtilis* et *Bacillus coagulans* a décomposé le revêtement gélatineux des films de rayons X usés à partir desquels l'argent a été récupéré (**Kirti et al., 2012**).

#### **II.8.6. Traitement des déchets**

Les protéases sont de plus en plus considérées comme un moyen efficace pour le traitement des rejets industriels, notamment ceux riches en protéines, à titre d'exemple : des protéases alcalines provenant de *Bacillus subtilis* pour le traitement des rejets semi-solides des abattoirs de volailles ; des protéases sont aussi utilisées pour traiter les eaux usées riches en kératine provenant des chaînes d'abattage de volailles ; en outre, une préparation à base d'enzymes de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefasciens* et *Streptomyces* sp. est commercialement disponible pour le nettoyage des drains domestiques (**Ichida et al., 2001 ; Abhijit, 2012 ; Kirti et al., 2012 ; Jisha et al., 2013**).

### II.8.7. Autres applications

La protéase neutre de *Bacillus subtilis* peut être utilisée pour le décreusage de la soie naturelle (Abhijit, 2012 ; Kirti *et al.*, 2012). Les protéases sont employées aussi avec des mélanges d'enzymes hydrolytiques pour dégrader les polymères constitutifs de la matière végétale servant pour l'alimentation animale (Sumantha *et al.*, 2006).

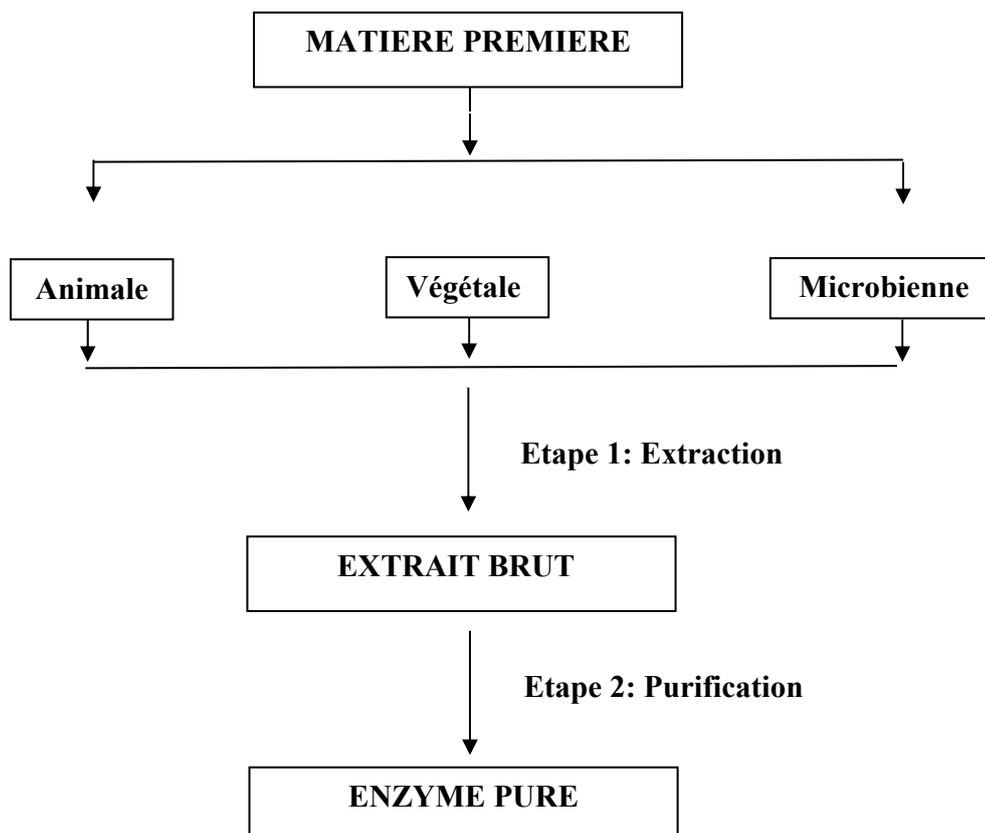
### II.9. Propriétés des enzymes protéolytique

D'après Descamps (2008), on peut résumer les propriétés générales des enzymes protéolytique dans les points suivants:

- Ce sont des biocatalyseurs de nature protéique qui accélèrent une réaction biochimique et se retrouvent intact en fin de réaction;
- Toute enzyme possède une zone particulière appelée site actif. Cette zone se décompose en un site de fixation du substrat (molécule qui sera modifiée par l'action de l'enzyme) et d'un site catalytique;
- La vitesse de réalisation d'une réaction enzymatique se mesure par la quantité de substrat disparaissant par unité de temps ou la quantité de produit formé par unité de temps. La vitesse initiale de catalyse est proportionnelle à la quantité de substrat, et lorsque tous les sites de fixation sont occupés par le substrat, l'enzyme est saturée;
- Les enzymes sont sensibles à de nombreuses modifications environnementales telles que les changements de température et de pH. Toute enzyme possède une température optimale d'activité enzymatique pour laquelle la vitesse initiale de catalyse est maximale. L'enzyme possède également un pH optimal d'activité (le pH modifie en effet la charge ionique des acides aminés, ce qui entraîne une modification de la structure);
- Un seul substrat a une configuration tridimensionnelle complémentaire de celle du site de fixation enzymatique et peut former une liaison temporaire avec celui-ci: il y a spécificité de substrat. La formation du complexe enzyme substrat provoque alors l'activation du site catalytique qui ne permet la réalisation que d'un type de réaction biochimique, qui peut être une condensation, une hydrolyse, un transfert d'électrons ou de groupement ou encore une isomérisation: cela induit une spécificité d'action.

## II.10. Diagramme général d'obtention d'une enzyme

Pour l'isolement d'une enzyme, deux grandes étapes constituent le processus d'obtention de la biomolécule: l'extraction et la purification (figure 08) (Laurent, 1982).



**Figure 08.** Représentation schématique d'un processus d'isolement et de purification d'une enzyme (Laurent, 1982).

### III. *Aspergillus niger*

#### III.1. Définition et caractéristiques générales

##### III.1.1. Les *Aspergillus*

De nombreuses moisissures sont utilisées par l'homme depuis fort longtemps dans la fabrication de certains produits alimentaires. Certaines synthèses sont effectuées à l'échelle industrielle et sont de premières importances telles celles d'enzymes et d'antibiotiques (**Scriban, 1993**).

L'*Aspergillus* est une espèce de champignon, constitué de filaments, présent dans les moisissures. L'*Aspergillus* se retrouve dans le sol, les céréales, les aliments et le compost en décomposition. Leurs spores sont présentes dans l'air et la poussière, et peuvent être ingérés en consommant des fruits. Il existe environ 180 espèces d'*Aspergillus*, qui peuvent être nocifs pour l'être humain, en causant des mycoses, ou l'aspergillose, une infestation des voies respiratoires, potentiellement mortelle (**Samson et Varga, 2007**).

Le genre comprend près de 180 espèces répartis en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (**Botton et al., 1990**).

Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (**Morin, 1994**).

##### III.1.2. *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger*, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes (**Raper et Fennel, 1977**).

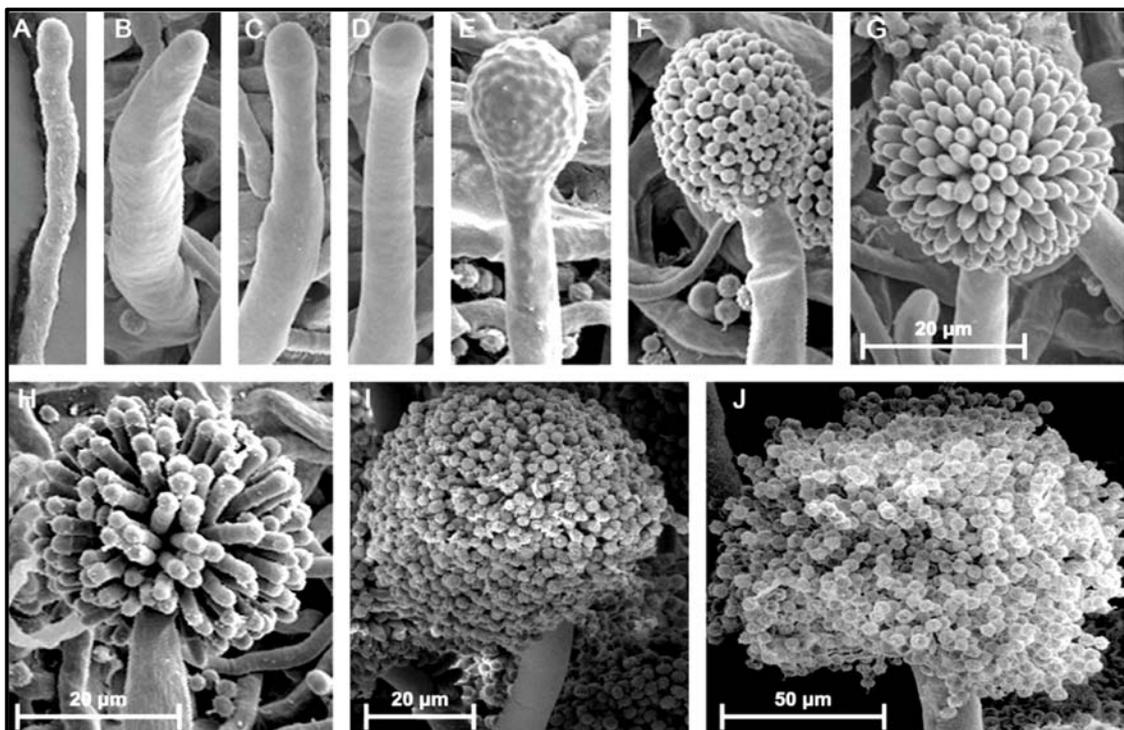
L'*Aspergillus niger* est l'un des espèces de champignons les plus importants économiquement, bien que l'altération des aliments et la production de mycotoxines figurent en tête de ses caractéristiques (**Pitt, 1989**).

Peu d'espèces trouvent des applications industrielles dans le domaine alimentaire et dans l'industrie biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (**Botton et al., 1990**). Les plus importantes probablement *Aspergillus niger*.

### III.2. Croissance et cycle fongique

Dans l'environnement les *Aspergillus niger* sont sous la forme de champignons filamenteux septés et ramifiés: cette forme végétative est appelée mycélium. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium: les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninuclées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides, qui sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement (Quatresous, 2011).

La germination des spores se déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C. Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (Quatresous, 2011) (voir figure 09).



**Figure 09.** Développement d'*Aspergillus niger* surveillés par microscope électronique à balayage (Dijksterhuis et Wösten, 2013).

### III.3. Taxonomie

En raison de son importance économique, l'*Aspergillus* est l'un des genres les mieux décrits du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux. **Al-Musallam, (1980)** a révisé la taxonomie du groupe *Aspergillus niger* en prenant essentiellement les caractéristiques morphologiques en compte. Elle reconnut sept espèces dans ce groupe (**Schuster et al., 2002**).

La position systématique d'*Aspergillus niger* est résumée comme suivant (**Alexopoulos et Mims, 1979 ; Bocquet, 1993**).

Règne: Mycètes

Embranchement: Amastigomycota

Sous-embranchement: Deuteromycotina

Classe: Deutoromycètes

Ordre: Moniliales

Famille: Moniliaceae

Genre: *Aspergillus*

Espèce: *Aspergillus niger*

### III.4. Ecologie

De nombreux *Aspergillus* noirs ont été isolés du monde entier. *Aspergillus niger* est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose sur la matière organique. Dans la nature, on le trouve dans le sol, le compost et les zones sombres et humides; aussi on le trouve dans les denrées alimentaires; les céréales, les arachides et dans le matériel végétal (fruits et légumes) en décomposition (**Dijksterhuis et Wösten, 2013**).

*Aspergillus niger* est capable de croître dans la plage température large de 6-47°C avec une température relativement élevée avec un optimum de 35 à 37°C. La limite d'activité de l'eau pour la croissance est 0,88 (aw) qui est relativement élevée comparativement aux autres espèces d'*Aspergillus*. *Aspergillus niger* peut pousser sur une très large gamme de pH:1,4-9,8 (**Schuster et al., 2002**).

Ces capacités et l'abondante production de conidies, qui sont distribués par l'intermédiaire de l'air, garantissent l'occurrence omniprésente de l'espèce, avec une fréquence plus élevée aux lieux chauds et humides (**Schuster et al., 2002**).

### III.5. Morphologie

#### III.5.1. Caractères culturels

*Aspergillus niger* pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais aussi *Aspergillus niger* peut se développer jusqu'à 42°C (Tabuc, 2007).

Les colonies d'*Aspergillus niger* peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, le mycélium extensif hyalin en grande partie immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires à la maturation (Quatresous, 2011).

En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui est généralement disposées en cercles concentriques (Quatresous, 2011).

Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle, un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes (Tabuc, 2007).

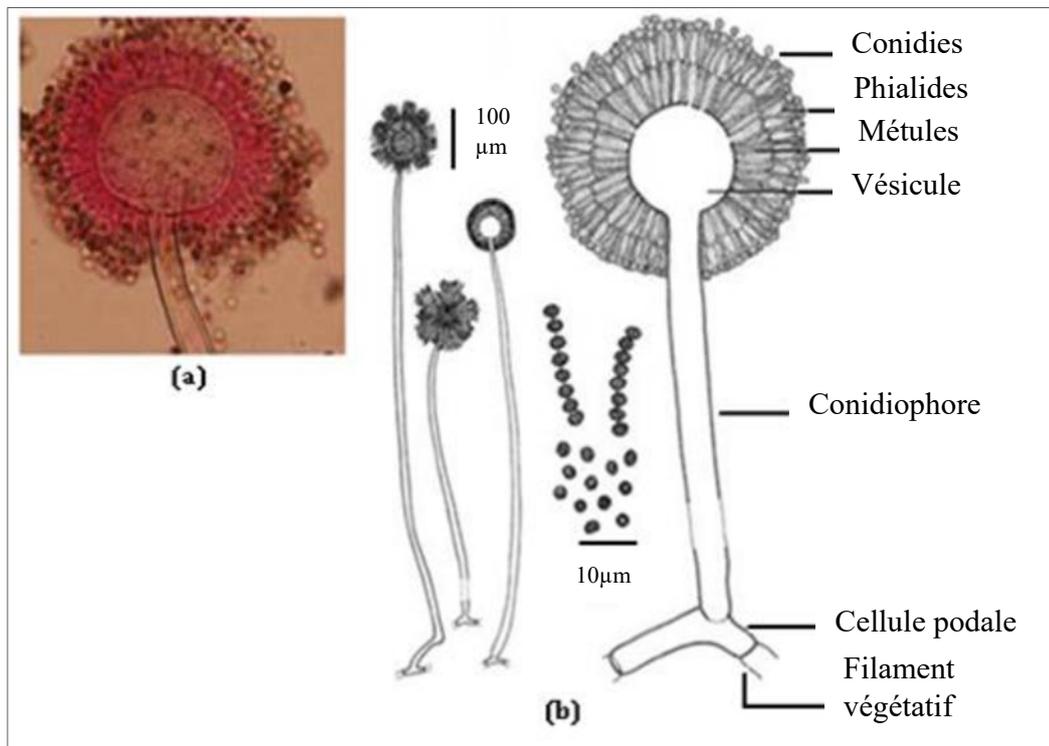
Cette espèce a une croissance rapide, avec un optimum thermique compris entre 25 et 30°C, mais il peut pousser jusqu'à 42°C. Son développement est aussi inhibé par l'actidione (Quatresous, 2011).

#### III.5.2. Aspect microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des têtes conidiennes larges, brun-rouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre).

Les phialides, très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. Les métules et phialides sont légèrement teintées de brun. Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. Elles sont typiquement globuleuses, brunes, échinulées à très verruqueuses, et mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre.

La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées. La tête aspergillaire est donc bisériée radiée, et noire à maturité (Dijksterhuis et Wösten, 2013) (figure 10).



**Figure 10.** Aspect microscopique (a) et représentation schématique (b) de la conidiophore d'*Aspergillus niger* (Pasqualotto, 2010).

### III.6. Importance industrielle d'*Aspergillus niger*

Jusqu'à récemment, les principales applications industrielles des espèces d'*Aspergillus niger* sont appuyées sur l'art traditionnel et les sciences liées à la production d'aliments fermentés, ainsi que sur les procédés classiques de biochimie, microbiologie, génétique et le génie génétique (Ward *et al.*, 2006). Les acides organiques et les enzymes constituent les métabolites d'*Aspergillus niger* les plus importants.

#### III.6.1. Production des acides citriques

*Aspergillus niger* est devenu un organisme industriellement utilisé lorsque l'acide citrique a été tout d'abord produit par fermentation en 1919 (Roukas, 2000 ; Schuster *et al.*, 2012).

L'acide citrique est employé couramment dans une variété d'industries et, en volume des ventes, dépassent largement les autres métabolites tels que l'acide gluconique (Roukas, 2000 ; Schuster *et al.*, 2002).

L'acide citrique est produit presque exclusivement par la fermentation d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus fistulosum* parce que les rendements de ces organismes sont élevés et la formation des produits indésirables tels que l'acide gluconique et l'acide oxalique est minime. La Food and Drug Administration (FDA) a classé *Aspergillus niger* comme source d'acide citrique (21 Code of Federal Regulations §173.280) (Schuster *et al.*, 2002).

### III.6.2. Applications dans l'environnement

Les applications d'*Aspergillus* dans l'environnement sont plutôt limitées. Néanmoins, une souche d'*Aspergillus niger* a été étudiée par différents laboratoires pour la biosorption des métaux lourds (Dursun, 2003).

### III.6.3. Production des enzymes

La richesse de l'arsenal enzymatique des espèces aspergillaires les fait utiliser notamment dans la production d'une large gamme des acides organiques (acide citrique, acide gluconique, acide acétique,...), des enzymes (protéases, lipases, amylases, ...) et des métabolites bioactives tels que les mycotoxines (Abraca *et al.*, 2004 ; Varga *et al.*, 2004 ; Hölker *et al.*, 2004 ; Bouchet *et al.*, 2005 ; Heitman *et al.*, 2007).

*Aspergillus niger* est très largement utilisé dans la production des enzymes commerciales vues les hautes productivités enzymatiques qui peuvent être atteintes (Iwashita, 2002 ; Bakhtiari *et al.*, 2006 ; Aftab *et al.*, 2007 ; Mhetras *et al.*, 2009) (voir tableau 03).

Les principales activités protéolytiques d'*Aspergillus niger* semblent être dues à des protéases extracellulaires acides, ce qui reflète l'adaptation de ce dernier aux milieux de croissance à pH acide (Schuster *et al.*, 2002).

Grâce aux capacités hydrolytiques importantes d'*Aspergillus niger* et sa tolérance à l'acidité (pH<3), il permet d'éviter les contaminations bactériennes au cours des processus biotechnologiques (Jarai et Bouxton, 1994 ; Dekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

**Tableau 03.** Production des enzymes par *Aspergillus niger*.

<b>Enzymes</b>	<b>Microorganisme</b>	<b>Substrat/ milieu</b>	<b>Références</b>
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i> LBA 02	Son de blé, tourteau de soja, graines de coton	De Castro <i>et al.</i> , 2016.
<b>Protéases</b>	<i>A. niger</i> MTCC 281	Son de riz	Paranthman <i>et al.</i> , 2009.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i> LBA 02	Son de blé	De Castro <i>et al.</i> , 2014.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i>	Pelures de l'igname	Oludumila <i>et al.</i> , 2015.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i>	Milieu défini	Edens <i>et al.</i> , 2005.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i>	Son de blé, tourteau de soja, tourteau de tournesol, tourteau de colza, graines de coton	Mukhtar <i>et al.</i> , 2009.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i> FFB1	Son de blé, Milieu Czapek-Dox	Bensmail <i>et al.</i> , 2015.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i>	Son de riz, son de blé, son de noix de coco	Suganthi <i>et al.</i> , 2012.
<b>Protéase</b>	<i>A. niger</i>	Son de blé	Bhatnagar <i>et al.</i> , 2010.
<b>Protéase acide</b>	<i>A. niger</i> BAN3E	Son de riz, son de blé, tourteau de noix de coco, tourteau d'arachides	Suganthi <i>et al.</i> , 2011.
<b>Amylase</b>	<i>A. niger</i>	Son de riz, son de blé, son de noix de coco	Suganthi <i>et al.</i> , 2012.
<b>Amylase</b>	<i>A. niger</i>	Son de blé	Bhatnagar <i>et al.</i> , 2010.

<b>Amylase</b>	<i>A. niger</i> BAN3E	Son de riz, son de blé, tourteau de noix de coco, tourteau d'arachides, tourteau de soja	Suganthi <i>et al.</i> , 2011.
<b>Amylase</b>	<i>A. niger</i> ML-17	Son de blé	Irfan <i>et al.</i> , 2012.
<b>Invertase</b>	<i>A. niger</i> LBA 02	Son de blé, tourteau de soja, graines de coton, zeste d'orange	Ohara <i>et al.</i> , 2015.
<b>Pectinase</b>	<i>A. niger</i>	Zeste d'orange	Tobechukwu <i>et al.</i> , 2014.
<b>Pectinase</b>	<i>A. niger</i> K3	Milieu défini	Rohit <i>et al.</i> , 2013.
<b>Pectinase</b>	<i>A. niger</i>	Son de blé + cosse de riz	Akhter <i>et al.</i> , 2011.
<b>Cellulase</b>	<i>A. niger</i>	Sciure de bois, cellulose	Charitha Devi <i>et al.</i> , 2012.
<b>Keratinase</b>	<i>A. niger</i>	Cheveux humains, poils de porc, farine de plumes, plumes de poulet, corne de boeuf	Lopes <i>et al.</i> , 2011.

*Matériel*  
*et méthodes*

## **I. Matériel biologique**

Le matériel biologique est un champignon appartenant à la classe des Ascomycètes, Il s'agit de l'espèce *Aspergillus niger*.

L'*Aspergillus niger* apparait sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits secs « abricot sec » (pourriture noire), après avoir exposé à l'air ambiant pendant quelques jours dans une chambre.

## **II. Prélèvement et purification de la souche**

### **II.1. Prélèvement**

Le prélèvement de cette espèce a été fait sur les abricots secs au niveau du laboratoire de contrôle de qualité alimentaire à l'aide d'une anse de platine flambée, à proximité d'une zone stérile.

Pour le réaliser, il faut frotter la pourriture noire et ensemercer l'échantillon de moisissure prélevé à la surface d'un milieu de culture « Sabouraud » (annexe 01) contenu dans des boites de pétri.

Avant l'ensemencement, trois gouttes d'acide acétique concentrées à 3% (annexe 01) ont été additionné dans chaque boite comme agent bactériostatique pour éviter la contamination bactérienne (**Delarras, 2007**). Les boites sont ensuite incubées à 30°C pendant 5 jours et sont observées quotidiennement.

### **II.2. Repiquage et purification**

Une partie des colonies a été prélevée et ensemencée dans les boites de pétri à l'aide d'une anse de platine stérile. Par la suite, et par la même méthode que la précédente, des nouvelles boites contenant le milieu de culture « Sabouraud » ont été ensemencées.

La purification a été réalisée par deux repiquages successifs jusqu'à l'obtention des colonies identiques (**Delarras, 2007**).

### **II.3. Méthodes d'identification**

L'identification des moisissures a fait essentiellement appel aux caractères cultureux (identification macroscopique) et à la morphologie (identification microscopique). Elle nécessite souvent l'utilisation de milieux standards favorisant la croissance ou la reproduction et permettant ainsi une expression correcte des caractères à étudier (**Botton et al., 1990**).

### **II.3.1. Critères d'identification macroscopique**

- **Aspect des colonies:** les colonies peuvent être duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (absence ou pauvreté du mycélium aérien).
- **Relief des colonies:** les colonies peuvent avoir un aspect plat ou plissé et la consistance des colonies est variable (molle, friable, élastique ou dure) envahissantes.
- **Couleur des colonies:** est un élément très important d'identification ; les colonies peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, brune allant jusqu'au noir (**Diguta, 2010**).

### **II.3.2. Critères d'identification microscopique**

L'examen microscopique d'une colonie fongique a été fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif (x40), (x100), est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier. Les observations microscopiques permettant l'identification des moisissures sont fondées sur les types de spores. La plupart des organismes ne produisent que des spores asexuées. L'examen permet aussi de déterminer les quatre caractères culturels suivants: la vitesse de croissance, la texture et la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture et l'odeur (**Rinaldi et al., 1998 ; Botton et al., 1999**).

Les moisissures sont conservées à 4°C par la méthode la plus simple et la plus communément utilisée au laboratoire (**Botton et al., 1999**).

### **III. Préparation de l'inoculum**

#### **III.1. Préparation de la suspension des spores**

La récupération des spores a été effectuée à partir des cultures d'*Aspergillus niger* sur milieu Sabouraud incubées à 30°C pendant 5 jours, par l'addition d'une solution stérile de Tween 80 à 0,1% (10 ml/boite de Pétri) (voir annexe 01) (**Agrawal et al., 2005 ; Sandhya et al., 2005 ; Paranthaman et al., 2009 ; Bensmail et al., 2015**).

À l'aide d'une anse de platine stérile, la surface de la gélose a été grattée légèrement afin de mettre en suspension les spores fongiques, qui ont été ensuite filtrées par passage sur papier filtre stérile.

#### **III.2. Dénombrement des spores**

L'estimation du nombre de spores de la suspension fongique a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les lectures photométriques ont été transformées en nombre de spores par cellule de Malassez sous microscope photonique au grossissement (x40) (voir annexe 02), ce qui permet d'établir la courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction du nombre de spores d'*Aspergillus niger* (annexe 03: figure 11). Un millilitre de la suspension de spores contenant  $2 \times 10^6$  spores/ml a été utilisé comme inoculum (**Markwell et al., 1989 ; Bensmail et al., 2015**).

### **IV. Etude du potentiel protéolytique**

#### **IV.1. Inoculation du milieu de fermentation**

Le son de blé a été utilisé comme substrat pour tester quantitativement l'activité protéolytique d'*Aspergillus niger*. Le substrat a été broyé afin de réduire la taille des particules (0,425-0,850 mm), puis conservé dans des boîtes stériles avant l'utilisation, la composition chimique du son de blé utilisé est donnée dans l'annexe 04 (**Sumantha et al., 2005**).

Cinq grammes (5 g) du son de blé broyé supplémenté avec 4 ml du milieu minéral testé ont été introduites dans des erlenmeyers de 250 ml (Taux d'Humidité initial=54%) (Annexe 05). Le milieu minéral testé ayant la composition suivante (% p/v):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1; NaCl 0,1 dont le pH=3 (annexe 01) (**Sumantha et al., 2005 ; Bensmail et al., 2015**).

Les erlenmeyers ont été bouchées avec du coton cardé enveloppé dans un filet de gaze et coiffés de papier aluminium (qui assure une bonne étanchéité et supporte les hautes températures) (Kumar *et al.*, 2005).

Après autoclavage (121°C pendant 15-20 min) et refroidissement, chaque milieu a été inoculé avec 1ml de la suspension de spores d'*Aspergillus niger* dont l'A (650 nm) = 0,782; ce qui correspond à un inoculum de  $1.8 \times 10^6$  spores/ml par référence à la courbe d'étalonnage (annexe 03: figure 11). L'inoculum a été distribué de manière homogène sur le substrat. Les milieuxensemencés ont été ensuite incubés pendant 72 heures à 30°C (Sumantha *et al.*, 2005 ; Bensmail *et al.*, 2015).

#### **IV.2. Extraction de la protéase**

À la fin de la fermentation, la protéase produite par *Aspergillus niger* a été extraite à l'eau distillée. Le son de blé fermenté a été repris dans 50 ml d'eau distillée, ce qui correspond à un rapport de 1:5 (p/v) (Tunga *et al.*, 1999 ; Tunga *et al.*, 2003 ; Sandhy *et al.*, 2005).

Cette opération a été suivie d'une agitation lente pendant 45 min (système d'agitation: STUART SCIENTIFIC). Le mélange a été filtré sur un papier filtre (Kumar *et al.*, 2005).

Le filtrat a été soumis à une centrifugation à 4000 r.p.m pendant 30 min à 4°C, dont le surnageant récupéré représente l'extrait enzymatique brut. Il a été conservé au frais à une température de 4°C (Tunga *et al.*, 2003 ; Sandhy *et al.*, 2005).

#### **IV.3. Dosage de l'activité protéolytique de l'extrait brut**

L'activité protéolytique a été déterminée à partir de l'effet de l'enzyme sur la caséine. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par la protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. Cette quantité de tyrosine libérée, qui peut être mesurée directement par colorimétrie, devient alors une mesure de l'activité de l'enzyme (Tsuchida *et al.*, 1986).

#### **IV.3.1. Courbe étalon de la tyrosine**

Une courbe étalon standard de la tyrosine a été préparée par différentes concentrations de tyrosine allant de 0 à 100 µg/ml, complétées jusqu'à un volume de 1 ml avec l'acide trichloro acétique (TCA) 0,4 M. À cette solution, 5 ml du carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 0,4 M et 1 ml du réactif Folin-ciocalteu à 10 % ont été rajoutés. Le développement de la couleur a été mesuré par spectrophotomètre à 750 nm (**Sathiya, 2013**).

La courbe étalon a été tracée en mettant les concentrations de la tyrosine en micromole par ml sur l'axe des abscisses et l'absorbance à l'axe des ordonnées (annexe 06: figure 12).

Cette courbe a servi pour calculer la quantité de la tyrosine libérée et par conséquent la quantité de l'enzyme peut être estimée.

#### **IV.3.2. Détermination de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut**

L'activité protéolytique a été déterminée selon la méthode de **Tsuchida et al. (1986)**. Le mélange réactionnel contient 1 ml de la caséine (extraction de la caséine à partir du lait écrémé: annexe 07) à 2 % (préparée dans le tampon phosphate pH 7,0) et 1 ml de l'extrait enzymatique brut. Le mélange a été incubé pendant 30 minutes à 40 °C au bain-marie.

La réaction enzymatique a été arrêtée par l'addition de 2 ml de TCA à 0,4 M. le mélange a été ensuite centrifugé à 4500 r.p.m pendant 10 minutes à 4°C. Un millilitre (1 ml) du surnageant a été transféré dans un autre tube dans lequel a été ajouté 5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,4 M et 1 ml du réactif Folin-ciocalteu à 10 %.

Le mélange a été incubé pendant 20 minutes à 40 °C et à l'obscurité. Le blanc a été préparé dans les mêmes conditions, sauf que le TCA a été rajouté avant le substrat. Chaque dosage est reproduit trois fois. L'absorbance a été ensuite mesurée à une longueur d'onde de 750 nm.

Une unité de protéase (UP) est l'équivalent de 1 µg de tyrosine libérée pendant 1h de temps par 1 ml d'une solution d'enzyme.

#### **IV.4. Caractérisation de l'extrait enzymatique brut**

Les caractéristiques de l'enzyme protéolytique produite par *Aspergillus niger* ont été étudiées. Il s'agit de déterminer le pH optimum, la température optimale et la stabilité de l'enzyme à la température optimale.

##### **IV.4.1. Détermination du pH optimum**

Le pH optimum de l'extrait enzymatique brut a été déterminé en réalisant la réaction enzymatique dans des solutions tampons à des pH allant de 1 à 10 (**Belmessikh, 2011**):

-HCl - KCl (0.2 M) (pH 1 et 2).

-Acide citrique - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.1 M / 0.2 M) (pH 3, 4, 5, et 6).

-Phosphate (0.1 M) (pH 7 et 8).

-Glycine - NaOH (0.2 M) (pH 9 et 10).

La préparation des solutions tampon est donnée dans l'(annexe 08).

##### **IV.4.2. Détermination de la température optimale**

La température optimale de l'activité de la protéase a été déterminée en incubant le mélange réactionnel (enzyme-substrat) à différentes températures (30, 40, 50, 60, 70 et 80°C) à pH optimum. Elle a été déterminée en traçant les courbes de l'activité protéolytique en fonction de la température (**Olajuyigbe et Falade, 2014 ; El-Khonezy et al., 2015**).

##### **IV.4.3. Stabilité à la température optimale**

La stabilité de l'enzyme a été déterminée par incubation du mélange réactionnel (enzyme-substrat) à pH optimum et à la température optimale à différents intervalles de temps (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 90 min) (**Belmessikh, 2011; Bellir et al., 2014**).

## **V. Etude de l'action de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine (gluten)**

### **V.1. Extraction des gliadines**

L'extraction a été réalisée à partir de la farine de cinq graines de blé dur, *Triticum durum* et cinq graines de blé tendre, *Triticum aestivum*, broyés au mortier selon la méthode décrite par **Singh et al., (1991)**. Cette méthode est basée sur une extraction séquentielle des protéines de réserve selon leur solubilité (Annexe 09).

L'extraction des gliadines a été réalisée à partir des farines, en ajoutant 1ml de propanol 50% (v/v1). Une incubation pendant 30 min à 65°C, avec deux agitations intermédiaires à l'aide d'un vortex toutes les 10 min ont été réalisés. Une centrifugation finale est ensuite réalisée à 10 000 r.p.m pendant 15 min. La deuxième extraction a été effectuée sans agitations intermédiaires. La fraction de gliadine présente dans le surnageant a été aspirée et évaporée à 65°C pendant 12 h (**Singh et al., 1991 ; Bellir et al., 2014 ; Abed, 2016**).

### **V.2. Incubation de l'extrait enzymatique brut avec la gliadine**

Dix milligrammes (10 mg) de gliadine de blé dur et 10 mg de gliadine de blé tendre ont été respectivement dilués dans 1ml de tampon citrate phosphate (0,1 M) pH =7,5. Le mélange a été rajouté à un 1 ml de l'extrait enzymatique brut puis soumis à une incubation pendant 2 h à 37°C (**Bellir et al., 2014 ; Abed, 2016**). La réaction a été arrêtée par l'ajout de 2 ml de TCA frais (0.4M). L'activité protéolytique du mélange a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 750 nm selon le même protocole décrit précédemment par **Tsuchida et al., (1986)**.

*Résultats*  
*et discussion*

## **I. Isolement et purification de la souche**

L'isolement de la souche a été fait à partir des moisissures (pourritures noires) présentes sur les fruits secs "abricot sec" sur le milieu de culture Sabouraud après avoir ajouté des gouttes d'acides acétiques dans le milieu.

Toujours dans le but d'empêcher la prolifération bactérienne, nous avons additionné l'acide acétique concentré à 3 %. Selon la littérature et les expériences réalisées au laboratoire, l'acide acétique est l'un des antibiotiques typiques et ce grâce à sa stabilité vis-à-vis de la température et la pression (conditions de stérilisation); il se caractérise ainsi par leur large spectre d'action (**Delarras, 2007**).

Ces derniers ont été prouvés par les résultats obtenus lors de l'isolement. Le pouvoir inhibiteur de l'acide acétique et l'utilisation de Sabouraud comme milieu d'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries.

Les petites colonies filamenteuses apparues ont été prélevées et repiquées sur le milieu Sabouraud. Le développement rapide des colonies sur ce milieu reflète sa richesse en éléments nutritifs indispensables. Cette opération est suivie par un deuxième repiquage sur le même milieu qui a permis d'obtenir la moisissure pure.

## **II. Identification de la souche**

L'identification des isolats obtenus étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature, en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium.

Ce type d'étude est primordial pour l'identification de la moisissure (aspect de la colonie, couleur, revers et la vitesse de croissance,...).

### **II.1. Identification macroscopique**

Les caractères macroscopiques de la moisissure isolée ont été étudiés sur milieu Sabouraud. L'étude a été réalisée par des observations à l'œil nu et des mesures quotidiennes. Le tableau 5 résume l'aspect macroscopique de la souche isolée (planche 01: photo 04).

**Tableau 05.** Résultats de l'examen macroscopique de la souche isolée et purifiée.

Milieu	Diamètre de la colonie (mm)	Vitesse de croissance	Couleur de la colonie	Revers
Sabouraud	15-20 mm et peut étendre à 40 mm	rapide	Blanche au début, puis jaune et entièrement noire après la sporulation	incolore à jaune pâle

L'analyse du tableau 05 permet la conclusion suivante:

- \* La souche identifiée pousse rapidement sur le milieu utilisé (Sabouraud),
- \* Les colonies sont granuleuses de teinte noirâtre sur le milieu de Sabouraud,
- \* Le revers de la colonie est incolore à jaune pâle.

En se basant sur les clés d'identification utilisées par **Raper et Fennell (1965)** pour l'identification du genre *Aspergillus*, ces résultats indiquent que la souche appartient au genre *Aspergillus*, ce qui confirme l'étude macroscopique.

## **II.2. Identification microscopique**

L'identification a été fait par un examen microscopique d'une colonie fongique après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle avec une goutte d'huile d'immersion.

Généralement, un examen à l'objectif ( $\times 40$ ), ( $\times 100$ ), ( $\times 400$ ) est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à identifier.

Les résultats obtenus de l'examen microscopique de la souche sélectionnée sont mentionnés dans le tableau 06.

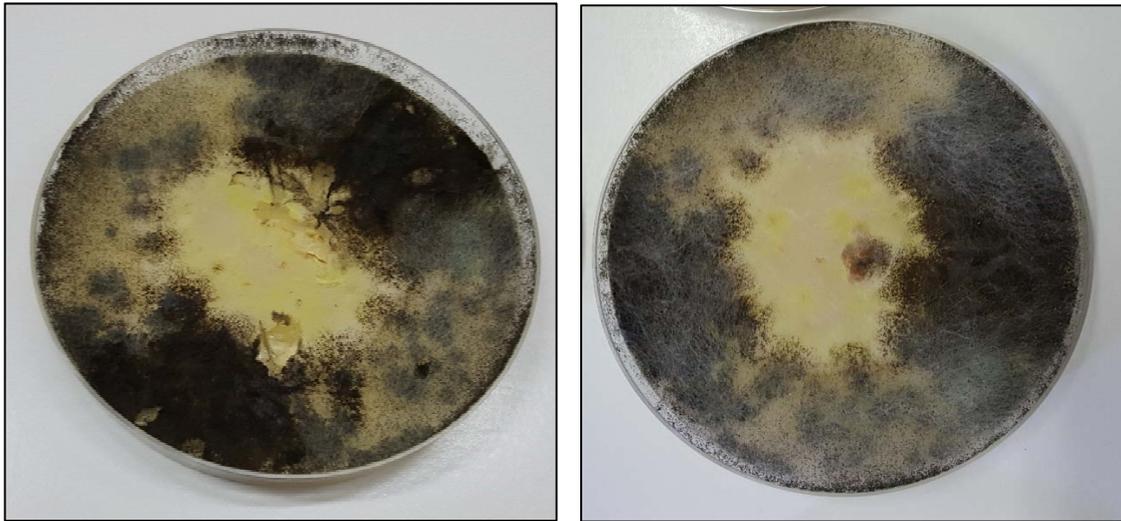
**Tableau 06.** Résultats de l'examen microscopique de la souche isolée et purifiée.

Paramètres	Aspect	Caractéristiques	
		Taille	Couleur
<b>Thalle</b>	ensemble des filaments	/	/
<b>Coniophore</b>	lisse, non ramifié	long, large	Brun
<b>Métules</b>	/	/	Brunâtres
<b>Vésicules</b>	globuleuses	/	/
<b>Phialides</b>	emportées par les visécules	petites tailles	/
<b>Conidies</b>	globuleuses	petites tailles	Brunes
<b>Tête</b>	conidienne radié avec visécule globuleuse	/	brunâtre foncé
<b>Mycélium</b>	filaments septés	/	Jaune
<b>Pigment</b>	absent	/	/

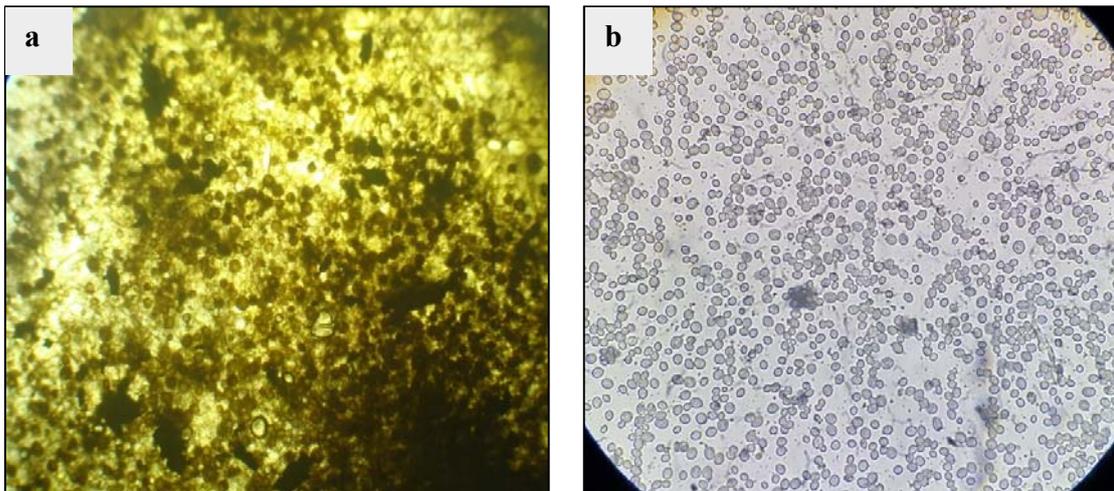
L'analyse de ces résultats permet la conclusion suivante:

- \* des filaments mycéliens septés.
- \* des conidiophores lisses, non ramifiés, longs, larges, à parois épaisses et bruns.
- \* une tête Aspergillaire brunâtre foncé, rayonnante et la vésicule globuleuse.
- \* des phialides de petites tailles par rapport aux métules.
- \* des conidies globuleuses, brunes, échinulée à très verruqueuses.

D'après la bibliographie, L'ensemble de ces structures caractérise l'espèce *Aspergillus niger* ce qui confirme l'étude macroscopique (**Raper et Fennell, 1965 ; Ottaviani *et al.*, 1988 ; Botton *et al.*, 1999 ; Guiraud, 1998 ; Jernejc et Cimerman, 2001 ; Dai *et al.*, 2004 ; Pitt et Hoecking, 2009**).



**Photo 04.** Aspect macroscopique de l'*Aspergillus niger* cultivé sur milieu Sabouraud, Culture âgée de 5 jours (prises personnelles).



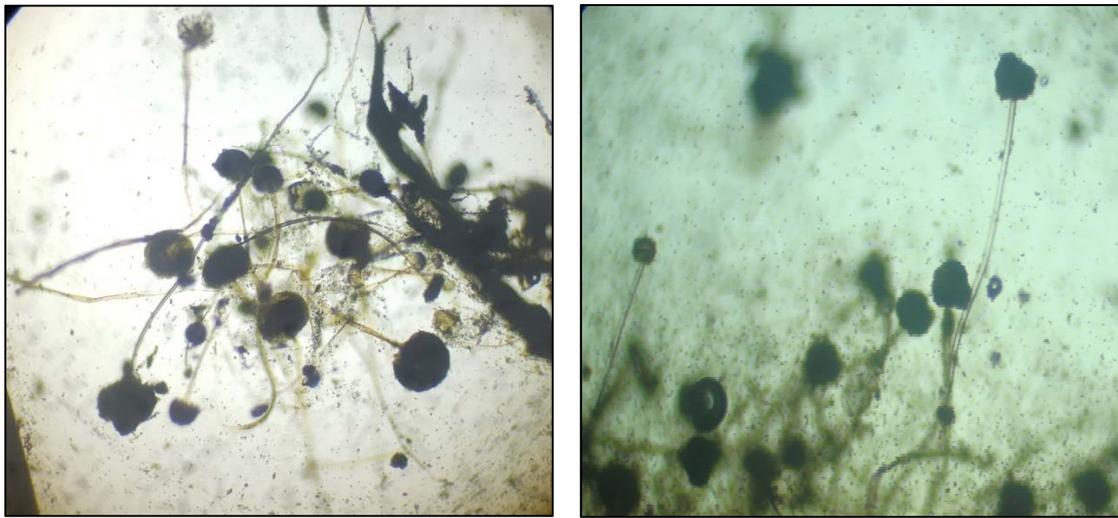
**Photo 05.** Aspect microscopique d'*Aspergillus niger*.

**a:** Aspect microscopique des colonies d'*Aspergillus niger* objectif ( $\times 100$ ).

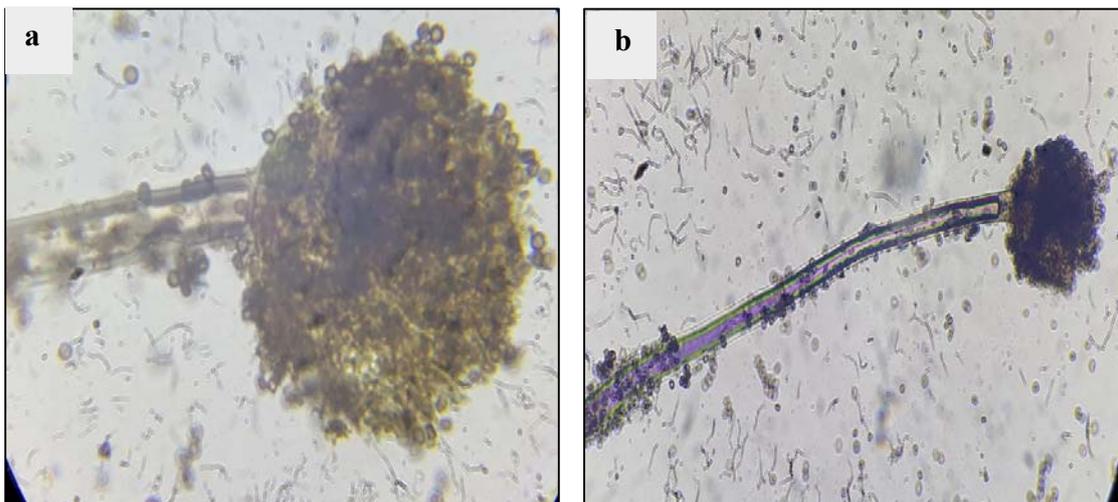
**b:** Aspect microscopique des spores d'*Aspergillus niger* objectif ( $\times 40$ )

(prises personnelles).

**Planche 01.** Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus niger* isolé au laboratoire de CQA de l'université de Tébessa (prises personnelles).



**Photo 06.** Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* objectif ( $\times 40$ ) (prises personnelles).



**Photo 07.** Aspect microscopique d'*Aspergillus niger* (tête et conidiophore).

**a :** Aspect de tête conidienne radiée d'*Aspergillus niger*, objectif ( $\times 100$ )

**b :** Aspect et structure de conidiophore d'*Aspergillus niger*, objectif ( $\times 40$ )

(Prises personnelles).

**Planche 02.** Aspect microscopique des différents éléments importants d'*Aspergillus niger* (prises personnelles).

### **III. Potentiel protéolytique de l'extrait enzymatique brut**

#### **III.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut**

Après revivification et vérification de la souche d'*Aspergillus niger*, la mise en évidence de son activité protéolytique a été effectuée par fermentation sur milieu solide à base de son de blé humidifié et par une solution minérale. Le produit de fermentation est l'extrait enzymatique brut.

Nos résultats ont montrés que l'extrait brut de l'*Aspergillus niger* possède une activité protéolytique de l'ordre de 78,54  $\mu\text{g/ml/h}$  (UP), c'est une activité très élevée par rapport à celle enregistrée par **Paranthman et al. (2009)**, **Sandhya et al. (2005)** et **Bhatnagar et al. (2010)** concernant la même espèce. Ces auteurs ont noté une activité égale à 67.7 UP, 31.2 UP et 54.89 UP respectivement.

L'activité trouvée est par contre très proche à celles trouvée par **Syed et Vidhale. (2013)** concernant l'espèce *Fusarium oxysporum* (70.5 UP).

Concernant les extraits enzymatiques produits par les graines de *Nigella sativa*, **Bellir et al. (2014)** ont trouvés une activité protéolytique égale à 84.26 UP.

Cette activité protéolytique peut être augmentée en optimisant l'extraction de la protéase par plusieurs paramètres comme: l'inoculum (nombres des spores), la composition du milieu de fermentation, les facteurs physicochimiques (pH, température,...) et par le temps d'incubation de la fermentation.

Ce résultat explique l'utilisation de l'espèce *Aspergillus niger* dans plusieurs industries telles que l'industrie alimentaire et l'industrie pharmaceutique. Au niveau de l'industrie pharmaceutique les protéases sont utilisées dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques (**Azadeh et al., 2014**).

## **III.2. Caractéristiques de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut**

### **III.2.1. Effet du pH**

L'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* a été déterminée selon les variations du pH (Figure.13). L'analyse des résultats montre que le pH optimum est de 3.

La même figure indique que la souche sélectionnée présente également une activité protéolytique à pH neutre, mais cette activité est moins importante que la première. Cette moisissure produit donc au moins deux protéases, l'une ayant un pH optimum de 3,0 et l'autre un pH optimum de 7,0. Les deux types de protéase se dénaturent aux pH alcalins.

Des résultats similaires sont aussi obtenus par de nombreux auteurs en particulier **Edens *et al.* (2005)**, **Bhatnagar *et al.* (2010)** et **Negi et Banergee. (2010)**.

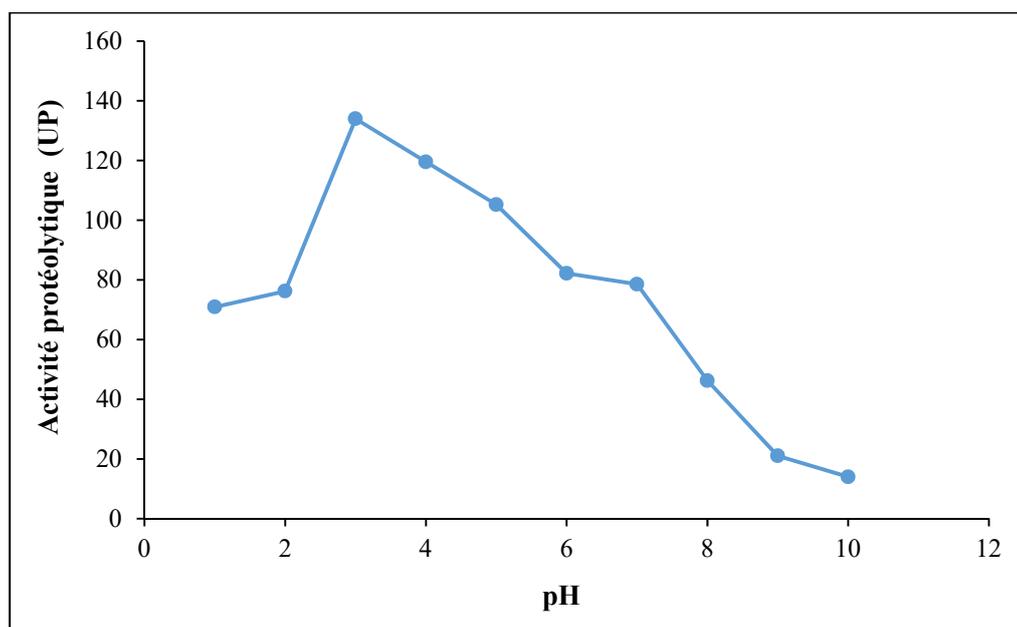
D'autres auteurs ont trouvés des pH optimum égale à 4.5 pour la même espèce (**Mukhtar et Ul-Haq, 2009 ; Bensmail *et al.*, 2013 ; De Castro *et al.*, 2014**).

Tous ces auteurs ont constaté que pour toutes les protéases, en dehors de ce pH optimum, l'activité protéolytique décroît rapidement.

Chaque enzyme possède un pH optimal auquel la vitesse de la réaction catalysée est maximale. Des légères variations du pH autour de cette valeur entraînent une diminution de l'activité enzymatique, en raison des modifications de l'ionisation des groupements compris dans le site actif de l'enzyme. Des déviations plus importantes du pH, conduisent à dénaturer l'enzyme en modifiant l'ionisation des acides aminés et en rompant les interactions non covalentes maintenant sa structure tridimensionnelle (**Hames *et al.*, 2006**).

L'activité élevée des enzymes protéolytiques dans des conditions acides, est un facteur considérablement important pour les enzymes utilisés dans le domaine agro-alimentaire et le domaine pharmaceutique (**Lee *et al.*, 2010 ; Bensmail *et al.*, 2015**).

Ainsi donc, l'extrait brut étudié semble être un mélange de protéases acide, neutre, il pourrait être efficace dans l'estomac et également au niveau des intestins. **Shaukat *et al.* (2003)** ont également recommandé l'utilisation de protéase issue de *Carum copticum* qui est une protéase mixte ayant un pH optimum à 3 et à 7 pour traiter les problèmes gastro-intestinaux.



**Figure 13.** Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* selon le pH.

### III.2.2. Effet de la température

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité protéolytique d'*Aspergillus niger* sont donnés dans la figure 14.

Selon ces résultats, l'activité protéolytique maximale est obtenue à 50°C. Au-delà de cette température une diminution de l'activité protéolytique est observée. L'enzyme devient presque inactive, cela prouve l'instabilité de sa structure (**Kumar et al., 2008**).

La température optimale de 50°C est obtenue par plusieurs auteurs aussi bien pour la protéase neutre d'*Aspergillus oryzae* (**Boukhalfa, 2003 ; Sumantha et al., 2005**), pour la protéase acide d'*Aspergillus oryzae* LK-101 (**Lee et al., 2010**) que pour la protéase alcaline d'*Aspergillus niger* (**Oludumila et al., 2015**), d'*Aspergillus clavatus* ES1 (**Hajji et al., 2007**), et d'*Aspergillus oryzae* 2095 (**García-Gómez et al., 2009**).

Le résultat obtenu est par contre supérieur à celui donné par **Bensmail et al. (2015)** qui a trouvé une température optimale de 45°C pour la même espèce et il est inférieur à celui trouvé par **Negi et Banerjee. (2009)** et **Vishwanatha et al. (2009)** qui ont trouvé une

température de 55°C pour *Aspergillus awamori* MTCC 6652 et *Aspergillus oryzae* MTCC 5341.

Des résultats similaires sont rapportés sur des protéases produites par des espèces du genre *Streptomyces* : *S. thermoviolaceus* (James *et al.*, 1991), *Streptomyces* sp. 594 (De Azeredo *et al.*, 2004), *Streptomyces* sp. (Hui *et al.*, 2004), *S. pseudogrisiolus* NRC-15 (Awad *et al.*, 2013), *S. griseus* NCRRT (El Khonezy *et al.*, 2015), *Streptomyces* sp. P3 (Guangyan *et al.*, 2015), ainsi que chez d'autres bactéries comme: *Bacillus* sp. BZI-2 (Adinarayana *et al.*, 2003) et *Bacillus polyfermenticus* SCD (Choi *et al.*, 2013).

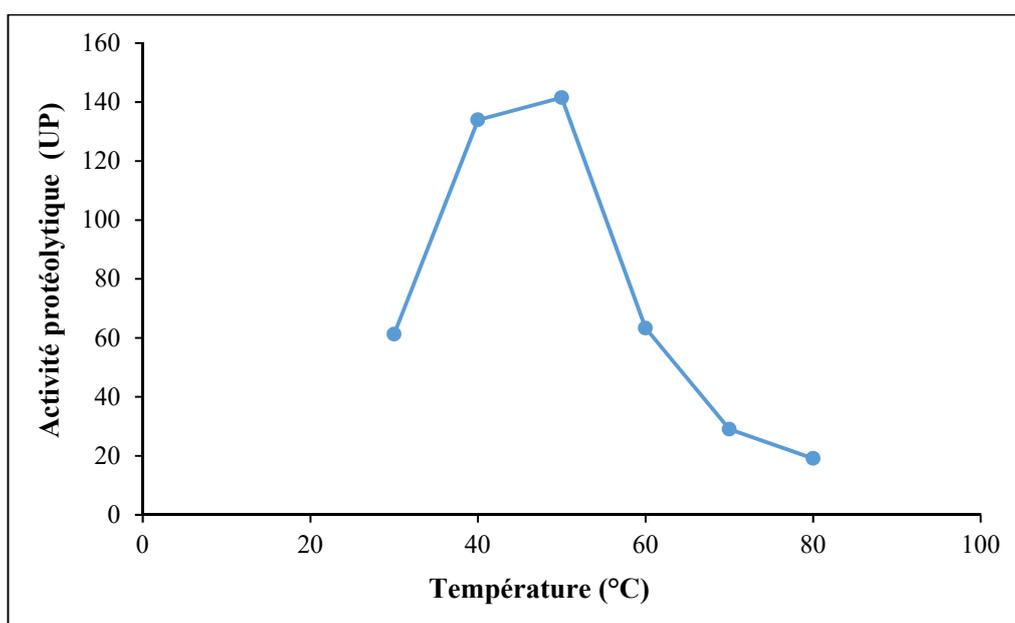
Par ailleurs, quelques protéases fongiques présentent des optima de température de 60°C (Singh *et al.*, 1994 ; Chellappan *et al.*, 2006).

La variation de la température optimale des activités protéolytiques dépend d'une part, de l'espèce et d'autre part, de la niche écologique dans laquelle elle vit. En effet, les températures optimales des protéases bactériennes sont généralement plus élevées que celles des protéases fongiques (Joo et Chang, 2005 ; Shaheen *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2008).

Dans la plupart des cas, la température optimale des protéases d'origine microbienne est entre 30 et 40°C, les enzymes actives à une température plus élevée (telle que 50°C) est une requête pour toute industrie pour un meilleur rendement (El-Mougy *et al.*, 2004).

L'activité enzymatique de l'extrait enzymatique persiste jusqu'à température maximale de 80°C indiquant une résistance de l'enzyme à la chaleur. Ceci est rare selon les données de la littérature. Kumar *et al.*, (2005) et Bensmail *et al.*, (2013) rapportent que la plupart des protéases acides issues des bactéries ou moisissures sont dénaturées au delà de 60°C.

Khan *et al.* (1981) et Jilani et Khan. (1986) témoignent que la plupart des protéases acides issues des plantes sont dénaturées à des températures entre 40 et 50°C.

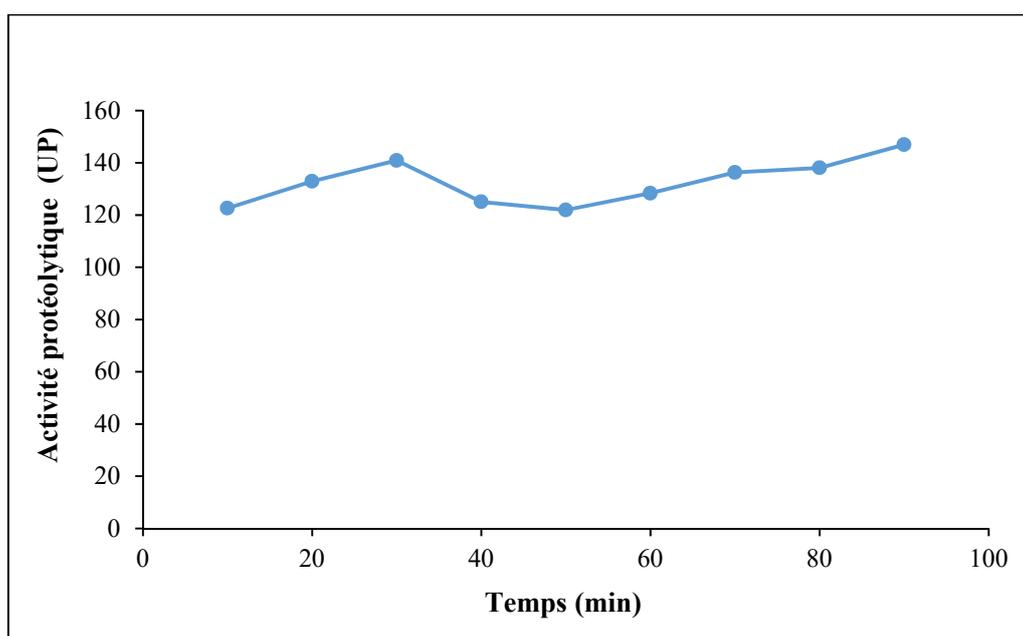


**Figure 14.** Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* selon la température.

### III.2.3. Stabilité à la température optimale

L'étude de la stabilité de l'enzyme à la température optimale 50°C est réalisée en incubant le mélange réactionnel (enzyme + substrat) à des temps variant de 10 à 90 min à pH 3.0. Les résultats de la stabilité de l'activité protéolytique à température optimale d'*Aspergillus niger* sont donnés dans la figure 15.

Nous avons observé une augmentation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique proportionnelle à la durée d'incubation en présence du substrat à la température optimale entre 10 et 30 min. Une diminution de cette activité a été observée à 40 min d'incubation suivi d'une stabilité entre 40 et 50 min. A partir de 60 min d'incubation une augmentation proportionnelle de l'activité protéolytique a été observée. Cette dernière atteint une valeur maximale après 90 min d'incubation, avec une augmentation de plus de 16.56 % par rapport à celle enregistrée après 10 min d'incubation.



**Figure 15.** Variation de l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* selon la durée d'incubation à température optimale.

**Bellir et al. (2014)** ont rapporté qu'après 90 min d'incubation, la protéase acide de la graine d'une plante médicinale *Nigella sativa* a enregistré une activité maximale, sachant que la température optimale de cette protéase est de 50°C.

D'autre part **Benchiheb (2015)** après 90 min, d'incubation à 50°C des protéases de *Scolymus maculatus* et *Scolymus hispanicus* a enregistré une activité relative d'environ 90%.

D'autres études ont montré qu'il y a des espèces microbiennes comme exemple la souche *Streptomyces* sp. D1 qui produit une protéase qui a conservé 74,3 % de son activité initiale pendant 120 minutes (**Mane et al., 2013**).

Les profils de l'effet de la température et de la stabilité à la température optimale révèlent que notre extrait enzymatique brut est thermostable. Ce caractère thermorésistant de la protéase d'*Aspergillus niger*, peut être dû à une structure oligomérique de la protéase et une richesse en liaisons disulfures (**Bellir et al., 2014**). Il peut s'expliquer également par la culture d'origine de cette espèce fongique qui lui confère cette caractéristique afin de résister aux conditions du climat.

La plupart des industries alimentaires telles que la boulangerie et la fabrication du fromage exigent que leurs processus soient portés à des températures autour de 50-60°C (Sumantha *et al.*, 2006), la protéase d'*Aspergillus niger* peut servir alors comme agent de transformation des aliments.

#### **IV. Mise en évidence de l'effet protéolytique de l'extrait enzymatique brut sur la gliadine (gluten)**

Une activité protéolytique de l'extrait brut de la protéase issue de la souche d'*Aspergillus niger* a été mise en évidence sur la gliadine comme substrat après 2 heures d'incubation, à un pH 7,5 et une température de 37°C.

Les résultats consignés dans le tableau 07 montrent que l'activité protéolytique de l'extrait enzymatique produit par *Aspergillus niger* est importante comparée à celle de l'extrait enzymatique brut avec la caséine, aussi bien sur la gliadine du blé tendre (*Triticum aestivum*) comme substrat, ou nous avons obtenu 50,30 µg/ml/h (UP), que sur la gliadine du blé dur (*Triticum durum*) comme substrat avec 45,69 µg/ml/h (UP).

Un travail similaire de Bellir *et al.* (2014), qui rapportent l'effet d'une protéase végétale de la graine *Nigella Sativa* très acide de pH 1.5 et de température optimale de 50°C sur la gliadine a aboutit à une activité protéolytique de 19.7 µg/ml/h (UP) pour le blé dur et de 69.3µg/ml/h (UP) pour le blé tendre.

D'après nos résultats, l'extrait enzymatique présente une capacité intéressante de dégradation de la gliadine à pH 7,5, après 2 heures d'incubation, l'extrait enzymatique a pu dégrader 58.17 % et 64.04 % des gliadines du blé dur et blé tendre respectivement (figure 16).

Cette dégradation incomplète pourrait s'expliquer par l'action de l'extrait enzymatique qui n'est pas purifié d'une part et au pH utilisé de l'autre part. En plus, nous n'avons pas dosé les protéines dans la solution enzymatique utilisée, il est donc probable que la solution contenant la protéase utilisée serait diluée. D'autre part, La complexité de la molécule de la gliadine du blé rend la procédure de dégradation très difficile (Shan *et al.* 2004 ; Matysiak-Budnik *et al.*, 2005). Une combinaison de différentes enzymes, plutôt qu'une protéase spécifique, est probablement nécessaire (Siegel *et al.*, 2006 ; Gass *et al.*, 2007 ; Ehren *et al.*, 2009).

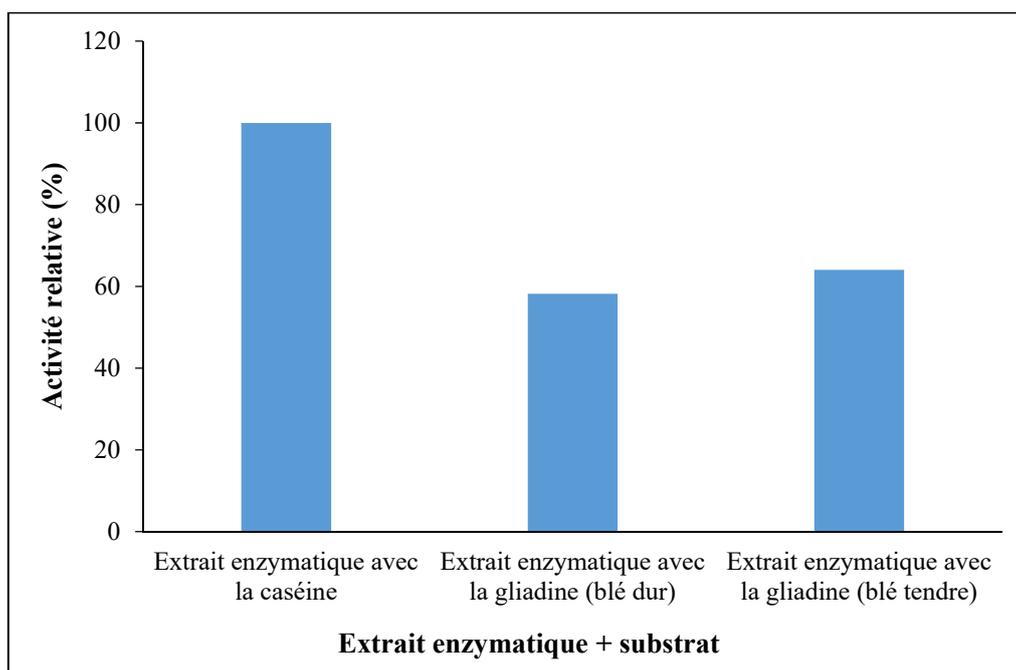
Actuellement, le seul traitement pour les patients cœliaques est un régime sans gluten à vie. Une adhésion stricte à ce régime est coûteuse et difficile. En outre, la contamination des produits naturellement sans gluten avec des traces de gluten peut nuire aux patients. Il a été montré que seulement 100 mg de gluten ou de protéines similaires de seigle et d'orge par jour peut entraîner une atrophie villositaire (**Catassi et al., 1993**). La supplémentation orale avec des enzymes pourrait être une méthode précieuse pour lutter contre cette maladie.

Idéalement, la dégradation du gluten devrait se produire dans l'estomac avant que les fragments du gluten ou le gluten peuvent atteindre le duodénum. Une problématique est proposée dans l'utilisation des enzymes protéolytique comme une thérapie alternative dans la maladie cœliaque, est que ces enzymes ne fonctionnent pas complètement dans les conditions de l'estomac et elles sont dégradées par la pepsine (**Shan et al., 2004**). L'utilisation de prolyl peptidases orales à partir de sources bactériennes telles que *Flavobacterium meningoseptica*, *Sphingomonas capsulata*, *Myxococcus xanthus* et *Lactobacillus helveticus* ont montré des inconvénients dues à une dégradation incomplète du gluten, permettant la libération de peptides immunogènes. En outre, il a été signalé que ces enzymes bactériennes sont inactivées par la pepsine et la faible pH gastrique (**Matysiak-Budnik et al., 2005**).

Au contraire, La protéase utilisée dans notre étude a présenté une activité protéolytique optimale à pH 3 et donc elle est fonctionnelle dans le pH gastrique et active dans l'estomac, si elle n'est pas dégradée par les enzymes gastro-intestinaux.

L'avantage majeur de l'utilisation de cette protéase dans la détoxification du gluten est que l'extraction de cette protéase étant simple et non coûteuse. Son inconvénient est qu'elle nécessite une purification avancée avec des coûts élevés pour éliminer les toxines avant d'être utilisées in-vivo.

Pour cela, afin de proposer une alternative thérapie pour les malades cœliaques, la protéase d'*Aspergillus Niger* vise à prévenir le contact des fragments immunogènes du gluten avec le système immunitaire à travers la supplémentation orale qui pourraient permettre une digestion des peptides de gluten riches en proline (gliadine) en fragments entièrement dépourvus des propriétés immunogènes (**Shan et al., 2002 ; Sollid et Khosla, 2005**).



**Figure 16.** L'activité relative protéolytique d'*Aspergillus niger* utilisant deux substrats différents (caséine et gliadine).

# *Conclusion*

Cette étude a comme but principal d'étudier une enzyme protéolytique produite par une souche d'*Aspergillus niger* et son effet sur la gliadine (gluten).

Dans le cadre de la recherche d'une enzyme protéolytique élaborée par une moisissure apparait sous forme de pourriture noire, le prélèvement a été effectué à partir du fruit sec « abricot sec ». La culture de prélèvement sur le milieu de Sabouraud a permis l'isolement de la moisissure. Le pouvoir inhibiteur de l'acide acétique au cours de l'isolement a permis de réduire l'apparition des bactéries.

Pour l'identification de la moisissure isolée, une étude macroscopique est effectuée. Cette dernière a permis de déterminer le genre soit, *Aspergillus*. Cette étape est complétée par une étude microscopique dans le but d'identifier l'espèce de la souche. L'étude microscopique a confirmé l'espèce ; il s'agit d'*Aspergillus niger*.

Cette dernière a été cultivée sur un milieu de fermentation solide à base de son de blé pour la production et l'extraction des protéases extracellulaires. Le dosage de l'activité protéolytique a montré que ce milieu est favorable à la production des protéases par *Aspergillus Niger*, en effet elle produit une activité importante de 78.54 µg/ml/h (UP).

Afin de mieux connaître la protéase produite, nous avons étudié ses propriétés ce qui permet de connaître les éventuelles applications. Cette étude a donné un pH optimum de 3.0, cette propriété nous a permis de conclure que c'est une enzyme acide. Aussi, l'enzyme protéolytique a une température optimale de 50°C et la stabilité thermique de l'enzyme est reflétée par une activité maximale pendant 90 minutes.

L'ensemble des résultats (pH acide, température optimale, stabilité à la température optimale) montrent que la protéase produite par la souche d'*Aspergillus niger* possède des caractéristiques importantes et peut-être utilisée comme catalyseur dans plusieurs domaines industriels notamment dans les applications technologiques telles que la boulangerie, la biotechnologie et la biologie moléculaire. La stabilité des enzymes reste un aspect critique dans les applications pharmaceutiques et industrielles.

Nos résultats semblent mettre en évidence une activité protéolytique de l'extrait enzymatique brut issue de la souche d'*Aspergillus niger* sur la gliadine comme substrat. L'effet protéolytique était plus important sur la gliadine issue du blé tendre 50.30 µg/ml/h (UP) que sur celle issue du blé dur 45.69 µg/ml/h (UP).

Cette étude montre qu'il existe des preuves substantielles suggérant l'intérêt de l'utilisation de l'enzyme protéolytique d'*Aspergillus niger* dans le traitement de la maladie cœliaque. Ceci va servir de plateforme aux études cliniques.

En conclusion, nous démontrons que la protéase d'*Aspergillus Niger* peut agir dans des conditions similaires à celles trouvées dans le tractus gastro-intestinal et peut dégrader le gluten à des fragments inoffensifs. L'enzyme est extrêmement stable et peut être produit à faible coût.

L'efficacité in vivo de cette protéase pour la désintoxication du gluten devra finalement être abordée dans des études cliniques impliquant des patients cœliaques. La protéase acide d'*Aspergillus Niger* semble être un candidat principal à de tels essais cliniques.

Ces résultats bien que préliminaires et non concluants semblent néanmoins proposer une nouvelle approche enzymatique pour le traitement de la maladie cœliaque. En effet, une telle enzyme pourrait être administrée au cours des repas ou incorporée lors de la fabrication des produits sans gluten.

Les objectifs fixés dans ce travail sont atteints, mais ils ont ouvert un chemin de recherche vers d'autres perspectives comme:

- L'optimisation de l'extraction de l'enzyme protéolytique.
- L'étude des autres caractéristiques de l'enzyme protéolytique issue d'*Aspergillus niger*.
- La purification de l'enzyme protéolytique et la détermination de son poids moléculaire.
- Le test de l'activité de la protéase sur différents substrats pour évaluer son éventuel intérêt et application.
- L'étude de la structure de la molécule et déterminer son originalité.
- L'étude de l'effet des enzymes du tractus gastro-intestinal sur cette protéase.

*Références*  
*bibliographiques*

- Abarca L.M., Francesc A., Jose C. et Cabanes J.F. (2004).** Taxonomy and significance of black aspergilla. Antonie van Leeuwenhoek Kluwer. Academic Publisher. 86: 33-49.
- Abed N. (2016).** Effets de *Nigella sativa* L. dans la maladie coéliquaue de l'adulte et potentiel protéolytique de la protéase des graines de Nigelle sur la gliadine. Thèse de doctorat. Université de constantine.
- Abhijit R. (2012).** Protease enzyme-potential industrial scope. Institute of Technology. 2(1): 1-4.
- Adinarayana K., Ellaiah P. et Prasad D. (2003).** Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-1. AAPS. Pharm. Sci. Tech. 4(4): 440-448.
- Aftab A., Singh A. et Ward O.P. (2007).** Chymostatin can combine with pepstatin to eliminate extracellular protease activity in cultures of *Aspergillus niger* NRRL-3. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 34: 165-169.
- Agrawal D., Patidar P., Banerjee T. et Patil S. (2005).** Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry. 40: 1131-1136.
- Aguilar C.N., Gutiérrez-Sanshez G., Rado-Barragan P.A., Rodriguez-Herrera R., Martinez-Hernandez J.L. et Contreras-Esquivel J.C. (2008).** Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzyme. American J. Biochem. Biotechnol. 4(4): 354-366.
- Ahmad J. et Ansari T.A. (2013).** Alkaline protease production using proteinaceous tannery solid waste. Journal Petroleum and Environmental Biotechnology. 4(1): 1-4.
- Akhter N., Morshed M.A., Uddin A., Begum F., Sultan T. et Azad A.K. (2011).** Production of pectinase by *Aspergillus niger* cultured in solid state fermentation. International Journal of Biosciences. 1(1): 33-42.
- Akobeng A.K., Ramanan A.V., Buchan I. et Heller R.F. (2006).** Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Arch Dis Child. 91: 39-43.
- Alais C. et Linden G. (1994).** Abrégés de biochimie alimentaire. 3<sup>ème</sup> édition. Nancy. Masson. 244.
- Alexopoulos C.J. et Mims C.W. (1979).** Subdivision zygomycotina. En Introductory Mycology. John Wiley and Sons. New York. 191-228.

- Al-Mussalam A. (1980).** Revision of the black *Aspergillus* species. PhD Thesis. Rijks universiteit. Utrecht.
- AOAC. (1965).** Official Methods of Analysis. 10th Edition. Washington. D.C. U.S.A.360.
- Armstrong M.J., Robins G.G. et Howdle P.D. (2009).** Recent advances in coeliac disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 25(2): 9-10.
- Awad H.M., Mostafa E.E., Saad M.M., Selim M.H. et Hassan H.M. (2013).** Partial purification and characterization of extracellular protease from halophilic and thermotolerant strain *Streptomyces pseudogrisiolus* NRC-15. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics.* 50: 305-311.
- Bakhtiari M.R., Faezi M.G., Fallahpour M., Noohi A., Moazami N. et Amidi Z. (2006).** Medium optimization by orthogonal array designs for urease production by *Aspergillus niger* PTCC5011. *Process Biochemistry.* 41: 547-551.
- Bhatnagar D., Imelda J. et Paul-Raj R. (2010).** Amylase and acid protease production by solid state fermentation using *Aspergillus niger* from mangrove swamp. *Indian. J. Fish.* 57(1): 45-51.
- Bekhit A.E.A., Hopkins D.L., Geesink G., Bekhit A.A. et Franks P. (2013).** Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 54(8): 1012-1031.
- Bellir N., Bellir M.N., Khelifi D., Bellil I., Medouri A., Medoukali I. et Rouabah L. (2014).** Enzymatic degradation of gliadin by *Nigella Sativa* seeds protease: implications for new treatment of celiac disease. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 3(11): 507-522.
- Belmissikh 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. Université Mentouri Constantine.
- Benatallah Le. (2009).** Couscous et pain sans gluten pour malades cœliaques : aptitude technologique de formules à base de riz et de légumes secs. Thèse de Doctorat d'état en science. Spécialité : Sciences Alimentaires. INATAA. Université Mentouri Constantine.
- Benchiheb M. (2015).** Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanismes d'action et applications technologiques. Thèse de Doctorat 3ème cycle LMD en biotechnologie, biologie et environnement. Université Constantine 1.

- Bensmail S., Nouar H., Bouchenak K. et Fazouane-Naimi F. (2013).** Etude de l'aptitude fromagère d'un extrait enzymatique coagulant produit par *Aspergillus niger* FFB1. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. 7(1): 98-119.
- Bensmail S., Mechakra A. et Fethia-Fazouane N. (2015).** Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* FFB1 in solid-state fermentation. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. 4(5): 467-472.
- Berrah M., Benhassine F. et Chaoui N. (2000).** Actualités sur la maladie coeliaque. Société algérienne de pédiatrie. Table ronde. 9 Nov. Alger. 45.
- Bethune M.T., Siegel M., Howles-Banerji S. et Khosla C.H. (2009).** Interferon- $\gamma$  released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 329(2): 657-668.
- Beynon R.J. et Oliver S. (2004).** Avoidance of proteolysis in extracts. Methods Mol. Biol. 596: 81-93.
- Birk Y. (2003).** Proteinase inhibitors from plant sources. Methods Enzymol. 45: 695-700.
- Bocquet J. (1993).** Généralités sur les microorganismes en biotechnologie. Tech et Doc. Lavoisier. Paris.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. 2<sup>ème</sup> édition. Masson. Paris. 16,41,110,183,364.
- Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. et Veau P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. 12-426.
- Bouchet P., Guignard J.L., Pouchus Y.F. et Villard J. (2005).** Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée. 2<sup>ème</sup> Ed MASSON. Paris.191.
- Boukhalfa H. (2003).** Production de la protéase neutre par *Aspergillus oryzae* cultivée sur milieu à base de déchets de tomates. Optimisation de milieu de culture et étude des caractéristiques de l'extrait enzymatique. Thèse de Magister. Université Mentouri Constantine.
- Boukezoula F. (2016).** Maladie coeliaque dans la commune de Tébessa: Aspect épidémiologique, situation nutritionnelle, sanitaire et diététique associée. Thèse de doctorat. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaire. Université de Constantine.

- Bousquet A. (2015).** La maladie cœliaque, du diagnostic à sa prise en charge: Un nouvel espoir thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Toulouse III Paul Sabatier.
- Branlard G. (2012).** La qualité du gluten: variation de sa composition et de ses propriétés. *Médecine et Nutrition*. 48(4): 21-25.
- Briani C., Samaroo D. et Alaedini A. (2008).** Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. 7: 644–650.
- Bruce G., Woodley J.F. et Swan C.H. (1984).** Breakdown of gliadin peptides by intestinal brush borders from coeliac patients. *Gut*. 25: 919-924.
- Buche F. (2011).** Influence de la formulation de pâtes de farine de blé sur leur consommation d'oxygène et leur production de dioxyde de carbone au cours du pétrissage et de la fermentation. Conséquences biochimiques et rhéologiques. Thèse de doctorat. Institut des sciences et technologies. Université de Paris.
- Catassi C., Rossini M., Ratsch I.M., Bearzi I., Santinelli A., Castagnani R., Pisani E., Coppa G.V. et Giorgi P.L. (1993).** Dose dependent effects of protracted ingestion of small amounts of gliadin in coeliac disease children: a clinical and jejunal morphometric study. *Gut* 34(2): 1515-1519.
- Catassi C. et Fasano A. (2008).** Coeliac disease. 1-27. In : gluten free cereals- products and beverages. Food Science and Technology. International Series. Academic Press-Elsevier Edition. USA. 454.
- Cerf-Bensussan N. et Jabri B. (2001).** La maladie coeliaque : une maladie auto-immune induite par un antigène alimentaire. *Médecine/Sciences*. 17: 1129-1138.
- Charitha Devi M., Kumar S. et Reese E.T. (2012).** Production, optimization and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* fermented with paper and timber sawmill industrial wastes. 2(1): 120-128.
- Chellappan S., Jasmin C., Basheer S.M., Elyas K.K., Bhat S.G. et Chandrasekaran M.M. (2006).** Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem*. 41: 956-961.
- Choi G.H., Jo M.N., Kim J.-M., Kim C.-J., Kim K.-T. et Paik H.D. (2013).** Purification and characterization of heat-tolerant protease produced by *Bacillus polyfermenticus* SCD. *J. Microbiol. Biotechnol*. 23(11): 1554-1559.

- Clot F., Babron M.C. et Clerget D.F. (2001).** La génétique de la maladie cœliaque. Médecine thérapeutique. Pédiatrie. 4: 263-267.
- Crowe S.E. (2008).** Celiac disease: Nutrition and gastrointestinal disease. Humana Press edition. USA. 123-148-334.
- Dacosta Y. (1986).** Le gluten de blé dur et ses applications. APRIA. Paris. 130.
- Dai Z., Mao X., Magnuson J.K. et Lasure L.L. (2004).** Identification of genes associated with morphology in *Aspergillus niger* by using suppression subtractive hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 70(4): 2474-2485.
- De-Azaredo L.A.I., Freire D.M.G., Soares S.G.F. et Coelho R.R.R. (2004).** Production and partial characterization of thermophilic protease from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. Enzyme and Microbial Technology. 34: 354-358.
- De-Castro R.J.S., Nishide T.G. et Sato H.H. (2014).** Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 3(4): 236-245.
- De-Castro R.J.S., Nishide T.G. et Soares M.H. (2016).** Biochemical characterization of solvent, salt, surfactant and oxidizing agent tolerant proteases from *Aspergillus niger* produced in different agroindustrial wastes. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 5: 94-98.
- Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse de contrôle sanitaire et médicale international. Tec et Doc. Paris. 112-140.
- Delfrate R. (2005).** Mieux connaître la farine, spécial analyses. Supplément technique. I.N.B.P, laboratoire d'essais des matériels et produits alimentaires (L.E.M.P.A.). Rouen. France. 16.
- Descamps M. (2008).** Visa pour le PCEM 1 : Biologie. Dunod. Paris. 35- 36.
- Diguta C.F. (2010).** Ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. Dijon. France.
- Dijksterhuis J. et Wösten H. (2013).** Development of *Aspergillus niger*. Studies in Mycology. 74: 8-23.
- Di Sabatino. A., Pickard K.M., Gordon J.N., Salvati V., Mazzarella G. et Beattie R.M. (2007).** Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. Gastroenterology. 133: 1175-1187.

- Djekrif-Dakhmoche S., Gheribi-Aoulini Z., Meraihi Z. et Bennamoun L. (2006).** Application of statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Engineering*. 73: 190-197.
- Dursun A.Y. (2003).** The effect of pH on the equilibrium of heavy metal biosorption by *Aspergillus niger*. *Fres. Environ. Bull.* 12: 1315-1322.
- Edens L., Dekker P., Hoeven R.V.D., Deen F., Roos A.D. et Floris R. (2005).** Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(20): 7950-7957.
- El-Khonezy M.I., El-Gammal E.W., Atwa N.A. et El-Abd M.A. (2015).** Partial Purification and Characterization of an Alkaline Serine Protease Produced by *Streptomyces griseus* NCRRT and its Antifungal Effect on *Fusarium solani*. *World Applied Sciences Journal*. 33(5): 831-842.
- El-Mougy N.S., Abd-El-Karem F., El-Gamal N.G. et Fotouh Y.O. (2004).** Application of fungicides alternatives for controlling cowpea root rot diseases under greenhouse and field conditions. *Egypt. J. Phytopathol.* 32: 23-35.
- Farrell R.J. et Kelly C.P. (2002).** Celiac sprue. *The New England Journal of Medicine*. 346: 180-188.
- Fasano A. (2011).** Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physio Rev.* 91 : 151-175.
- Feuillet P. (2000).** Le grain de blé. INRA. Paris. 81-82-83-88.
- Fould S. (1996).** *Lewe et panification: Mémento des technologies agro-alimentaires*. Paris. Lesa. Eet.Techno. Nathan. 75.
- García-Gómez M.J., Huerta-Ochoa S., Loera-Corral O. et Prado-Barragán L.A. (2009).** Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chem.* 112: 604-608.
- Gass J., Bethune M.T., Siegel M., Spencer A. et Kholsa C. (2007).** Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroen-Terology*. 133: 472-480.
- Godon B. (1991).** *Biotransformation des produits céréaliers*. Paris. Tec et Doc. Lavoisier. APRIG. 221.

- Gomori G. (1955).** Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology*. 1: 138-146.
- Green P.H.R., Peter H.R. et Christophe C.M.D. (2007).** Medical Progress: Celiac Disease. *The New England Journal of Medicine*. 357: 1731-1743.
- Guiraud J.P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Dunod. Paris. 7-330.
- Gupta R., Beg Q.K. et Lorenz P. (2002).** Bactériale alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 15-32.
- Hadjivassiliou M., Ferman M. et Kobi S. (2010).** Gluten sensitivity: from gut to brain. *Lancet Neurol*. 9: 318-330.
- Hager A., Wolter A., Czerny M., Bez J., Zannini E., Arendt E.K. et Czerny M. (2012).** Investigation of product quality, sensory profile and ultrastructure of breads made from a range of industrially processed gluten-free flours compared to their wheat counterparts. *Eur. Food. Res. Technol.* 235(2): 333-334.
- Hajji M., Kanoun S., Nasri M. et Gharsallah N. (2007).** Purification and characterization of an alkaline serine –protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Proc. Biochem.* 42: 791-797.
- Hames B.D., Hooper N.M. et Houghton J.D. (2006).** *L'essentiel en biochimie*. Editions Berti. Paris. 413.
- Hausch F., Shan L, Santiago N.A., Gray G.M. et Khosla C. (2002).** Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am Jour Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 283: 996-1003.
- Heitman J., Kronstad J.W., John T.W. et Casselton L.A. (2007).** Sex in fungi: molecular determination and evolutionary implications. Ed ASM Press « American Society for Microbiology ». USA. 542.
- Hölker U., Höfer M. et Lenz J. (2004).** Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.
- Hue S., Mention J.J., Monteiro C., Zhang S., Cellier C. et Schmitz J. (2004).** A direct role of NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 21: 367-377.
- Hui Z., Doi H., Kanouchi H., Matsura Y., Mohri S., Nonomura Y. et Oka T. (2004).** Alkaline serine protease produced by *Streptomyces* sp. *Degrades Pr. Sc. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321: 45-50.

- Ichida J.M., Krizova L., Lefebvre C.A., Keener H.M., Elwell D.L. et Burt J.R.E.H. (2001).** Bacterial inoculum enhance keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *Journal of Microbiology Methods*. 47: 199-208.
- Illanes A. (2008).** Enzyme biocatalysis principles and applications. Springer. New York. 57-74-76.
- Irfan M., Nadeem M. et Syed Q. (2012).** Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 10(1): 55-64.
- Iwashita K. (2002).** Recent studies of protein secretion by filamentous fungi-review. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 94: 530-535.
- Jakubowski N. (2001).** Proteinase chemistry and molecular biology. *J. Biochem*. 23(5): 1825-1827.
- James P.D.A., Iqbal M., Edwards C. et Miller P.G.G. (1991).** Extracellular protease activity in antibiotic producing *Streptomyces thermoviolaceus*. *Curr. Microbiol*. 22: 377-382.
- Jarai G. et Buxton F. (1994).** Nitrogen, carbon and pH regulation of extracellular acidic protease of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*. 26: 238-244.
- Jernejc K. et Cimerman A. (2001).** Morphological characteristics, extracellular and intracellular protein and enzyme patterns of five *Aspergillus* species. *Food Technol. Biotechnol*. 39(4): 333-340.
- Jilani S.M. et Khan M.R. (1986).** Extraction and partial purification of the protease of *Calotropis procera*. *J Pure App Sci*. 5(1): 13-7.
- Jisha V.N., Smitha R.B., Pradeep S., Sreedevi S., Unni K.N., Sajith S., Priji P., Josh M.S. et Benjamin S. (2013).** Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzymes Research*. 1(3): 39-51.
- Joo H.S. et Chang C.S. (2005).** Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc. Biochem*. 40: 1263-1270.
- Kamoun P. (1987).** Appareils et méthodes en biochimie. 3<sup>ème</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. 117-120.

- Kaur S., Vohra R.M., Kapoor M., Beg Q.K. et Hoondal G.S. (2001).** Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* P-2. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 17: 125-129.
- Kerfal S., Giraldo P., Rodriguez Q.M., Vazquez J., Adams K., Lukow O.M., Roder M.S., Somers D.J. et Carillo J.M. (2010).** Mapping quantitative trait loci associated with dough quality in soft x hard bread wheat progeny. Journal of Cereal Science. 52: 46-52.
- Khalafalla O. et Bushara N. (2005).** Neurologic presentation of celiac disease. Gastroenterology. 128: 92-97.
- Khan M.R., Nasreen K. et Parveen Z. (1981).** Protease of *Calotropis procera*. J of Natural Sci Mathematics. 21(2) : 199-208.
- Kiran K.S.P., Satyavani Y., Chandana L.M.V. et Sridevi V. (2012).** Production of protease enzyme using various sources. Research Journal of Biotechnology. 7(4): 259.
- Kirti R., Rachita R. et Sanchi D. (2012).** A review on latest overview of proteases. International Journal of Current Life Sciences. 2(1): 12-18.
- Kumar S., Sharma N.S., Saharab M.S. et Singb R. (2005).** Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and caractérisation. Elsevier Process Biochemistry. 40 : 1701-1705.
- Kumar D., Savitri A., Thakur N., Verma R. et Bhalla T.C. (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. Research Journal of Microbiology. 3(12): 661-672.
- Kumar G.A., Nagesh N., Prabhakar T.G. et Sekaran G. (2008).** Purification of extracellular acid protease, an analysis of fermentation metabolites by *Synergistes sp.* utilizing proteinaceous solid waste from tanneries. Bioresource Technology. 99: 2364-2372
- Laurent J. (1982).** Les enzymes, production et utilisations industrielles. Gauthier-Villars. France. 51- 52- 54- 55.
- Lazaridou A., Duta D., Papageorgiou M., Belc N. et Biliaderis C.G. (2007).** Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. Journal of Food Engineering. 79: 1033-1047.
- Lee S.K., Hwang J.Y., Choi S.H. et Kim S.M. (2010).** Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. Food. Sci. Biotechno. 19(2): 327-334.

- Leffler D.A., Kelly C.P., Abdallah H.Z., Colatrella A.M., Harris L.A., Leon F., Arterburn L.A., Paterson B.M., Lan Z.H. et Murray J.A. (2012).** A randomized, double-blind study of larazotide acetate to prevent the activation of celiac disease during gluten challenge. *The American Journal of Gastroenterology*. 107: 1554-1562.
- Leisola M., Jokela J., Pastinen O. et Turunen O. (2001).** Industrial use of enzymes. Laboratory Bio Proc. Eng. Helsinki University of Technology. Finland. Hans Schoemker. DMS Research. MD. Galeen.
- Lerner A. (2010).** New therapeutic strategies for celiac disease. *Autoimmunity. Reviews*. 9: 144-147.
- Lopes-Dtin C., Bond J.S. et Matrisian L.M. (2008).** Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*. 283(45): 30433-30437.
- Lopes F.C., Silva L.A.D., Tichota D.M., Daroit D.J., Velho R.V., Pereira J.Q., Corrêa A.P.F. et Brandelli A. (2011).** Production of proteolytic enzymes by a keratin degrading *Aspergillus niger*. *Enzyme Research*. 3(4): 405-415.
- Lucisano M., Cappa C., Fongaro L. et Mariotti M. (2012).** Characterisation of gluten-free pasta through conventional and innovative methods: Evaluation of the cooking behaviour. *Journal of Cereal Science*. 56: 667-675.
- Madhavi J., Srilakshmi J., Rao M.V.R. et Rao K.R.S. (2011).** Efficient leather dehairing by bacterial thermostable protease. *International Journal of Bioscience and Biotechnology*. 3(4): 11-26.
- Maiuri L., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Raia V., Rispo A., Griffin M., Issekutz T., Quarantino S. et Londei M. (2005).** Unexpected role of surface transglutaminase type II in celiac disease. *Gastroenterology*. 129: 1400-1413.
- Malmut G., Meresse B., Cellier C. et Cerf-Bensussan N. (2009).** La maladie cœliaque en 2009 : un futur sans régime. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 33: 635-647.
- Mane M., Mahadik K. et Chanderakant K.C. (2013).** Purification, characterization and applications of thermostable alkaline protease from marine *Streptomyces* sp. D1. *Int. J. Pharm. Bio. Sci*. 4(1): 572-582.
- Markwell J., Frakes L.G., Brott E.C., Osterman J. et Wagner F.W. (1989).** *Aspergillus niger* mutants with increased glucose oxidase production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 30: 166-169.

- Marlett J.A., Burney M.I. et Slavin J.L. (2002).** Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fibres. *Journal of the American Dietetic Association*. 102(7): 993-1000.
- Matysiak-Budnik T., Candalh C., Cellier C., Dugave C., Namane A. et Vidal-Martinez A. (2005).** Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology*. 129: 786-796.
- Mhetras N.C., Bastawde K.B. et Gokhale D.V. (2009).** Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*. 100: 1486-1490.
- M'hir S., Ziadi M., Chammem N. et Hamdi M. (2012).** Gluten proteolysis as alternative therapy for celiac patients: A mini-review. *African Journal of Biotechnology*. 11(29): 7323-7330.
- Mitea C., Havenaar R., Drijfhout J.W., Edens L., Dekking L., Koning F. (2008).** Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut*. 57: 25-32.
- Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses. *Biologie. Techniques Encycl. Med. Chir.* Elsevier, Paris. *Maladies infectieuses*. 8-10.
- Mouterde O., Ben Hariz M. et Dumant C. (2008).** Le nouveau visage de la maladie cœliaque. *Archives de Pédiatrie*. 15: 501-503.
- Mukhtar H. et Ul-Haq I. (2009).** Production of acid protease by *Aspergillus niger* using Solid State fermentation. *Pakistan. J. Zool.* 41(4): 253-260.
- Neji S. et Banerjee R. (2009).** Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*. 10: 10-16.
- Negi S. et Banerjee R. (2010).** Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamari* in a single fermentation. *African Journal of Biochemistry Research*. 4(3): 73-80.
- Ohara A., De-Castro R.J.S., Nishide T.G., Dias F.F.G., Bagagli M.P. et Sato H.H. (2015).** Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical-chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(4): 645-652.
- Olajuyigbe F.M. et Falade A.M. (2014).** Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. *Bioresources and Bioprocessing*. 1: 8.

- Oludumila O.R., Abu-Temitope F.A., Enujiugha V.N. et Sanni D.M. (2015).** Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus niger* isolated from yam peels. International journal of nutrition and food Sciences. 4(2): 125-131.
- Onipe O.O., Afam I.O. Jideani A.I.O. et Beswa D. (2015).** Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products. International Journal of Food Science and Technology. 50: 2509-2518.
- Osborne T.B. (1924).** The vegetable proteins. Longmans. Green. London. 110.
- Ottaviani F., Disegna L. et Spolaor D. (1988).** Yeasts and identification in food industry. Microbiologie- Aliments- Nutrition. 6: 221-226.
- Paranthman R., Alagusundaram K. et Indhumathi J. (2009).** Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation. World Journal of Agricultural Sciences. 5(3): 308-312.
- Pasqualotto A. C. (2010).** Aspergillosis: from diagnosis to prevention. Ed Springer Science and Business Media. New York. 1027.
- Pitt J.I. (1989).** Recent developpement in the study in the *Penicillium* and *Aspergillus* systematics. J. App. Bact. Symp. Supplement. 35-45.
- Pitt J.I. et Hocking A.D. (2009).** Fungi and food spoilage. Springer. New York. 280.
- Quatresous N. (2011).** Aspergillose humaine. Épidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse de Doctorat. Université de Limoges. Limoges.
- Raghunath T.M., Shamkant B.B. et Araujo E.F. (2010).** Biological aspects of proteolytic enzymes: A review. Journal of Pharmacy Research. 3(9): 2048-2068.
- Raper K.B. et Fennell D.J. (1965).** The genus *Aspergillus*. Food Microbiol. 5: 163-176.
- Raper K.B. et Fennel D.I. (1977).** The Genus *Aspergillus*. Krieger Malabar. Florida. 686.
- Rinaldi C., Sutton A. et Fothergill S.R. (1998).** The morphology of fungi. Appl. Environ. Microbial. 67: 123-129.
- Rohit K.C., Sudipta K.M., Purushotham B. et Kumara S.M. (2013).** Isolation, production and characterization of extracellular pectinase from *Aspergillus niger* K3. International Journal of pharma and Bio Sciences. 4(4): 667-675.
- Roujon P., Jayakar F. et Taupin J.L. (2013).** Immunogenetique de la maladie cœliaque. Pathologie Biologie. 61: 369-381.

- Roukas T. (2000).** Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *J. Microbiol Biotechnol.* 25: 298-304.
- Samson R.A. et Varga J. (2007).** *Aspergillus* systematics in the genomic era. *Studies in Mycology.* 59: 71-73.
- Sandhya C., Sumantha A., Szakacs G. et Pandey A. (2005).** Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 40: 2689-2694.
- Sathiya G. (2013).** Production of protease from *Bacillus subtilis* and its application in leather making process. *International Journal of Research in Biotechnology and Biochemistry.* 3(1): 7-10.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J.C. et Van Dijck P.W.M. (2002).** On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 426–435.
- Scriban R. (1993).** *Biotechnologie.* 4<sup>ème</sup> édition. Tech. et Doc. Lavoisier. Paris. 39-42.
- Shaheen M., Ali Shah A., Hameed A. et Hasan F. (2008).** Influence of culture conditions on production and activity of protease from *Bacillus subtilis* BS1. *Pak. J. Bot.* 40(5): 2161-2169.
- Shan L. Molberg O., Parrot I., Hausch F., Filiz F. et Gray G.M. (2002).** Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 297: 2275-2279.
- Shan L., Marti T., Sollid LM., Gray GM. et Khosla C. (2004).** Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochem J.* 383: 311- 318.
- Shaukat A., Qazi A.H. et Khan M.R. (2003).** Protease activity in seeds commonly used as herbal medicine. *Pakistan J. Med. Res.* 42(2): 1-7.
- Shewry P.R., Tatham A.S., Forde J., Kreis M. et Mifflin B.J. (1986).** The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science.* 4: 97-106.
- Siegel M., Bethune M.T., Gass J., Ehren J., Xia J., Johannsen A., Stuge T.B., Gray G.M., Lee P.P. et Khosla C. (2006).** Rational design of combination enzyme therapy for celiac sprue. *Chemistry and Biology* 13: 649-658.
- Singh, N.K., Sheferd K.W. et Cornish G.B. (1991).** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *J. Cereal. Sci.* 4: 203-208.
- Singh A., Ghosh V.K. et Ghosh P. (1994).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters Appl. Microbiol.* 18: 177-180.

- Singh A., Ghosh V.K. et Ghosh P. (2004).** Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. Letters Appl. Microbiol. 18: 177-180.
- Sinsuwan S., Rodtong S. et Yongsawatdigul J. (2008).** Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus sp.* SK33 isolated from fish sauce fermentation. Proc. Biochem. 43: 185-192.
- Smecuol E. et Bal J.C. (2011).** Diagnosis of celiac disease. World Gastroenterol News e-WGN. 16 (2): 7-10.
- Sollid L.M. (2002).** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nat Rev Immunol. 2: 647-655.
- Sollid L.M. et Khosla C. (2005).** Future therapeutic options for celiac disease. Nature Clinical Practice. 2: 140-147.
- Spinnler H. (2008).** Transformation et conservation des produits agroalimentaires. Techniques de l'ingénieur (F 3 450). 2.
- Stepniak D., Spaenij-Dekking L., Mitea C., Moester M., Deru A. et Baak-Pablo R. (2006).** Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 291: 621-629.
- Stevens L. et Rashid M. (2008).** Gluten-free and regular foods: a cost comparison. Can. J. Diet. Pract. Res: 69: 147-150.
- Sturges R.P., Ellis H.J. et Ciclitira P.J. (1991).** Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in coeliac disease. Gut. 32(10): 55-60.
- Sughanti R., Benazir J.F., Santhi R., Ramesh Kumar V., Anjana H., Nitya M., Nidhiya K.A., Kavitha G. et Lakshmi R. (2011).** Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. International journal of Engineering Science and Technology. 3(2): 1756-1763.
- Sughanti R., Anjana H., Arumugam B., Arungopal M., Ramesh Kumar V. et Benazir J.F. (2012).** *Aspergillus niger*-A potential enzyme producer on cost effective agroindustrial wastes. Research Journal of Biotechnology. 7(1): 25-32.
- Sumantha A., Sandhya C., Szakacs G., Soccol C.R. et Pandey A. (2005).** Production and partial purification of a Neutral metallo-protease by fungal mixed substrate fermentation. Food Technology and Biotechnology. 43(4): 313-319.

- Sumantha A., Larroche C. et Pandey A. (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases. *Food Technology and Biotechnology*. 44(2): 211-220.
- Syed S.A. et Vidhale. (2013).** Protéase production by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using rice bran. *American Journal of Microbiological Research*. 1(3): 45-47.
- Tabuc C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Université de Toulouse.
- Thompson T., Dennis M., Higgins L.A., Lee A.R. et Sharrett M.K. (2005).** Gluten-free diet survey: Are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods. *J. Hum. Nutr. Diet.* 18: 163-169.
- Tkoub E.M. (2008).** Maladie cœliaque de l'adulte. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. 48: 27-31.
- Tobechukwu C.E., Sabinus O.O.E., Chukwunonso A.N. et Ferdinand C.C. (2014).** Production of pectinases from *Aspergillus niger* using submerged fermentation with orange peels as carbon source. *International Journal of Microbiology Research*. 58(8): 434-440.
- Tsuchida O.Y., Yamagata T., Ishizuka T., Arai J., Yamada-Takeuchi M. et Ichishima E. (1986).** An alkaline protease of an alkalophilic *Bacillus* sp. *Curr. Microbiol.* 14: 7-12.
- Tunga R., Banerjee R. et Bhattacharya B.C. (1999).** Some studies on optimization of extraction process for protease production in SSF. *Bioprocess Engineering*. 20: 485-489.
- Tunga R., Shrivastava B. et Benerjee R. (2003).** Purification and characterization of a protease from solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. 38: 1553-1558.
- Van Den Broeck H.C., De Jong H.C., Salentijn E.M.J., Dekking L., Bosch D., Hamer R.J., Gilissen L.J.W.J., Van Der Meer I.M. et Smulders M.J.M. (2010).** Presence of celiac disease epitopes in modern and old hexaploid wheat varieties: wheat breeding may have contributed to increased prevalence of celiac disease. *Theoretical and Applied Genetics*. 121: 1527-1539.
- Varga J., Juhasz A., Kevi F. et Kozakiewicz Z. (2004).** Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. *European Journal of Plant Pathology*. 110: 627-640.
- Wang S.L., Yang C.H., Liang T.W. et Yen Y.H. (2008).** Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bio. Techn.* 99: 3700-3707.

**Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J. et Sing A. (2006).** Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58: 1-75.

**Weber A. (2012).** La maladie cœliaque: physiopathologie et traitement (guide) de conseils pour le pharmacien d'officine. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine.

**Vishwanatha K.S., Appu Rao A.G. et Singh S. A. (2009).** Characterization of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*. 114: 402-407.

**Wrigley C., Bekes F. et Bushuk W. (2006).** Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality. Edited by AACC international press. 446.

**Wu T.Y., Mohammad A.W., Jahim J.M. et Anuar N. (2006).** Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill and effluent (POME) as substrate. *Enzyme Microbiol Technology*. 39: 1223-1229.

# *Annexes*

---

**Annexe 01. Composition du milieu et solutions de production**

**1. Milieu de Sabouraud : (quantité en g /l)**

Peptone pepsine de viande.....	10 gr
Glucose.....	20 gr
Chloramphénicol.....	0.5 gr
Agar Agar bactériologique.....	15 gr
Eau distillée.....	1000 ml

Stérilisation à l'autoclave :121°C pendant 20 minutes

pH  $5.6 \pm 0.2$  à 25°C

**2. Solution utilisée comme agent bactériostatique (Delarras, 2007).**

Acide acétique.....	3 ml
Eau distillée.....	100 ml

**3. Solution pour préparation de l'inoculum (Agrawal *et al.*, 2005 ; Sandhya *et al.*, 2005 ; Paranthman *et al.*, 2009).**

Tween 80.....	0.1 ml
Eau distillée.....	100 ml

**4. Solution minérale pour préparation de la fermentation (Sumantha *et al.*, 2005 ; Sumantha *et al.*, 2006 ; Paranthman *et al.*, 2009) (SM) (% : p/v) : pH = 3.**

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> .....	0.5 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.2 gr
MgSO <sub>4</sub> .....	0.1 gr
NaCl .....	0.1 gr
Eau distillée.....	100 ml

## Annexe 02. Procédé de comptage par la cellule de Malassez

### Principe

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles; Parmi les 100 rectangles totaux, on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

- Le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$
- Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible:  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$

### Mode opératoire

#### 1. Remplissage de la cellule de numération

\* Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plateforme centrale quadrillée.

\* Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

\* Après utilisation, la lame porte-objet et la lamelle planée sont immergées dans un bain d'eau de Javel pendant 5 minutes, puis sont rincées avec de l'eau distillée et essuyées avec du papier (sans froter, en particulier au niveau du quadrillage).

#### 2. Numération

• Observer à l'objectif (**x10**) pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter.

• Observer ensuite à l'objectif (**x40**) pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).

• Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

**NB:** pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

### 3. Calcul de la concentration cellulaire

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension:

**n**: Nombre de cellules comptées.      **V**: Volume de comptage.

**f**: Facteur de dilution.      **N**: Nombre de cellules par litres.

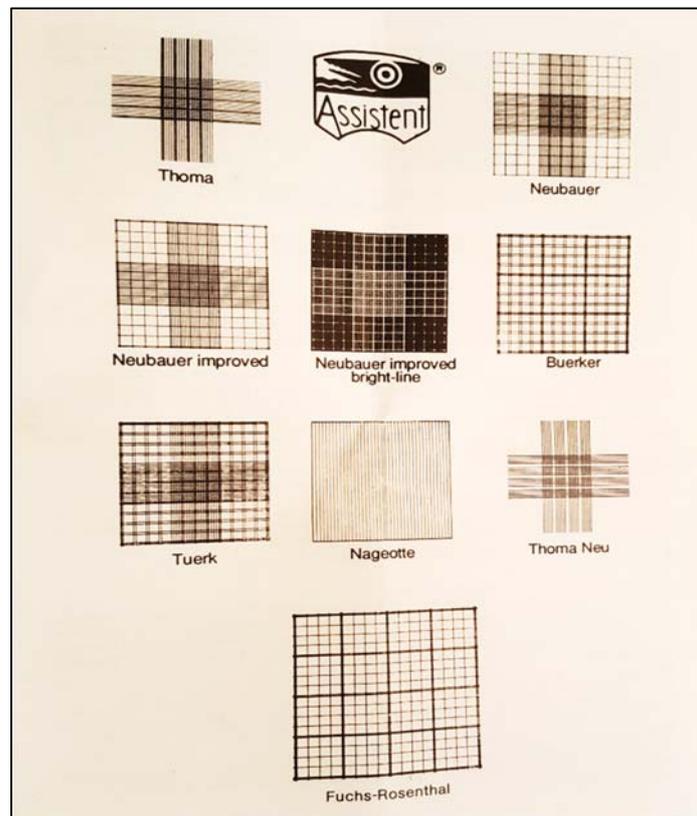
Si on a **n** cellules dans **V** litres, alors on a **N** cellules dans un litre:

$$N \times V = n \times 1$$

$$N = n / V$$

Si la solution avait été diluée:

$$N = (n / V) \times f$$



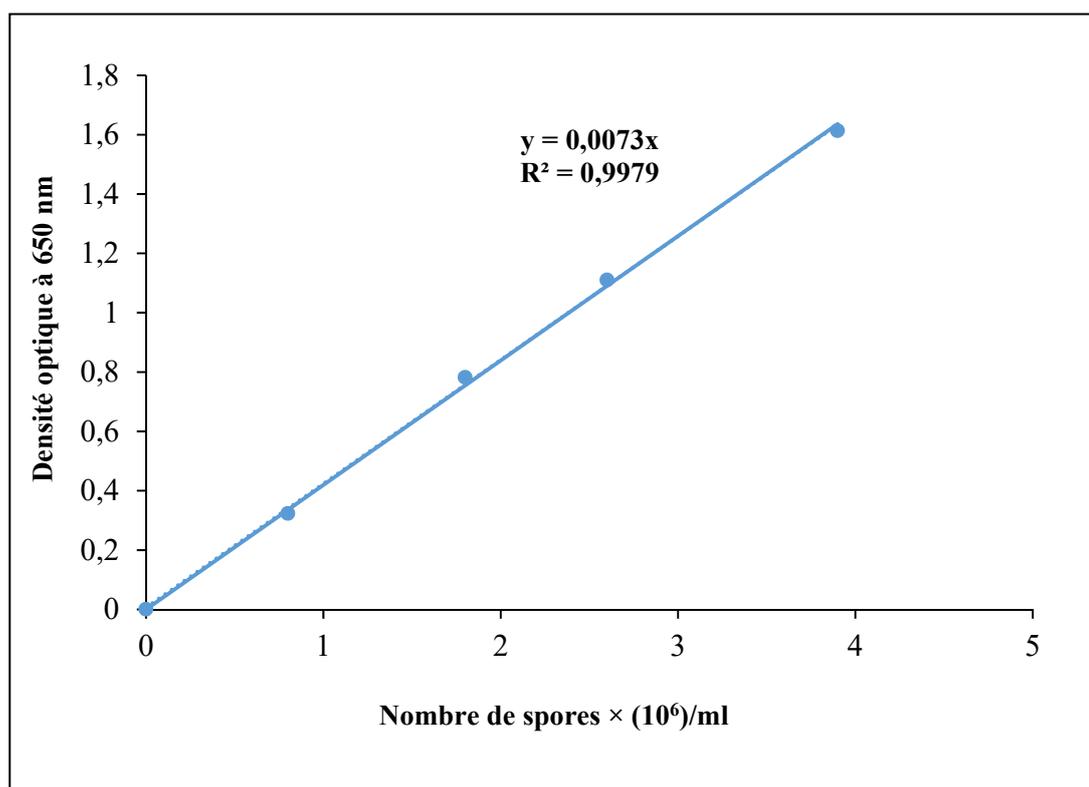
**Photo 01.** Types de cadrillage de la cellule de Malassez (prise personnelle).

**Annexe 03. Courbe d'étalonnage de spores d'*Aspergillus niger*****Principe**

L'estimation du nombre de spores de la suspension fongique est effectuée par la mesure de l'absorbance à 650 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les lectures photométriques sont transformées en nombre de spores par cellules de Malassez sous microscope photonique au grossissement ( $\times 40$ ) (Markwell *et al.*, 1989).

**Mode opératoire**

<b>Nombres de spores <math>\times (10^6)/\text{ml}</math></b>	0	0.8	1.8	2.6	3.9
<b>Densité optique à (650 nm)</b>	0	0.323	0.782	1.110	1.613



**Figure 11.** Courbe d'étalonnage du nombre de spores d'*Aspergillus niger*.

### Annexe 04. Préparation du substrat : son de blé

#### Préparation du substrat

Le son de blé est utilisé comme substrat de base en cas de fermentation sur milieu solide, vue sa richesse en fibres alimentaires insolubles (75% du contenu du germe du grain de blé et plus de 90% dans le cas du son), en protéines et en sels minéraux (Marlett *et al.*, 2002). En plus, il a été prouvé que certaines protéases fongiques ont une très grande spécificité d'action vis-à-vis les protéines des céréales et plus particulièrement celles du blé (gliadines et gluténines), ce qui le rend un excellent substrat pour la production des protéases par *SSF* (Kaur *et al.*, 2001 ; Kumar *et al.*, 2005 ; Sumantha *et al.*, 2005).

Le son de blé caractérisé (tableau 04) a été broyé afin de réduire la taille des particules (0,425- 0,850 mm), puis conservé dans des sachets en plastique ou dans des boîtes stériles avant l'utilisation.

**Tableau 04.** Composition chimique du son de blé dur utilisé (zone de récolte: Tebessa).

Paramètres mesurés	Valeurs expérimentales (%)	Valeurs de la littérature (%) (Onipe <i>et al.</i> , 2015)
Taux d'humidité	12.63	8.1-12.7
Cendre	5.2	3.9-8.1
Protéines	15.3	9.6-18.6
Glucides	63.8	60-75
Lipides	4.23	4.48
Fibres	37.74	33.4-63



**Photo 02.** Préparation du son de blé (une prise personnelle).

**Annexe 05. Détermination du taux d'humidité****Principe**

On procède à la dessiccation des sous-produits à la température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à avoir une masse pratiquement constante (A.O.A.C, 1965).

**Appareillage et réactifs**

- Balance de précision 1/1000 gr.
- Etuve à régulation automatique de température.
- Creusets en matière inerte.
- Dessiccateur à base de grain de silice.

**Mode opératoire**

- \* Une fois lavés, rincés, séchés et refroidis, nous tarons les creusets.
- \* Par la suite nous prenons un poids en matière fraîche (P) comprise entre 3 à 5gr et on pèse l'ensemble ( $M_1$ ).
- \* Mettre les creusets à l'étuve pendant 2 heures à une température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ .
- \* Le refroidissement s'effectue dans un dessiccateur, en pèse l'ensemble après l'étuvage ( $M_2$ ).

**Expression des résultats**

$$\text{TH \%} = \frac{M_1 - M_2}{P} \times 100$$

**P:** 09.37 gr

$$\text{TH \%} = \frac{26.85 - 21.86}{9.37} \times 100$$

**M<sub>1</sub>:** 26.85 gr

**M<sub>2</sub>:** 21.86 gr

Taux d'humidité (TH) initiale = 53.33 %

$$\text{TH \%} = 53.33 \%$$

### Annexe 06. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

#### Solutions utilisées

- Solution mère : 100 µg/ml de tyrosine
- Solution de TCA : 0.4 M
- Solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 0.4 M dans NaOH 0.1 N
- Solution de Folin-Ciocalteu dilué : (1/10<sup>ème</sup>)

#### Mode opératoire (Sathiya, 2013).

N° du tube	Blanc	1	2	3	4	5
Concentration de tyrosine (µg/ml)	0	20	40	60	80	100
Volume de tyrosine prélevé (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
TCA (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> à 0.4 M dans du NaOH 0,1N (ml)	5					
Agitation puis laisser le mélange pendant 15 min pour stabilisation						
Réactif de Folin-ciocalteu dilué (1/10 <sup>ème</sup> )	1					
Incubation à 40 °C pendant 20 min						
Densité optique à (750 nm)	0	0,225	0,450	0,670	0,887	1,111

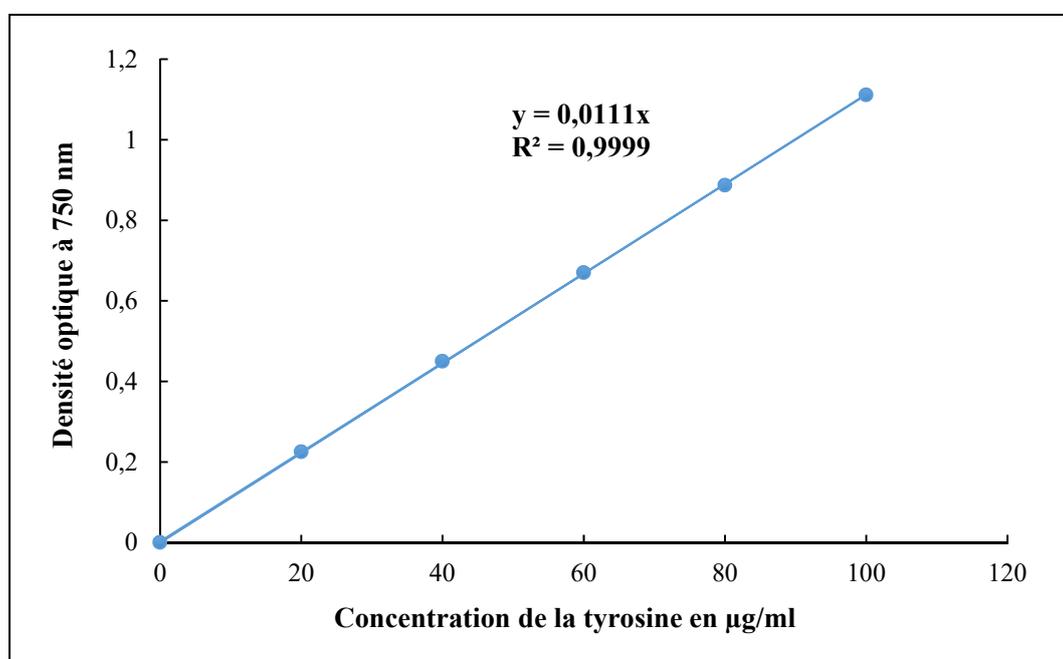


Figure 12. Courbe d'étalonnage de la tyrosine.

## Annexe 07. Extraction de la caséine

### Principe

1. Le caillage du lait se réalise à  $\text{pH} = 4.6$ , deux phases sont obtenues :

- **Caillé** : qui contient la caséine et la matière grasse.
- **Lactosérum ou petit lait** : contenant l'eau et les protéines solubles.

2. A  $\text{pH} = 4.6$  ; la caséine est globalement neutre, les micelles ne se repoussent plus (il n'y a plus de répulsion électrostatique car plus de charge négative). Les matières grasses se réunissent et flocculent car insoluble dans la phase aqueuse.

3. Lors de la dénaturation des micelles ( $\text{pH} = 4.6$ ) : **caséine + matières grasses précipitent.**

4. Les matières grasses sont solubles dans la propanone (acétone), la caséine n'est pas soluble dans ce solvant, un lavage du solide obtenu lors du caillage du lait permet la dissolution des matières grasses et l'extraction de la caséine.

### Mode opératoire

- \* Introduire à l'aide d'une éprouvette graduée, 100 ml de lait écrémé dans un bécher.
- \* Chauffer à l'aide d'un bain-marie à  $40^{\circ}\text{C}$  tout en agitant.
- \* Ajouter goutte à goutte à l'aide d'une pipette environ 20 ml d'acide éthanoïque à 10 %.
- \* Contrôler le pH à l'aide d'un pH-mètre ; ajouter de l'acide éthanoïque toujours goutte à goutte jusqu'à ce qu'il soit 4.6.
- \* Installer une gaze sur un filtre büchner ; essorer le caillé.
- \* Sécher le caillé à l'aide de papiers absorbants.
- \* Mettre le caillé dans un bécher ; ajouter 10 ml d'acétone ; essorer à l'aide d'un büchner muni d'un papier filtre.
- \* Sécher la caséine à l'aide de papiers absorbants. La caséine a été extraite.
- \* Placer la caséine dans une étuve à  $100^{\circ}\text{C}$ . Peser après 30 minutes la masse obtenue.



**Photo 03.** Extraction de la caséine (prise personnelle).

## Annexe 08. Préparation des solutions tampons

Solutions tampons (Gomori, 1955 ; Kamoun, 1987).

Tampon chlorure de potassium-HCl	Tampon acide citrique- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
<p>Chlorure de potassium 0.2 M 14.91g → 1000 ml    Solution (A)</p> <p>HCl 0.2 M 7.29g → 1000 ml    Solution (B)</p> <p><b>pH 1</b> : 50 ml de (A) + 97 ml de (B) compléter à 200 ml</p> <p><b>pH 2</b> : 50 ml de (A) + 10.6 ml de (B) compléter à 200 ml</p>	<p>Acide citrique 0.1 M 21.01g → 1000 ml    Solution (A)</p> <p><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4 (2\text{H}_2\text{O})</math> 0.2 M 35.6g → 1000 ml    Solution (B)</p> <p><b>pH 3</b> : 39.8 ml de (A) + 10.2 ml de (B)</p> <p><b>pH 4</b> : 30.7 ml de (A) + 19.3 ml de (B)</p> <p><b>pH 5</b> : 24.3 ml de (A) + 25.7 ml de (B)</p> <p><b>pH 6</b> : 17.9 ml de (A) + 32.1 ml de (B)</p>
Tampon phosphate	Tampon glycine-NaOH
<p><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0.1 M 9.073g → 1000 ml    Solution (A)</p> <p><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math> 0.1 M 11.87g → 1000 ml    Solution (B)</p> <p><b>pH 7</b> : 41.3 ml de (A) + 58.7 ml de (B)</p> <p><b>pH 8</b> : 3.7 ml de (A) + 96.3 ml de (B)</p>	<p>Glycine 0.2 M 15.01g → 1000 ml    Solution (A)</p> <p>NaOH 0.2 M 8g → 1000 ml    Solution (B)</p> <p><b>pH 9</b> : 50 ml de (A) + 8.8 ml de (B) compléter à 200 ml</p> <p><b>pH 10</b> : 50 ml de (A) + 32 ml de (B) compléter à 200 ml</p>

### Annexe 09. Extraction des gliadines

#### Extraction des gliadines (Singh *et al.*, 1991).

Extraction des gliadines



Farine d'un grain entier broyé au mortier

- Introduire 1 ml de la solution A
- Vortexer le mélange
- Etuver 30 minutes à 65°C avec deux vortex intermédiaires
- Centrifuger 15 minute à 10 000 r.p.m



Récupérer le surnagent



Evaporation du surnagent à 65°C pendant 12 heure



Reprendre le résidu sec

#### Solution utilisée dans l'extraction des gliadines

**Solution A:** Propanol-1..... 50 ml

Eau distillée..... 100 ml

### Annexe 10. Dosage de l'activité protéolytique

#### Solutions utilisées

- Extrait enzymatique déjà préparé
- Solution de caséine à 2% dans le tampon phosphate (pH 7.0)
- Solution de TCA : 0.4 M
- Solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> : 0.4 M dans NaOH 0.1 N
- Solution de Folin-Ciocalteux dilué : (1/10<sup>ème</sup>)

#### Mode opératoire (Tsuchida *et al.*, 1986).

N° du tube	Blanc	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Extrait enzymatique (ml)	1	1	1	1
Solution de caséine à 2 % (ml)	1	1	1	1
Agiter puis incubé le mélange à 40°C au bain marie pendant 30 min				
Solution de TCA à 0.4 M (ml)	2			
Incubation dans un bain de glace pendant 15 min				
Centrifugation à 4500 r.p.m à 4°C pendant 10 min				
Produit de la centrifugation (surnageant) (ml)	1	1	1	1
Solution Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> à 0.4 M dans NaOH 0.1 N (ml)	5			
Réactif de Folin-ciocalteu dilué (1/10 <sup>ème</sup> ) (ml)	1			
Incubation à 40°C pendant au bain marie 20 min à l'obscurité				
<b>Mesure de la densité optique à 750 nm</b>				

#### Mesure de l'activité protéolytique

Une unité de protéolyse correspond à la libération de 1µg de tyrosine résultante de l'hydrolyse enzymatique par heure et dans un ml d'échantillon (1µg/h/ml). La concentration déduite de la courbe d'étalonnage de la tyrosine.

**Activité protéolytique (µg/h/ml) = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x 2 (pour ramener le temps à 1h).**

### Annexe 11. Détermination de l'activité protéolytique et l'activité relative

#### pH optimum

pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Activité protéolytique (µg/ml/h)</b>	70.92	76.23	133.95	119.52	105.23	82.18	78.54	46.25	21.06	14.01
<b>Activité relative (%)</b>	52.95	56.91	100	89.23	78.56	61.35	58.63	34.53	15.72	10.46

#### Température optimale

Température (°C)	30	40	50	60	70	80
<b>Activité protéolytique (µg/ml/h)</b>	61.28	133.95	141.50	63.32	29.04	19.12
<b>Activité relative (%)</b>	43.31	94.56	100	44.75	20.52	13.51

#### Stabilité à la température optimale

Temps (min)	10	20	30	40	50	60	70	80	90
<b>Activité protéolytique (µg/ml/h)</b>	122.63	132.92	140.90	125.04	121.94	128.35	126.32	138.06	146.97
<b>Activité relative (%)</b>	83.44	90.44	95.87	85.08	82.97	87.33	85.95	93.94	100

L'activité relative (%) est calculée en considérant l'activité protéolytique (µg/ml/h) maximale comme 100 %.

## Résumé

Cette étude a comme but principal d'étudier une enzyme protéolytique produite par une souche d'*Aspergillus niger* et son effet sur la gliadine (gluten).

Dans ce travail nous avons procédé à extraire une enzyme protéolytique à partir d'une souche appartenant au genre *Aspergillus* et l'espèce *Aspergillus niger*, souche fongiques isolée et identifiée. La culture de l'*Aspergillus niger* a été effectuée sur milieu solide à base de son de blé humidifié, après l'extraction dans les conditions optimales, le produit de la fermentation sert comme extrait enzymatique brut.

L'extrait enzymatique brut d'*Aspergillus niger* a une activité protéolytique de l'ordre de 78,54 µg/ml/h (UP), avec un pH optimum de 3.0 et une température optimale de 50°C. Cette protéase a résisté à la température optimale après incubation de 90 min.

Nos résultats semblent mettre en évidence une activité protéolytique de la protéase de la souche d'*Aspergillus niger* sur la gliadine. La dégradation de la gliadine issue de blé tendre (*Triticum aestivum*) (50.30 UP) était plus élevée que celle de la gliadine de blé dur (*Triticum durum*) (45.69 UP).

On suggère que l'enzyme protéolytique d'*Aspergillus niger* peut représenter une piste thérapeutique potentielle dans le traitement de la maladie cœliaque.

**Mots clés :** *Aspergillus niger*, protéase, activité protéolytique, gliadine, maladie cœliaque.

## **Abstract**

The main purpose of this study is to study a proteolytic enzyme produced by a strain of *Aspergillus Niger* and its effect on gliadin (gluten).

In this work we proceeded to extract a proteolytic enzyme from a strain belonging to the genus *Aspergillus* and the species *Aspergillus niger*, fungal strain isolated and identified. The culture of *Aspergillus Niger* was carried out on solid medium based on bran of wheat moistened, after extraction under optimum conditions, the product of fermentation serves as crude enzymatic extract.

The crude enzymatic extract of *Aspergillus niger* has a proteolytic activity of the order of 78.54  $\mu\text{g/ml/h}$  (UP), with an optimum pH of 3.0 and an optimum temperature of 50°C. This protease was resistant to optimum temperature after 90 min incubation.

Our results seem to show a proteolytic activity of the protease of the strain of *Aspergillus Niger* on the gliadin. The degradation of gliadin from soft wheat (*Triticum aestivum*) (50.30 UP) was higher than that of durum wheat (*Triticum durum*) (45.69 UP).

It is suggested that the proteolytic enzyme of *Aspergillus niger* may represent a potential therapeutic path in the treatment of celiac disease.

**Key words:** *Aspergillus niger*, protease, proteolytic activity, gliadin, celiac disease.

## ملخص

هذه الدراسة أنجزت لأجل هدف رئيسي وهو دراسة إنزيم بروتيني تنتجه سلالة من الرشاشيات النيجر وتأثيره على الغليادين (الغاوتين).

في هذا العمل الذي شرع في استخراج إنزيم بروتين من سلالة تنتمي إلى جنس الرشاشيات ونوع الرشاشيات النيجر، سلالة الفطرية المعزولة والتي تم تحديدها. تم إجراء ثقافة الرشاشيات النيجر في وسط صلب بناء على القمح مرطب، بعد استخراج تحت الظروف المثلى، يتم استخدام المنتج التخمر باسم استخراج إنزيم الخام.

استخراج إنزيم الخام من الرشاشيات النيجر لديه نشاط بروتين من أجل من 78.54 ملغ / مل / ساعة مع درجة الحموضة المثلى من 3.0 ودرجة الحرارة المثلى 50 درجة مئوية. صمد هذا الأنزيم البروتيني درجة الحرارة المثلى من الحضانة بعد 90 دقيقة.

تسليط الضوء على نتائجنا نشاط بروتين من البروتيني من الرشاشيات النيجر يوم غليادين. كان تدهور غليادين بعد القمح (45.69 UP) أعلى من غليادين من القمح القاسي (الحنطة القاسي) (50.30 UP) (الحنطة ايسنيفوم).

ويشار إلى أن الإنزيم البروتيني المنتج من طرف رشاشيات النيجر قد يمثل النهج او المسار العلاجي المحتمل في علاج مرض الاضطرابات الهضمية.

**الكلمات المفتاحية:** رشاشيات النيجر، الأنزيم البروتيني، النشاط بروتين، الغليادين، مرض الاضطرابات الهضمية.



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

### Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : ..... BOUGHERARA Chahrazad .....

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : ..... Biologie Appliquée .....

N° de carte d'étudiant : ..... 10/4017625/2010 .....

Année universitaire : ..... 2016/2017 .....

Domaine: ..... Sciences de la nature et de la vie .....

Filière: ..... Sciences alimentaires .....

Spécialité: ..... Qualité des produits et sécurité alimentaire .....

Intitulé du mémoire : .....

..... Etude de l'effet d'un extrait enzymatique  
..... protéolytique d'Aspergillus niger sur la gliadine (gluten) .....

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : ..... 25/05/2017 .....

Signature de l'étudiant(e) :



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi - Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

### Déclaration sur l'honneur de non-plagiat

(à joindre obligatoirement au mémoire, remplie et signée)

Je soussigné(e),

Nom, Prénom : ALIANI Mabrouk

Régulièrement inscrit(e) en Master au département : Biologie appliquée

N° de carte d'étudiant : 01/611683/2001

Année universitaire : 2016 / 2017

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences alimentaires

Spécialité : Qualité de produit et sécurité alimentaire

Intitulé du mémoire :

Etude de l'effet d'un extrait enzymatique  
protéolytique d'*Aspergillus niger* sur la gliadine (gluten).

Atteste que mon mémoire est un travail original et que toutes les sources utilisées ont été indiquées dans leur totalité. Je certifie également que je n'ai ni recopié ni utilisé des idées ou des formulations tirées d'un ouvrage, article ou mémoire, en version imprimée ou électronique, sans mentionner précisément leur origine et que les citations intégrales sont signalées entre guillemets

Sanctions en cas de plagiat prouvé :

L'étudiant sera convoqué devant le conseil de discipline, les sanctions prévues selon la gravité du plagiat sont :

- L'annulation du mémoire avec possibilité de le refaire sur un sujet différent ;
- L'exclusion d'une année du master ;
- L'exclusion définitive.

Fait à Tébessa, le : 25/05/2017

Signature de l'étudiant(e) :