

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf : ...../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2020

**MEMOIRE DE FIN DE CYCLE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME**  
**MASTER**

**Domaine** : SNV                      **Filière** : Sciences Biologiques  
**Spécialité** : Biochimie Appliquée

**Présenté par :**

*BAGHDAD Louiza & KADDOUR Taous*

***Thème***

***Extraction, Recherche, identification et caractérisation  
d'une activité protéolytique d'intérêt industriel à partir  
d'un homogénat du système digestif du poisson***

**Soutenu le : 22 /09/2020**

**Devant le jury composé de :**

<i>M. IMESSAOUDENE Ali</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M. CHERGUI Achour</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promoteur</i>
<i>M. TIGHRINE Abderrahmane</i>	<i>MAB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examineur</i>

**Année Universitaire : 2019/2020**

## Remerciement

Avant tous, nous tenons à remercier **Allah** le tout puissant qui nous a donné les ailes du savoir, le courage, la patience et la volonté pour poursuivre nos études et pouvoir accomplir ce modeste travail.

Nous exprimons toute notre profonde reconnaissance et nos sincères remerciements à notre promoteur Mr. **CHERGUI Achour** Maitre de conférence de classe B- Université de Bouira de nous avoir confié ce sujet de recherche, pour ses précieux conseils, ses remarques pertinentes ainsi que son encouragement et son orientation. Nous le remercions également pour sa compréhension, sa responsabilité et sa disponibilité tout au long de ce travail, et surtout pour sa patience dans la correction de ce manuscrit, pour son savoir qui nous a bien transmit durant son enseignement.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mr. **IMESSAOUDENE Ali** Maitre Assistant de classe A- Université de Bouira pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'être président du jury.

Nous adressons également nos respectueux remerciements à Mr. **TIGHRINE Abderrahmane**, Maitre Assistant de classe B- Université de Bouira d'avoir accepté de faire partie de ce jury, nous sommes très reconnaissantes pour le temps qu'il a consacré à examiner et évaluer ce travail.

Notre profonde gratitude à Mme. **ALIBAI Chafika** membre de la direction générale à l'unité de production au niveau de l'industrie pharmaceutique Sidal Dar El Beidha-Alger, pour sa disponibilité quasi-immédiate, son soutien moral et ses encouragements. Ainsi que pour tous ses efforts de nous fournir le matériel nécessaire pour la réalisation de la partie pratique prévue de notre mémoire.

Nous remercions également la directrice du centre de recherche et de développement (CRD) Sidal Berraki-Alger Mme. **AZINE Kenza** d'avoir accepté de nous accueillir au sein des laboratoires (pharmaco-toxicologique et analytique) pour accomplir le stage pratique de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également à tous les enseignants de notre département pour le savoir qui nous ont transmis durant notre cursus universitaire et leur contribution à notre formation.

## Dédicace

*Je dédie ce mémoire à mes chers parents qui trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude.*

*A la plus belle créature que Dieu a créé sur terre, à celle qui m'a donné la vie, à la source de tendresse, de courage, de patience et de générosité, ma mère «**Malika Medjras**», qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, sa prière et sa bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Dieu le tout puissant et le miséricordieux, te préserve et t'accorde santé, longue vie et bonheur.*

*A mon père «**Amar Baghdad**», le symbole de la bonté par excellence, l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager, aucune dédicace ne saurait assez éloquente pour exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai pour toi. Ce travail est le fruit de tous tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A mon cher frère «**Khaled**», mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour toi, merci pour ta générosité, ton soutien moral, ton encouragement et pour tout le sacrifice que tu as donné pour moi. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*À la mémoire de mes grands-parents que Dieu ait leur âme, qui ont été toujours dans mon esprit et dans mon cœur.*

*A ma grande mère maternelle «**Dahbia**», conseiller, et amie fidèle. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A tous les membres de ma famille, mes tantes, mes oncles, mes cousins et cousines (**Assia, Sarah, Melissa, Leila, Sabrina, Manel, Imane, Ikrame, Asma, Farida**).*

*A ma binôme et amie «**Taous**» avec qui j'ai partagé ce modeste travail.*

*A Mme. «**AOUDJIT Saliha**» mon enseignante de primaire, pour son soutien et son encouragement et surtout pour les bonnes bases du savoir qu'elle nous a transmis, qu'elle trouve ici les sentiments de mon profond respect*

*A tous mes amies (**Loubna, Mira, Lydia, Kenza, Messaouda, Imane**).*

*A tous mes camarades de la promotion Master II «**Biochimie appliquée**».*

*A tous mes enseignants qui m'ont marquée.*

**LOUIZA**

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail :*

*À mes parents, **Chadia ADJAOUDI** source de tendresse et la lumière de ma vie, et **Amar KADDOUR** mon héros et mon ange gardien, les deux qui m'ont donné une éducation fondée sur le respect, l'aptitude à la vie et la modestie. Ils m'ont appris le sens de l'altruisme et de la patience, qui m'ont constamment encouragé et n'ont cessé de m'apporter leur amour. Sans eux, leurs prières et leurs sacrifices, je ne puisse arriver à ce que je suis.*

*A mon frère **Idir**, ma fierté, qui a toujours su respecter mes décisions et qui m'a soutenu aux moments de faiblesse.*

*A la mémoire de mes grands-parents paternels que Dieu les accueille dans ses vastes paradis.*

*A mes grands-parents maternels qui m'ont encouragé et m'ont guidé avec leurs conseils en or et leurs prières. Que Dieu leur donne une longue vie et une bonne santé.*

*A toute ma famille et les personnes qui me sont chères.*

*A mon promoteur **M. CHERGUI Achour** maître de conférence et responsable du Master Biochimie Appliquée à l'université d'Akfi Mouhand Oulhadj- BOUIRA, qui est toujours prêt pour assumer sa responsabilité scientifique. Son savoir-faire m'a permis d'avoir conscience des objectifs à atteindre lors de la réalisation de ce travail.*

*A ma camarade et amie **Louiza** pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

*A mes amis : **Taous, Faten, Salima, Zouina, Houda, Fatima** et **Yacine** qui sont toujours à mes côtés pour m'offrir leur soutien.*

*A ceux qui m'ont créé la force et le courage de foncer et de travailler.*

**TAOUS**

# Table des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Introduction..... 1

### Chapitre I : Généralités sur la sardine

#### I.1. Présentation de l'espèce d'étude *sardina pilchardus* ..... 3

I.1.1. Classification et position systématique .....3

I.1.2. Description et caractères distinctifs .....4

I.1.3. Habitat et répartition géographique .....5

I.1.4. Reproduction et croissance.....6

I.1.5 Nutrition et digestion .....6

#### I.2. Valorisation des coproduits de poisson..... 7

### Chapitre II : Les protéases de Poisson

#### II.1. Généralités sur les protéases ..... 9

II.1.1. Définition et fonctions des protéases .....9

II.1.2. Classification ..... 10

II.1.2.1. Les exopeptidases .....10

II.1.2.2. Les endopeptidases .....11

#### II.2. Les protéases digestives du poisson ..... 15

II.2.1. Classification des protéases digestives du poisson..... 16

II.2.1.1. Les protéases gastriques .....16

II.2.1.2. Les protéases intestinales et hépatopancréatiques.....18

II.2.2. Applications potentielles des protéases digestives du poisson .....21

II.2.2.1. Industrie Agroalimentaire.....21

II.2.2.2. Industrie pharmaceutique et recherche médicale .....23

II.2.2.3. Industrie des détergents .....24

II.2.2.4. Autres applications.....24

## **Chapitre III : Méthodes d'étude des protéases digestives de la sardine**

<b>III.1.Extraction des protéases digestives de la sardine <i>Sardina Pilchardus</i>.</b>	<b>25</b>
III.1.1. Préparation de l'échantillon .....	25
III.1.2. Obtention de l'extrait brut enzymatique .....	26
<b>III.2. Méthodes de dosage .....</b>	<b>29</b>
III.2.1. Dosage de l'activité protéolytique.....	29
III.2.1.1. Méthode d'Anson, 1938.....	29
III.2.1.2. Méthode de Park <i>et al.</i> , 1995.....	31
III.2.1.3. Détection de l'activité enzymatique par la technique de « Zymographie » .....	31
III.2.1.4. Evaluation des propriétés technologiques des protéases de la sardine.....	32
III.2.2. Dosage des protéines .....	33
III.2.2.1. La méthode de Bradford (1976) .....	34
III.2.2.2. La méthode Lowry <i>et al.</i> (1951).....	34
<b>III.3. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.....</b>	<b>35</b>
<b>III.4. Dialyse des extraits enzymatiques .....</b>	<b>36</b>
<b>III.5. Purification et caractérisation des protéases digestives de la sardine</b>	<b>37</b>
III.5.1. Méthodes de purification .....	37
III.5.1.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	38
III.5.1.2. Chromatographie échangeuse d'ions .....	39
III.5.1.3. Chromatographie d'affinité .....	40
III.5.1.4. Electrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970).....	41
III.5.1.5. Paramètres d'évaluation de la purification.....	43
III.5.2. Méthodes de caractérisation.....	43
III.5.2.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	43
III.5.2.2. La spectroscopie infrarouge (IR) .....	44
III.5.2.3. La spectrométrie de masse (SM) .....	45
III.5.2.4. La diffraction aux rayons X (DRX) .....	46
III.5.2.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) .....	47
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>49</b>
<b>Références bibliographiques</b>	

## Liste des abréviations

<b>µg</b>	: Microgramme.
<b>Å</b>	: Ångström.
<b>AC</b>	: Activité Coagulante.
<b>AP</b>	: Activité Protéolytique.
<b>APD</b>	: N-acétyl-L-phénylalanine-3,5-diiodo-1-tyrosine.
<b>Arg</b>	: Arginine.
<b>ASP</b>	: Processus de solubilisation acide.
<b>BAPNA</b>	: N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-P-nitroanilide.
<b>BBC</b>	: Bleu Brillant de Coomassie.
<b>BSA</b>	: Sérum Albumine Bovin.
<b>CA</b>	: Chromatographie d’Affinité.
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	: Chlorure de calcium ou dichlorure de calcium.
<b>Cys</b>	: Cystéine.
<b>DAN</b>	: Ester méthylique de diazoacetyl-DL-norleucine.
<b>DIFP</b>	: Diisopropylfluorophosphate.
<b>DRX</b>	: Diffraction aux Rayons X.
<b>DTT</b>	: Dithiothreitol.
<b>E-64</b>	: Transepoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane.
<b>EC</b>	: Enzymes Commission.
<b>EDTA</b>	: Ethylene Diamine Tetra Acetate.
<b>EPNP</b>	: 1,2-époxy-3-(P-nitrophénoxy) propane.
<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organization (organisation des nations unies pour l’alimentation et l’agriculture).
<b>HCl</b>	: L'acide chlorhydrique.
<b>HCN</b>	: Acide cyanhydrique.
<b>His</b>	: Histidine.
<b>HPLC</b>	: High Performance Liquid Chromatography.
<b>IR</b>	: Infra Rouge
<b>KDa</b>	: Kilo Daltons.
<b>Lys</b>	: Lysine.
<b>M</b>	: Molaire.
<b>Met</b>	: Méthionine.
<b>ml</b>	: Millilitre.
<b>nm</b>	: Nanomètre.
<b>p/v</b>	: Poids/Volume.
<b>pH</b>	: Potentiel d’Hydrogène.
<b>U</b>	: µg.h <sup>-1</sup> .ml <sup>-1</sup> .

<b>Phe</b>	: Phénylalanine.
<b>PM</b>	: Poids Moléculaire.
<b>PMSF</b>	: Phenylmethanesulfonylfluoride.
<b>PPO</b>	: Polyphénol Oxydase.
<b>Rf</b>	: Rapport frontal.
<b>RMN</b>	: Résonance Magnétique Nucléaire.
<b>SAAApnc</b>	: Succinyl-Ala-Ala-Ala-P- nitroanilide.
<b>SAAPFFpNA</b>	: Succinyl-L-ala-ala-prolphenylalanine-p-nitronalide
<b>SAAPFpna</b>	: Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-Phe-P- nitroanilide.
<b>SDS</b>	: Sodium Dodecyl Sulfate (laurylsulfate).
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis.
<b>SEC</b>	: Chromatographie d'Exclusion Moléculaire.
<b>Ser</b>	: Sérine.
<b>SM</b>	: Spectroscopie de Masse.
<b>TCA</b>	: Acide trichloroacétique.
<b>TIMP-1/ TIMP-2</b>	: Tissue Inhibitor of Metalloproteinases.
<b>Tris-HCl</b>	: (hydroxyméthyl) aminométhane, ou 2-amino-2 hydroxyméthylpropane-1,3-diol.
<b>Trp</b>	: Tryptophane.
<b>Tyr</b>	: Tyrosine.
<b>UAC</b>	: Unité d'Activité Coagulante.
<b>UP</b>	: Unité Présure.
<b>US</b>	: Unité Soxhlet.
<b>UV</b>	: Ultraviolet.
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	: Zinc.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Morphologie externe de la sardine <i>Sardina pilchardus</i> .....	5
<b>Figure 02</b> : L'aire de répartition de la <i>Sardina Pilchardus</i> .....	6
<b>Figure 03</b> : Schéma théorique du système digestif de la sardine <i>sardina pilchardus</i> .....	7
<b>Figure 04</b> : Principaux coproduits de poisson .....	8
<b>Figure 05</b> : Image schématisant la coupure protéolytique .....	9
<b>Figure 06</b> : Mécanismes catalytiques des endoprotéases.....	14
<b>Figure 07</b> : Photographie originale des échantillons de sardine pêchée dans la côte Algérienne (2020).....	25
<b>Figure 08</b> : Photographies originales représentant la dessiccation (a) et l'éviscération (b) de la sardine (2020).....	26
<b>Figure 09</b> : Photographie originale des différentes parties du système digestif récupérées de la sardine après dessiccation et éviscération.....	26
<b>Figure 10</b> : Procédure d'extraction, de purification et de caractérisation des protéases digestives de la sardine .....	28
<b>Figure 11</b> : Principe générale de dosage de l'activité protéolytique par méthode d'Anson 1938 .....	29
<b>Figure 12</b> : Principe général du dosage du pepsinogène sanguin par la méthode protéolytique d'Anson 1938 sur BSA comme substrat .....	30
<b>Figure 13</b> : Principe fondamental de la Chromatographie d'exclusion moléculaire .....	38
<b>Figure 14</b> : Principe de la chromatographie échangeuse d'ions .....	40
<b>Figure 15</b> : Principe générale de la chromatographie d'affinité .....	41
<b>Figure 16</b> : Principe de la séparation des protéines par SDS-PAGE.....	42
<b>Figure 17</b> : Représentation schématique d'un dispositif d'HPLC.....	44
<b>Figure 18</b> : Photographie d'un spectromètre infrarouge .....	45
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique des constituants d'un spectromètre de masse .....	46
<b>Figure 20</b> : Diffraction des rayons X par les électrons d'un atome de cristal des protéines ....	47
<b>Figure 21</b> : Principe général sur la diffraction aux rayons X.....	47
<b>Figure 22</b> : Dispositif de RMN.....	48

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Position systématique de <i>Sardina Pilchardus</i> .....	3
<b>Tableau 02</b> : Les noms vernaculaires de <i>Sardina pilchardus</i> .....	4
<b>Tableau 03</b> : Classification des protéases .....	11
<b>Tableau 04</b> : Propriétés des endoprotéases .....	14
<b>Tableau 05</b> : La température optimale, le pH optimal et la masse moléculaire de certaines protéases gastriques du poisson .....	18
<b>Tableau 06</b> : La température optimale, le pH optimal, la masse moléculaire et le substrat spécifique de certaines protéases intestinales du poisson.....	20
<b>Tableau 07</b> : Les différents substrats utilisés pour le dosage de l'activité enzymatique par la méthode d'Anson, 1938 de quelques protéases digestives de poisson .....	31
<b>Tableau 08</b> : Monogramme des pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium pour 1 l de solution tampon et une température de 0-4 °C .....	36
<b>Tableau 09</b> : Exemples de certaines protéases de poisson précipitées par sulfate d'ammonium à différents taux de saturation .....	37

La réalisation de la partie pratique de ce mémoire était prévue d'être faite en collaboration avec l'industrie pharmaceutique SAIDAL, au sein des laboratoires de Centre de Recherche et de Développement (CRD) Gué de Constantine Berraki - Alger, qui consiste à l'extraction et la purification des protéases de système digestif de poisson, suivie par leur identification et caractérisation par l'étude de leurs propriétés structurales et fonctionnelles, à l'aide des techniques de caractérisation disponibles au niveau de ces laboratoires (électrophorèse, HPLC, spectroscopie de masse...), afin d'obtenir un produit enzymatique à intérêt industriel.

Vu la situation critique qu'on vit aujourd'hui, en l'occurrence la pandémie du COVID-19, la partie pratique de ce mémoire n'était pas réalisée, cette dernière était annulée, et cela suite à la décision de l'équipe de formation de notre université qui consiste à transformer cette partie expérimentale en une recherche d'actualité.

# *Introduction*

## **Introduction**

Les enzymes protéolytiques ou protéases sont des macromolécules qui catalysent l'hydrolyse des protéines d'une manière très ciblée. Actuellement, elles constituent le groupe d'enzymes industrielles le plus important dans le monde, en raison de leur plus grande efficacité, en plus d'être biodégradables. Elles ont trouvé leur application dans divers domaines industriels tels que le domaine alimentaire, biotechnologique et pharmaceutique (**Bose et al., 2019 ; Gurumallesh et al., 2019**).

Les protéases ont de nombreuses sources différentes dans la nature, notamment les animaux (**Mosztbacher et al., 2019**), les plantes (**Salehi et al., 2017**) et les microorganismes (**Matsuoka et al., 2017**). Toutefois, l'extraction et la purification des protéases à partir de ces sources présentent un coût élevé (**Ben Elhoul., et al 2015 ; Victor Dos Cardoso Santos et al., 2016**). Afin de remédier à cette situation, plusieurs recherches ont activement poussée ses dernières années, visant à la mise en évidence des protéases de remplacement à partir des organismes marins comme une source alternative qui pouvant être utilisées dans diverses industries (**Saranya et al., 2018**).

Par ailleurs, les poissons referment des enzymes protéolytiques très actives, notamment au niveau de leur système digestif non encore bien exploitées qui méritent l'identification et l'application. Ceci est dû principalement :

- Au caractère poïkilotherme des poissons, leur régime alimentaire et les préférences de températures variées. Ce qui suppose une variation dans les types et les caractéristiques de leurs enzymes digestives. (**El Beltagy et al., 2004 ; Klomklao et al., 2007**) ;
- Aux propriétés physicochimiques et catalytiques uniques de ces protéases, comme une stabilité thermique faible et une activité spécifique moléculaire à basse température (**Amiza et Owusu, 2002 ; Victor Dos Santos et al., 2016**) ;
- La disponibilité croissante des viscères, qui constitue une source potentielle de protéases leur utilisation est importante d'un point de vue économique et environnemental (**Taghizadeh Andevvari et al., 2019**) ;
- La sécurité et la législation concernant l'utilisation d'enzymes dérivées du poisson sont minimales car le poisson est considéré comme une source naturelle. En plus, il n'existe aucune contrainte religieuse (**Khangemban et Chakrabarti, 2018**).

En Algérie, la sardine *Sardina pilchardus* est l'une des espèces de poisson pélagique très ré pondue, présentant un intérêt important du point de vue économique et social. A cet effet, ces viscères semblent donc intéressants pour être valorisés afin d'extraire des protéases.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre général de la valorisation enzymatique des sous-produits de la sardine. Dans cette optique, notre objectif principal porte essentiellement sur l'étude de deux points principaux :

- Recherche et identification d'une activité protéolytique dans l'homogénat du système digestif de la sardine bleue *Sardina Pilchardus*;

- Etude des protéases digestives de ce poisson en déterminant leurs caractéristiques biochimiques (structurelles et fonctionnelles), ce qui pourrait les adapter à différentes applications industrielles.

La démarche méthodologique suivie dans cette étude est basée sur des approches complémentaires constituées en trois chapitres.

Le premier chapitre fait l'état d'une présentation de l'espèce d'étude la sardine bleue *sardina pilchardus* et l'intérêt de la valorisation des coproduits de poisson. Le deuxième chapitre est consacré essentiellement pour les protéases de poisson, où on a commencé par des généralités sur les protéases. Puis, traiter spécialement les protéases digestives de poisson et leur classification en fonction de leur localisation au niveau du système digestif. Par la suite on a accosté les différentes applications potentielles de ces protéases dans diverses industries.

En fin, le troisième chapitre évoque les différentes méthodes d'étude des protéases de la sardine. Débute initialement par les étapes d'extraction des protéases à partir de système digestif de ce poisson. Suivi par la mise en évidence de l'activité protéolytique par diverses méthodes de dosage des protéines et de l'activité enzymatique. Par la suite, les différentes méthodes de purification et de caractérisation innovantes de ces protéases ont été décrites.

***Chapitre I :***  
***Généralités sur la sardine***

## Chapitre I : Généralités sur la sardine

### I.1. Présentation de l'espèce d'étude *sardina pilchardus*

D'après **FAO, (2018)** la production mondiale de pêche de capture était d'environ 90,9 millions de tonnes en 2016. Toutefois, la production annuelle en Algérie a régulièrement augmenté soit environ 120 000 tonnes par an.

En outre, la pêche sardinière, l'une des principales composantes des produits de la pêche, qui serait évaluée à 70% des ressources halieutiques est destinée dans sa totalité à satisfaire le marché interne en Algérie.

En termes de flottille de pêche, celle des sardiniers représente 30% du total de la flottille de pêche de la Méditerranée. Selon le suivi des stocks nationaux de poissons, le stockage mondial de la sardine *sardina pilchardus* est à équivalent de 106 780 tonnes, ce qui fait que la sardine est l'une des espèces les plus exploitées et les plus étudiées au monde (**Benguendouz, 2018 ; Chikhi, 2018 ; FAO, 2018**).

#### I.1.1. Classification et position systématique

La sardine appartient à un groupe taxonomique complexe qui regroupe les poissons pélagiques marins ou dulçaquicoles. En 1792, Walbaum a séparé la sardine du sprat et lui a attribué son nom *Sardina pilchardus* (**Ladaimia, 2017**). Dans le genre *Sardina*, il n'existe que cette espèce *Sardina pilchardus* ou dite sardine Européenne (**Benguendouz, 2018**).

La classification de la sardine selon **Walbaum (1792)** est montrée dans le **tableau 01** suivant.

**Tableau 01** : Position systématique de *Sardina Pilchardus* (**Whitehead, 1985**)

Taxonomie	Description
Embranchement	Chordés
Sous-embranchement	Vertébrés
Super classe	Ostéichtyens (poisson osseux)
Classe	Actinoptérygiens
Sous classe	Néoptérygiens
Super ordre	Téléostéens
Ordre	Clupéiformes (forme de tube)
Sous ordre	Clupéoidés
Famille	Clupéidés
Genre	<i>Sardina</i>
Espèce	<i>Pilchardus</i>
Nom binominal	<i>Sardina pilchardus</i>

Selon **Whitehead, (1985)**, le nom le plus utilisé pour la sardine c'est *Sardina pilchardus*, néanmoins, cette dernière a reçu plusieurs dénominations au fil des années telles *Arengus minor* (Cornide, 1788), *Clupanodon sardina* (Risso, 1827), *Clupea sardinia* (Lowe, 1837), *Clupea laticosta* (Lowe, 1843), *Clupea pilchardus* (Günther, 1868) et *Sardina dobrocigica* (Antipa, 1906). Les noms vernaculaires de cette espèce selon FAO sont représentés dans le **tableau 02**.

**Tableau 02** : Les noms vernaculaires de *Sardina pilchardus* (**Davidson, 2002**)

Pays	Appellation
Algérie	Sardine
Angleterre	European pilchard
Espagne	Sardina europea
France	Sardine commune
Grèce	Sardèlla
Italie	Sardina
Tunisie	Sardina
Turquie	Sardalya

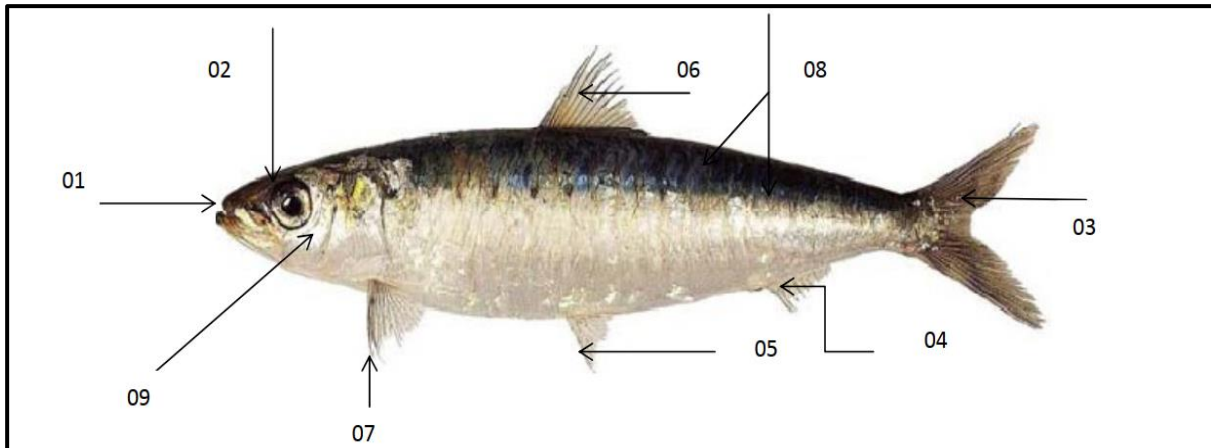
### 1.1.2. Description et caractères distinctifs

*Sardina pilchardus*, communément appelée sardine, est un petit poisson à corps fusiforme et allongé avec une carène ventrale peu développée, plutôt arrondie avec un museau légèrement saillant (**Ladaimia, 2017**), dont la taille moyenne est de 10 à 20 cm et peut atteindre une taille maximale de 25 cm. De couleur bleu sombre sur le dos avec des reflets verdâtres, argentés sur les flancs et blanc au niveau du ventre, sa peau est recouverte de grandes écailles, argentées et sessiles qui se détachent facilement du corps sauf sur la tête (**Benguendouz, 2018**). Avec présence de paupières adipeuses en avant et en arrière de l'œil (**Figure 01**).

La sardine présente deux mâchoires subgales et deux opercules non échancrés ornés de 3 à 5 stries rayonnantes bien marquées, sous chaque opercule se trouve quatre branchies (organes respiratoires) qui permettent l'échange gazeux entre le milieu aquatique et le sang.

Elle possède une série de taches sombres le long des flancs supérieurs, avec une seule nageoire dorsale située en avant de celle des pelviennes et la nageoire anale se termine par deux rayons plus longs que les autres (**Whitehead, 1985 ; Jemaa, 2014**).

La sardine peut se distinguer des autres poissons pélagiques par l'absence d'une fente médiane à la mâchoire supérieure, la position de l'extrémité postérieure de la bouche, la présence des stries rayonnantes sur l'opercule ainsi que des points sombres sur les côtés du corps (**Benomar, 2017**).

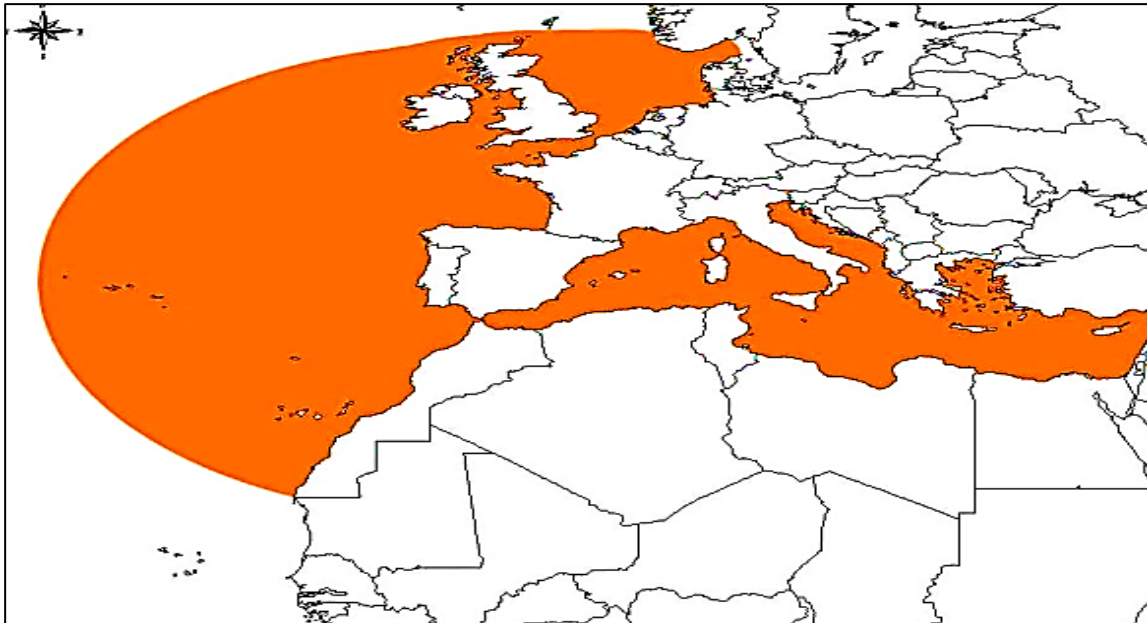


**Figure 01** : Morphologie externe de la sardine *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) ; 1-La bouche, 2- L'œil, 3- Nageoire caudale, 4- Nageoire anale, 5- Nageoire pelvienne, 6- Nageoire dorsale, 7- Nageoire pédonculaire, 8- Macule noirâtre, 9- Opercule strié (Benomar, 2017)

### I.1.3. Habitat et répartition géographique

La sardine possède une aire de répartition assez large (Bouhali, 2016). C'est une espèce pélagique côtière rencontrée dans le Nord Atlantique, dans les mers méditerranée et noire. Elle se trouve distribuer au niveau des côtes de l'Atlantique de Nord oriental, de l'Islande et de la mer du Nord, vers le sud jusqu'à la baie de Gorée au Sénégal (Whitehead, 1985). Très commune dans la méditerranée, ce qui fait que cette dernière est capturée tout le long de l'année vu son abondance. Elle se distribue dans le centre, l'ouest et l'est de l'Algérie (Figure 02) (Forest, 2001).

Cependant, il existerait deux sous espèces *Sardina pilchardus pilchardus* en Atlantique et *Sardina pilchardus sardina* en Méditerranée (Benomar, 2017). Ce poisson vit sur le plateau continental à une profondeur maximale de 180 m, de 35 à 55 m le jour et de 13 à 35 m la nuit. Toutefois, les sardines âgées vivent plus au large que les jeunes. Sa répartition et son abondance sont très influencées par les conditions hydro-climatiques, et notamment par la richesse du milieu en plancton. C'est un grégaire qui forme de vastes bancs et effectue de grandes migrations, qui sont probablement conditionnées par l'âge des individus, la disponibilité de la nourriture essentielle, la température et la reproduction (Whitehead, 1985 ; Benguendouz, 2018).



**Figure 02** : L'aire de répartition de la *Sardina Pilchardus* (Whitehead, 1985)

#### **I.1.4. Reproduction et croissance**

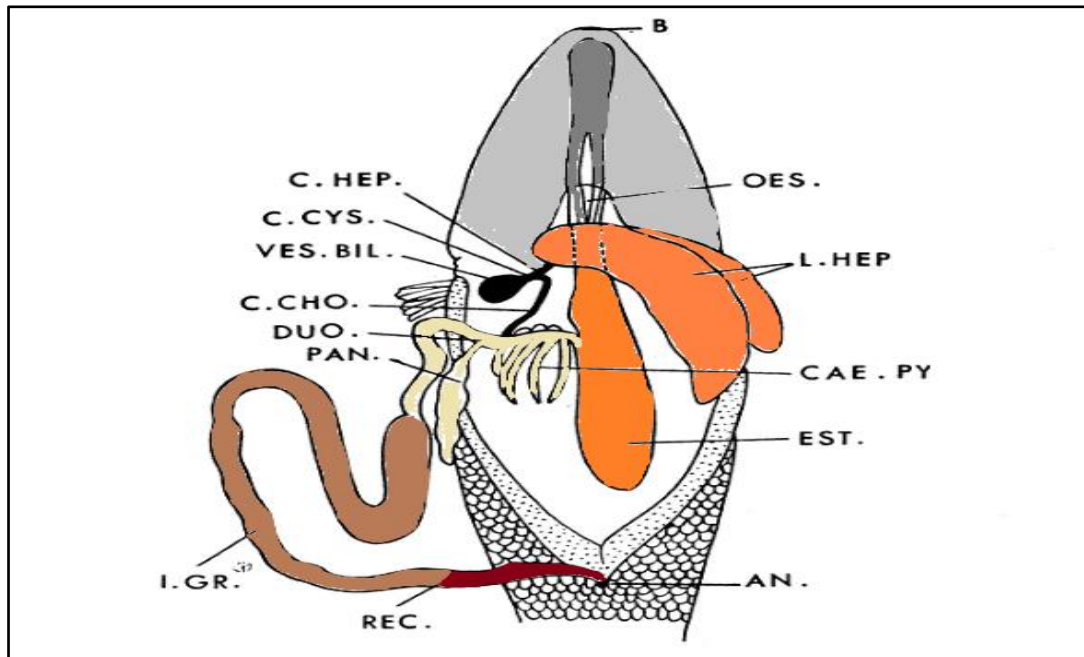
Les périodes de ponte de la sardine varient selon la répartition géographique. Entre le mois de Septembre et Juin, la sardine pond ces œufs principalement sur les côtes Atlantiques européennes et en Méditerranée, et d'octobre à Juin au niveau des côtes africaines (Bouhali *et al.*, 2015 ; Benguendouz, 2018). Sa ponte est fortement conditionnée par les facteurs environnementaux tels que la température et l'hydrodynamisme (Olivar *et al.*, 2001). La sardine est une espèce ovipare, sa reproduction se fait par fécondation externe. Elle possède une forte fécondité, chaque femelle peut libérer de 5 300 à 38 500 œufs pélagiques (Boukhari, 2015 ; Bouhali, 2016).

La croissance de la sardine ne se fait pas de façon régulière tout au long de l'année ; rapide au printemps, elle est ralentie ou même interrompue au cours de l'hiver. Elle présente un cycle de vie qui se caractérise essentiellement par une croissance rapide, une durée de vie courte (en raison de la pêche excessive), une taille petite qui peut atteindre 27 cm dont 90% est atteinte durant la première année de son cycle, une maturation rapide associée à une grande fécondité. La sardine atteint sa maturité sexuelle à 14,8 cm de longueur totale durant les deux premières années de sa vie (Jemaa, 2014).

#### **I.1.5 Nutrition et digestion**

La structure de l'appareil digestif n'est pas la même chez le poisson et chez les autres vertébrés. En outre des variations importantes peuvent être constatées d'une espèce à l'autre (Boury, 1960). L'appareil digestif de *sardina pilchardus* se compose de mâchoires qui sont subgales, dont les dents tapissent l'ensemble de la cavité buccale disposée en table de

broyage, pharynx, foie, œsophage, estomac, coecum pylorique et les intestins (**Figure 03**) (**Bouhali, 2016**).



**Figure 03** : Schéma théorique du système digestif de la sardine *sardina pilchardus*

**B** : La bouche ; **OES** : L'œsophage ; **EST** : Estomac ; **L. HEP** : Lobe hépatique (Foie) ; **C. CYC** : Canal cystique ; **VIS. BIL** : Vésicule biliaire ; **C. CHO** : Canal cholédoque ; **CAE. PYL** : Caecums pyloriques ; **DUO** : Doudénum ; **PAN** : Pancréas (n'a pas toujours l'aspect compact et se trouve souvent à l'état diffus) ; **I. GR** : Intestin grêle ; **REC** : Rectum ; **AN** : Anus (**Creac'h, 1963**).

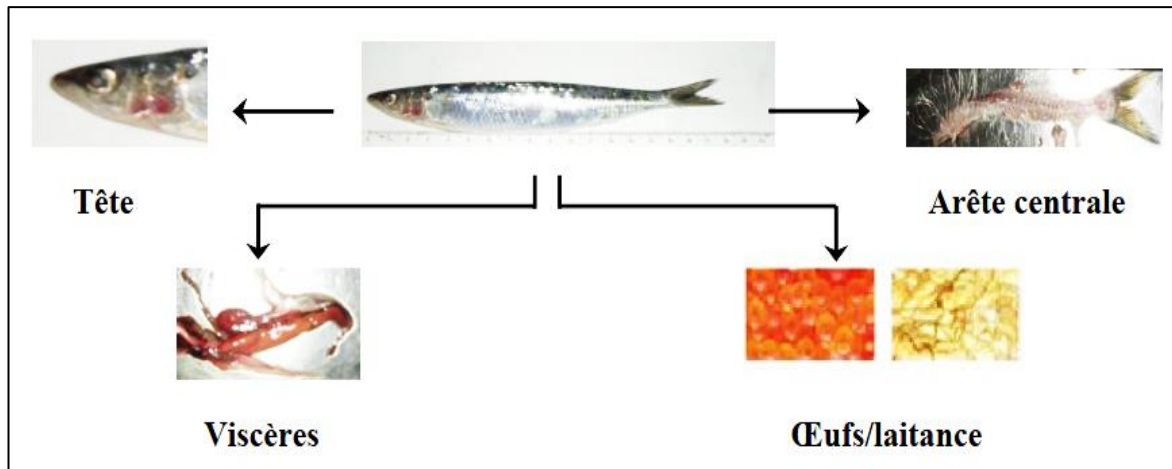
C'est une espèce planctophage. Les jeunes se nourrissent de phytoplancton ainsi que d'œufs et de larves de petits crustacés comme les copépodes, des larves de mollusques, et d'alevins de poisson (**Boukhari, 2015** ; **Whitehead, 1985**). Les adultes consomment surtout des crustacés planctoniques (copépodes), mais également différentes larves présentes dans le zooplancton (**Rasoanarivo et al., 1991**).

La sardine utilise deux modes de nutrition ; le "particulate-feeding" qui est une prise de nourriture volontaire par la bouche, et un "filter-feeding" qui représente la filtration de petites particules grâce aux branchies. La filtration est utilisée pour les petites proies inférieures à 724  $\mu\text{m}$ , tandis que le mode particulaire est utilisé pour les proies supérieures à 780  $\mu\text{m}$  (**Garrido et al., 2007**).

## I.2. Valorisation des coproduits de poisson

Les coproduits de poisson sont définis comme les parties non utilisées et récupérables lors des opérations traditionnelles de transformation du poisson pour la consommation humaine (**Boukhari, 2015**), ces coproduits marins représentent entre 30% et 60% du poisson incluant : les têtes, les viscères, le foie, la peau, les écailles, les arêtes centrales, les queues, les nageoires ainsi que les chutes de filetage. Selon les périodes de pêche, les éléments

reproducteurs tels que les œufs ou la laitance peuvent figurer parmi ces produits (**Figure 04**) (**Oulhiz, 2019**).



**Figure 04** : Principaux coproduits de poisson (**Boukhari, 2015**)

Cependant ces coproduits renferment plusieurs molécules potentiellement valorisables notamment des protéines et des acides aminés essentiels, des acides gras polyinsaturés, des vitamines, des enzymes (**Oulhiz, 2019**), ainsi que d'autres composés bioactifs bénéfiques pour la santé humaine et animale (**Zamora et al., 2018**). Ils peuvent après transformation, trouver des débouchés plus valorisants en alimentation animale ou humaine, la diététique, la nutraceutique, la pharmaceutique, le cosmétique et d'autres applications.

En Algérie, la valorisation des coproduits de la mer est pour le moment peu exploitée, ne font objet d'aucun traitement spécifique et sont directement rejetés dans la nature (**Oulhiz, 2019**). Ces déchets engendrent des problèmes sur les plans transport et pollution de l'environnement. (**Lourhzal et al., 2003**).

Aujourd'hui, il existe une demande croissante pour les enzymes protéolytiques du poisson, ses déchets sont des sources importantes d'enzymes protéolytiques et de protéines. Toutefois, les viscères constituent l'un de ces coproduits les plus importants de l'industrie de poisson qui sont connus pour être une riche source d'enzymes digestives, en particulier les enzymes protéolytiques (**Bougatf et al., 2008 ; Sylla, 2011**).

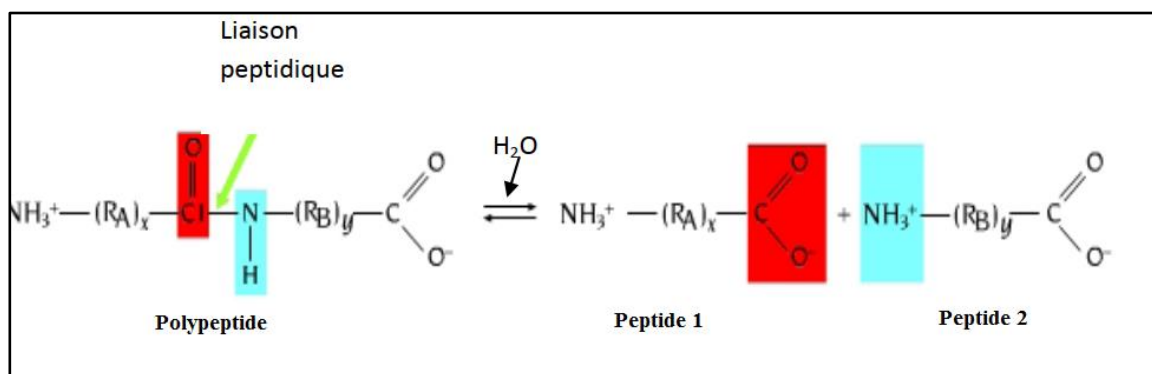
***Chapitre II :***  
***Les protéases de Poisson***

## CHAPITRE II : Les protéases de poisson

### II.1. Généralités sur les protéases

#### II.1.1. Définition et fonctions des protéases

Les protéases sont des enzymes hydrolytiques qui catalysent les réactions d'hydrolyse de liaisons peptidiques au sein des protéines (Kirti Rani *et al.*, 2012 ; Ferrall-Fairbanks *et al.*, 2020) engendrant des fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les peptides, et les acides aminés: on parle de coupure protéolytique ou de protéolyse (Figure 05) (Balti, 2011 ; Bose *et al.*, 2019).



**Figure 05** : Image schématisant la coupure protéolytique (Talantikite, 2015)

Ces enzymes peuvent être hautement spécifiques en hydrolysant une unique liaison peptidique d'une protéine donnée, ou bien elles hydrolysent plusieurs liaisons peptidiques d'une séquence déterminée (Talantikite, 2015). Elles constituent un groupe d'enzymes très vaste et complexe, qui diffèrent par des propriétés telles que la spécificité du substrat, le site actif et le mécanisme catalytique, l'optimum de pH et de température et le profil de stabilité (Sumantha *et al.*, 2006). Certaines d'entre elles sont produites sous forme de précurseurs inactifs, appelés zymogènes, généralement activés par une protéolyse qui libèrent l'enzyme fonctionnelle et déclenche ainsi l'activité (Lopez Oten, 2008).

Les protéases sont présentes chez tous les êtres vivants et jouent un rôle important dans plusieurs processus physiologiques, en catalysant diverses réactions métaboliques (Sumantha *et al.*, 2006). Les progrès des techniques analytiques ont démontré que les protéases induisent des modifications hautement spécifiques et sélectives des protéines : comme l'activation de la forme zymogénique des enzymes par protéolyse (Lopez Oten, 2008), la lyse des caillots des fibrines et la coagulation du sang, la digestion des aliments, le remodelage de tissu au cours du développement de l'organisme et la cicatrisation, ainsi que la transformation et le transport des protéines sécrétoires à travers les membranes biologiques (Rao *et al.*, 1998 ; Rughnath et Shamkant, 2010).

En revanche, ce type d'enzyme participe dans divers types de conditions physiopathologiques telles que le cancer, l'inflammation, les troubles cardiovasculaires et digestifs (Beynon, 1984).

Leur importance réside dans le fait qu'elles régissent non seulement les réactions protéolytiques, telle que la taille, la forme, la rotation et la composition des protéines fondamentales par le clivage très spécifique des substrats, mais aussi les différentes cascades enzymatiques, qui aboutissent finalement à toutes les réactions métaboliques impliquant la dégradation des graisses, des hydrates de carbone, etc (**Sumantha et al., 2006 ; Gurumallesh et al., 2019**).

Elles représentent la seule classe des enzymes qui occupe une place essentielle dans les différentes applications industrielles, biotechnologique, médicinale et dans les domaines de recherche (**Sandhya et al., 2004**). Elles ont été utilisées pour la première fois dans l'industrie alimentaire comme des agents de coagulation pour la production de fromage (**Sumantha et al., 2006**).

### II.1.2. Classification

D'après "The Enzyme Commission of Classification", les protéases appartiennent au groupe 3 (hydrolases), et au sous-groupe 4 (qui hydrolyse les liaisons peptidiques) (**Garcia-Careno et al., 1997 ; Wilkesman et Kurz, 2009**).

Auparavant, la classification a été basée essentiellement sur la source et la localisation d'enzyme, l'action de catalyse, le poids moléculaire et la spécificité de substrat ou de la charge ainsi que le pH d'activité (**Hartley, 2012**). Cependant, un système plus rationnel s'utilise actuellement, basé sur la comparaison des sites actifs, les mécanismes d'action et sur la structure tridimensionnelle (**Kumar et al., 2008**).

Les protéases peuvent être classées en deux grandes catégories : les protéases extracellulaires qui catalysent l'hydrolyse des protéines en petits peptides facilement assimilables par les cellules et les protéases intracellulaires qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des processus cellulaires et métaboliques (**Balti, 2011 ; Gurumallesh et al., 2019**). Elles sont aussi classées selon la gamme du pH dans laquelle leur activité est optimale, en protéases acides, neutres et alcalines (**Rughunath et shamkant, 2010**).

Par ailleurs la classification la plus courante se base essentiellement sur leur site d'action où on trouve deux groupes majeurs ; les exopeptidases ou peptidases et les endopeptidases ou protéinases (**Kumar et al., 2008**).

#### II.1.2.1. Les exopeptidases

Les exopeptidases agissent seulement sur les liaisons peptidiques près des extrémités de la chaîne peptidique. En se basant sur la nature de l'extrémité N ou C terminale, elles sont classées en amino et carboxypeptidases, respectivement (**Wilkesman et Kurz, 2009 ; Gurumallesh et al., 2019**).

### II.1.2.2. Les endopeptidases

Les endopeptidases sont caractérisées par leur action spécifique à l'intérieur de la chaîne peptidique (Bougatef, 2013), et ne peuvent pas décomposer les peptides en monomères, c'est-à-dire en acides aminés (Gurumallesh *et al.*, 2019). La classification des ces protéases est représentée dans le **Tableau 03**.

**Tableau 03** : Classification des protéases (Rao *et al.*, 1998)

Protéases	Mode d'action	EC N°
<b>Exopeptidases</b>		
Amino-peptidases		3.4.11
Dipeptyl peptidases		3.4.14
Tripeptyl peptidase		3.4.14
<b>Carboxypeptidases</b>		
Protéase de type sérine		3..4.16-3.4.18
Métallo-protéase		3.4.16
Protéases de type cystéine		3.4.17
Dipeptidase		3.4.18
		3.4.15
		3.4.13
<b>Omega peptidases</b>		
		3.4.19
		3.4.19
<b>Endopeptidases</b>		
		3.4.21-3.4.34
<b>Protéase à sérine</b>		3.4.21
<b>Protéases à cystéine</b>		3.4.22
<b>Protéase à acide aspartique</b>		3.4.23
<b>Métallo-protéase</b>		3.4.24
<b>Protéases à mécanisme catalytique inconnu</b>		3.4.99

● : Ces cercles représentent les acides aminés terminaux ;

○ : Ces cercles représentent les résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique ;

\* : Les étoiles représentent les terminus bloqués ;

↓ : Les flèches indiquent les sites d'action de l'enzyme.

La plupart des enzymes utilisées industriellement sont des endopeptidases (Rao *et al.*, 1998 ; Kumar *et al.*, 2008). Selon "The International Union of Biochemistry", les protéinases sont divisées en quatre familles en fonction du groupement fonctionnel au niveau du site actif et la sensibilité aux différents inhibiteurs (Sumantha *et al.*, 2006) ; les protéases à sérines, les protéases à cystéines, les protéases aspartiques, et les métalloprotéases (Kumar *et al.*, 2008 ; Hartley, 2012). Certaines des propriétés de ces protéinases sont représentées dans le **tableau 04**.

➤ **Les sérine-protéase (EC.3.4.21)**

Les protéases à sérine sont une sous-classe d'endopeptidases d'une grande importance au niveau industriel (**Kirti Rani et al., 2012 ; Talantikite., 2015**). Elles sont très répandues dans la nature, présentes chez les virus, les bactéries et les eucaryotes. Elles sont caractérisées par la présence de sérine résiduelle dans le site de liaison catalytique (**Gurumallesh et al., 2019**). Ce dernier agit comme un nucléophile qui attaque la liaison peptidique. Certaines d'entre elles dépendent du  $\text{Ca}^{++}$  pour leur stabilité (**Kirti Rani et al., 2012 ; Talantikite., 2015**). Si on examine en profondeur le mécanisme de la sérine-protéase, presque toutes conservent un concept de dyade de base dans lequel la Lys ou la His sont liés au Ser catalytique. D'autres sérine-protéases provoquent une catalyse par le biais de nouvelles triades de résidus, comme une paire de résidus de His combinée au Ser nucléophile (**Garcia-Careno et al., 1997**).

Selon **Wilkesman et Kurz (2009)**, les protéases à sérines sont divisées en trois groupes selon leur site d'attaque sur la protéine :

- Les protéases à sérine de type trypsine provoquent l'hydrolyse de la protéine après un résidu chargé positivement ;
- Les protéases à sérine de type chymotrypsine, hydrolysent les protéines après un résidu hydrophobe de haut poids moléculaire ;
- Les protéases à sérine de type élastase, coupent les protéines après un résidu hydrophobe de faible poids moléculaire.

**A. Les cystéines protéases (EC.3.4.22)**

Les protéases à cystéine (ou protéases à thiol), est un groupe d'enzymes caractérisé par la présence d'une dyade catalytique composée de cystéine et d'histidine au niveau du site actif (**Garcia-Careno et al., 1997 ; Wilkesman et Kurz, 2009**). En générale ces enzymes sont actives qu'en présence d'agents réducteurs tels que la cystéine et l'acide cyanhydrique (HCN). La majorité de ces protéases présente un pH optimum neutre et peu d'entre elles sont actives à pH acide (par exemple les protéases lysosomales) (**Rao et al., 1998**).

Les enzymes les plus représentatives sont la papaïne, l'actinidine, la bromélaïne de la tige, la ficine, les cathepsines B et H et les protéases activées par le calcium cytosolique (calpaïnes) (**Garcia-Careno et al., 1997 ; Wilkesman et Kurz, 2009**).

Ces protéases suscitent un intérêt croissant, notamment pour la modification des protéines alimentaires et la synthèse de peptides biologiquement actifs et de leurs analogues (**Barrett, 1994 ; Wilkesman et Kurz, 2009**).

### B. Les protéases aspartiques (EC.3.4.23)

Les protéases acides ou aspartiques (ou carboxyl-protéases) forment un groupe des endoprotéases caractérisées par une forte activité et une haute stabilité à des pH acides, c'est la base de l'appellation de ce groupe « protéases acides » (**Balti, 2011 ; Gurumallesh et al., 2019**). Le pH optimum acide est dû à la présence de deux résidus catalytiques aspartyls qui sont essentiels pour l'activité (**Rao et al., 1998 ; Roghunath et shamkant, 2010**). Les protéases acides sont regroupées en trois familles nommées : pepsine, rétropepsine et les enzymes de rétrovirus (**Garcia-Careno et al., 1997 ; Wilkesman et Kurz, 2009**). Selon l'activité notée des protéases de l'acide aspartique, le groupe fonctionnel de l'enzyme serait ciblé. Lors du ciblage, il n'y a pas d'attaque nucléophile et il n'y a pas non plus de formation de substance covalente qui aurait dû se produire entre l'enzyme et un fragment de substrat (**Sylla, 2011**).

Les protéases aspartiques sont généralement inhibées par la pepstatine. Elles sont également sensibles aux composés de type diazocétone tels que l'ester méthylique de diazoacetyl-DL-norleucine (DAN) et le 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy) propane (EPNP) en présence d'ions cuivre. (**Rao et al., 1998 ; Roghunath et shamkant, 2010**). Ces protéases présentent un grand intérêt industriel dans les secteurs où l'hydrolyse des protéases à faible pH est désirée (**Sumantha et al., 2006**).

### C. Les métallo-protéases (EC.3.4.24)

Les métallo-protéases forment un groupe d'enzyme très diversifié des types de protéases catalytiques (**Garcia-Careno et al., 1997**). Ce type de protéase est caractérisé par une activité catalytique exigeant la présence d'un ion métallique divalent au niveau de leur site actif, le plus souvent le  $Zn^{+2}$  (**Rao et al., 1998 ; Wilkesman et Kurz, 2009**). Le métal est un agent électrophile qui exacerbe la réactivité de l'eau avant son attaque nucléophile sur le carbonyle de la liaison peptidique à rompre (**Sylla, 2011**).

La stabilité thermique de ces protéases augmente considérablement en cas d'ajout des ions  $Ca^{+2}$  au milieu (**Talantikite, 2015**). En revanche, elle diminue lorsque des agents séquestrants sont ajoutés (**Barrett et Rawlings, 1995**). Ainsi, ces protéases sont inactivées en présence d'agents chélateurs forts (ex : EDTA), qui enlève le  $Zn^{+2}$  ; alors que l'enlèvement des ions  $Ca^{+2}$  affecte seulement sa thermo-stabilité (**Wilkesman et Kurz, 2009**). Elles comprennent des enzymes d'origine divers dont les plus importantes sont : les collagénases des organismes supérieurs, les toxines hémorragiques du venin de serpent et la thermolysine (**Sylla, 2011 ; Kirti Rani et al., 2012**).

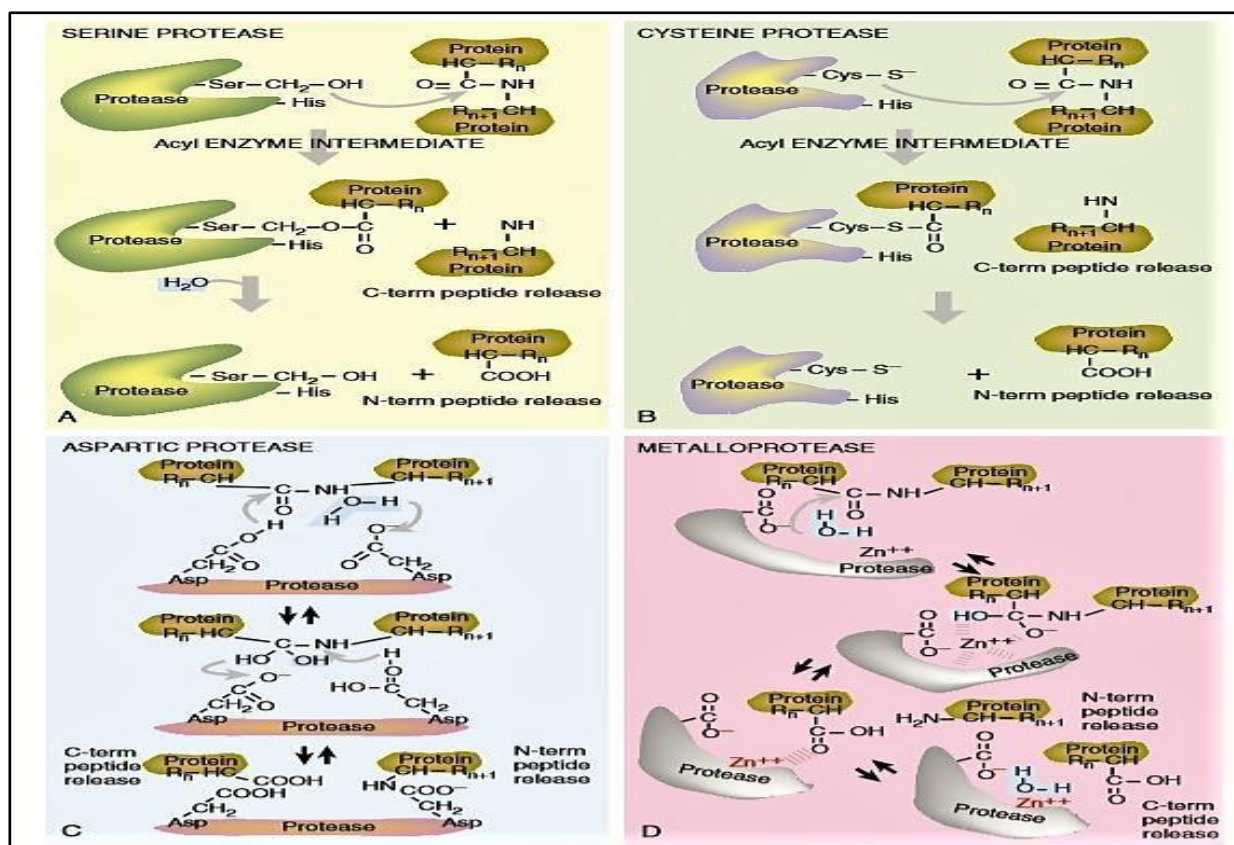


Figure 06 : Mécanismes catalytiques des endoprotéases (Clark, 2016)

Tableau 04 : Propriétés des endoprotéases (Rhugunath et Shamkant, 2010 ; Samantha et al., 2006)

Propriétés	Protéase à sérine	Protéase à cystéine	Protéase aspartique	Métalloprotéase
Nom ancien	Sérine	Thiol	Carboxyle	Métallo
Nomenclature	3.4.21	3.4.22	3.4.23	3.4.24
Composition du site actif	Sérine	Cystéine	Acide Aspartique	Zn <sup>++</sup>
Gamme de pH optimal d'activité	7-9	3-7	2-6	5-9
La température °C optimale d'activité	20-80	25-70	40-70	40-60
Masse moléculaire	20-135	20-65	30-60	20-60
Inhibiteur ( <i>in vitro</i> )	PMSF, DIFP	E-64, Iodoacétate	Pepstatine	EDTA
Inhibiteur ( <i>in vivo</i> )	A <sub>1</sub> , a <sub>2</sub> et a <sub>3</sub> protéinase	cystamines	Inconnu	TIMP-1, TIMP-2
Localisation	Intra et extracellulaire	Lysosomes	Lysosomes	Intra et extracellulaire
Exemple	Elastine, plasmine	Cathepsine B et L	Cathepsine D	Gélatinase

## II.2. Les protéases digestives du poisson

Diverses protéases digestives sont naturellement présentes dans les viscères de poissons (**Isaad, 2012**), elles sont localisées dans la muqueuse gastrique, le coecum pylorique, les tissus pancréatiques ainsi que dans la muqueuse intestinale. Le type et la quantité totale de ces protéases digestives dépendent essentiellement de l'espèce et de l'alimentation du poisson (**Boury, 1960**). Ces protéases constituent actuellement le groupe dominant des enzymes marines largement utilisées dans le domaine biotechnologique (**Bougatef, 2013**).

Ces enzymes peuvent offrir des propriétés liées à leur habitat (**Alarcon et al., 1997 ; Boury, 1960**), contrairement à celles d'origine bactérienne, végétales ou animales, couramment utilisées dans l'industrie, les protéases d'origine marine présentent de nombreux avantages. En effet, les enzymes marines se distinguent par leurs conditions optimales d'activité. Elles sont fonctionnelles dans des solutions à force ionique élevées (**Bougatef et al., 2010**), possèdent une forte activité catalytique à basse température avec une concentration relativement faible (**Kim, 2013**), une grande capacité d'hydrolyser les protéines natives, une large stabilité aux variations du pH. Elles présentent également l'avantage d'être thermosensibles (**Balti, 2011 ; El Hadj Ali et al., 2009**), en plus de la disponibilité croissante en matières premières viscérales en tant que source potentielle de ces protéases digestives à faible coût (**Klomklao et al., 2004 ; Okada et Morrissey, 2007**). Ces caractéristiques des protéases de poissons les ont rendu adaptées à différentes applications notamment dans de nombreuses opérations de transformations alimentaires (**El Hadj Ali et al., 2009**).

Généralement, les protéases digestives de poissons ont une activité optimale à une température beaucoup plus élevée que celle de l'habitat du poisson. Ceci peut être expliqué du fait que les températures internes du tractus digestif des poissons sont toujours plus élevées que la température ambiante de la mer (**Koury et al., 1971**). Bien qu'il n'y ait pas de grandes différences apparentes entre eux, les protéases digestives d'origine marine possèdent une forte activité dans une large gamme de pH et de température (**Bougatef et al., 2007 ; El Hadj Ali et al., 2009 ; Balti, 2011**).

Les protéases digestives les plus importantes des viscères de poisson sont les enzymes gastriques acides et les enzymes intestinales alcalines (**Shahidi et Kamil, 2001 ; Bougatef, 2013**). Cependant diverses études sur ces protéases ont montré des activités importantes et stables à des valeurs de pH allant de 2,0 à 4,0 dans l'estomac (pepsine), et de 8,0 à 10,0 dans l'intestin (trypsine) (**Chong et al., 2002 ; Hidalgo et al., 1999**).

Par ailleurs ces protéases peuvent être récupérées à partir de viscères entières pour les espèces de petite taille comme les sardines. En revanche chez les espèces de taille assez importante, les intestins et l'estomac peuvent être séparées (**Balti, 2011**).

## II.2.1. Classification des protéases digestives du poisson

### II.2.1.1. Les protéases gastriques

Les enzymes protéolytiques présentes dans l'estomac des poissons sont des protéases acides (**Balti, 2011**). Dans le système EC, toutes les protéinases acides/aspartyl provenant d'animaux marins ont les trois premiers chiffres en commun, comme EC 3.4.23 (**Kim, 2013**). Les trois protéinases aspartyl communes qui ont été isolées et caractérisées dans l'estomac des animaux marins sont la pepsine, la chymosine et la gastricsine (**Klomklao, 2008**).

Les protéases gastriques n'ont pas été détectées chez les poissons sans estomac et les invertébrés aquatiques. Ces poissons sans estomac peuvent contenir une enzyme homologue, la cathepsine D (**Shahidi et Kamil, 2001 ; Kim, 2013**) (Des exemples sur les protéases gastriques de quelques espèces de poisson : Voir l'annexe I).

#### A. La pepsine

La pepsine (EC.3.4.23.1), présente chez les vertébrés et chez de nombreuses espèces marines, elle est l'une des principales protéases présentes dans les viscères des poissons, elle se présente comme la protéase gastrique majoritaire (**Klomklao et al., 2007 ; Balti, 2011**). C'est une enzyme à fonction extracellulaire (**Klomklao, 2008**), Elle possède une spécificité préférentielle aux acides aminés aromatiques (Phénylalanine, tyrosine et Tryptophane) et une faible activité sur les peptides à courte chaîne (**Zhao et al., 2011**).

La pepsine est composée d'une seule chaîne polypeptidique de 321 acides aminés avec un poids moléculaire de 35 kDa (**Simpson, 2000**). Cependant, les pepsines provenant d'animaux marins ont un poids moléculaire allant de 27 à 42 kDa (**Klomklao, 2008 ; Acevedo Gomez et al., 2018**).

La pepsine est sécrétée sous forme de zymogène (Pepsinogène), est activée par l'acide de l'estomac en une forme active (**Klomklao, 2008 ; Sholeh et al., 2020**). Son activité est très dépendante des valeurs du pH, des températures et du type de substrat, comme toute autre protéase aspartique, elle est caractérisée par une activité considérable sur l'hémoglobine (**Balti, 2011 ; Zhao et al., 2011**).

La pepsine possède une activité coagulante satisfaisante. En revanche **Klomklao (2008)**, a démontré que les pepsines de poisson hydrolysent l'hémoglobine beaucoup plus rapidement que la caséine. A cet effet, ce dernier est le substrat le plus fréquemment utilisé pour la détermination de son activité, probablement en raison de sa meilleure solubilisation dans le milieu réactionnel acide (**Jardillier et al., 1972 ; De Vecchi et Coppes, 1996 ; Klomklao et al., 2004**).

La pepsine de l'estomac de poisson est particulièrement active pour un pH compris entre 2 et 3; son action est déjà sensible à pH 1 mais son activité devient très faible au-dessus de pH 4 (**Boury, 1960 ; Klomklao, 2008**).

## B. La chymosine

La chymosine (EC.3.4.23.4), communément appelée "rénine", est une protéase acide présentant certaines caractéristiques particulières, telles qu'une activité et une stabilité autour de pH 7,0 pour la protéolyse, avec une étroite spécificité de substrat qui la différencie des autres protéases acides telles que la pepsine. La chymosine possède certaines propriétés qui la différencient de la pepsine parmi lesquelles ; un pouvoir élevé de coagulation du lait, un pH optimal entre 2,2-3,5 pour l'hydrolyse de l'hémoglobine comme substrat, une faible activité sur le N- acétyl-L- Phénylalaninyl-3,5- diiodo-1- tyrosine (APD), l'incapacité à inactiver la ribonucléase et une sensibilité élevée à l'inactivation par l'urée. La forme zymogène possède une masse moléculaire de l'ordre de 33,8 KDa (**Vega-Villasante *et al.*, 1995 ; Shahidi et Kamil, 2001 ; Klomklao, 2008 ; Balti, 2011**).

## C. La gastricsine

La gastricsine (EC.3.4.23.3) est une protéase aspartique qui a été identifiée dans les organismes marins, ayant des propriétés enzymatiques et biochimiques semblables à celles de la pepsine. Toutefois, elle diffère de la pepsine par sa structure et certaines propriétés catalytiques (**D-Vecchi et Coppes, 1996 ; Shahidi et Kamil, 2001 ; Balti, 2011**).

Deux isozymes de la gastricsine ont été purifiées et caractérisées à partir des sucs gastriques du merlan. Le pH optimal pour l'hydrolyse de l'hémoglobine par ces gastricsines de merlan était de 3,0, ce qui était similaire à celui des gastricsines de mammifères. Elles étaient stables jusqu'à un pH 10 mais rapidement inactivées à des valeurs de pH plus élevées. Cette dernière propriété semblerait distinguer les gastricsines des pepsines (**Simpson, 2000 ; Klomklao, 2008 ; Kim, 2013**).

## D. La cathepsine D

La cathepsine D (EC.3.4.23.5) est une endopeptidase aspartique qui possède une activité pepsine-like mais elle diffère des pepsines par sa haute activité sur les peptides à longue chaîne. La cathepsine D possède un poids moléculaire de 40 KDa et son pH optimal est de l'ordre de 3,5. Sa température optimale est de 40°C mais elle perd son activité initiale à 50°C. Les inhibiteurs comme la leupeptine et l'EDTA présentent un effet minime sur l'activité de la cathepsine D alors que la pepstatine A l'inhibe d'une manière irréversible. Cette protéase hydrolyse les protéines comme l'hémoglobine et les protéines sarcoplasmiques, mais elle a très peu d'effet sur le collagène. A des pH acides (pH < 6), cette enzyme est capable de dégrader l'actine et la chaîne lourde de la myosine (**Wang *et al.*, 2007 ; Balti, 2011 ; Sylla, 2011**). Des exemples de certaines protéases digestives de quelques espèces de poissons et leurs caractéristiques sont représentées dans le **tableau 5**.

**Tableau 05** : La température optimale, le pH optimal et la masse moléculaire de certaines protéases gastriques du poisson

Enzyme	Espèce	PM (KDa)	pH	T (C°)	Références
Pepsine	Sábalo <i>Prochilodus lineatus</i>	45	2	45	(Acevedo Gomez et al., 2018)
	Thon <i>(Thunnus alalunga)</i>	32,7	2,0	50	(Nalimanon et al., 2010)
	Emissole lisse ( <i>Mustelus mustelus</i> )	35	2,0	40	(Bougatef et al., 2008)
	Parone ( <i>Parona signata</i> )	-	3,5	37	(Pavlisko et al., 1997)
Chymosine	Carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> )	-	2,0	-	(Cohen et Gertler, 1981)
Gastricsine	Merlan ( <i>Merluccius gayi</i> )	-	3,0	-	(Sanchez-Chiang et Ponce, 1981)
	Morue Atlantique ( <i>Gadus morhua</i> )	34	-	-	(Amiza et Owusu., 2002)
Cathepsine D	Morue Atlantique ( <i>Gadus morhua. L</i> )	40,0	3,0	-	(Wang et al., 2007)

### II.2.1.2. Les protéases intestinales et hépatopancréatiques

Ces protéases sont sécrétées par le caecum pylorique ou par le pancréas et présentent dans les intestins. Elles sont principalement représentées par : la trypsine et la chymotrypsine. Toutefois, d'autres enzymes telles que les collagénases, les élastases et les carboxypeptidases ont été découvertes dans les viscères intestinaux des poissons. Une étude des enzymes protéolytiques dans le tube digestif de diverses espèces de poissons a révélé que les sérines protéases distribuées dans l'intestin des poissons possèdent des activités nettement supérieures à des pH alcalins plutôt que neutres. De plus, plusieurs études ont montré que les protéases à sérine de poissons sont généralement similaires à celles des vertébrés du point de vue masse moléculaire, composition en acides aminés et la sensibilité vis-à-vis des inhibiteurs (Simpson, 2000 ; Shahidi et Kamil, 2001 ; Balti, 2011 ; Sylla, 2011 ; Kim, 2013) (Exemples de certaines protéases intestinales et hépatopancréatiques de quelques espèces de poisson : Voir l'annexe I).

#### A. La trypsine et la chymotrypsine

Ce type de protéases pancréatiques est présent chez diverses espèces de poissons, notamment chez les sardines (Gaillard, 2003). Elles sont actives en milieu alcalin. Chez les vertébrés supérieurs, ces enzymes sont sécrétés sous forme de zymogènes inactifs (Sylla, 2011). Le trypsinogène est activé en trypsine par autocatalyse ou par une protéase produite

par la muqueuse intestinale, l'entérokinase (Kim, 2013). La trypsine active le chymotrypsinogène en le transformant en chymotrypsine (Balti, 2011).

#### ➤ La trypsine

La trypsine (EC.3.4.21.4) possède une spécificité très étroite sur les liaisons peptidiques du coté carboxyle des résidus d'arginine et de lysine (Klamkloa *et al.*, 2006). Elle joue un rôle majeur dans les processus biologiques, notamment la digestion, l'activation des zymogènes de la chymotrypsine et d'autres enzymes (Cao *et al.*, 2000). En revanche elle peut inactiver des enzymes telles que la polyphénol oxydase (PPO) (Kim, 2013).

Les trypsines des animaux marins ressemblent aux trypsines des mammifères en ce qui concerne leur taille moléculaire (22-30 KDa) (Sylla, 2011), leur composition en acides aminés et leur sensibilité aux inhibiteurs de sérines-protéinase (Balti *et al.*, 2009). Leur pH optimal pour l'hydrolyse de divers substrats se situe entre 7,5 et 10,0, tandis que leurs températures optimales sont comprises entre 35 et 65°C (De Vecchi et Coppes, 1996 ; Klamkloa, 2008). Par contre, elles sont instables à pH acide et elles ne sont pas activées ou stabilisées par les ions calcium, contrairement aux trypsines pancréatiques des mammifères (Kishimura et Hayashi, 2002).

#### ➤ La chymotrypsine

La chymotrypsine (EC.3.4.21.1) possède une spécificité beaucoup plus large que la trypsine. Elle clive des liaisons peptidiques impliquant des acides aminés ayant des chaînes latérales volumineuses et des acides aminés non polaires tels que la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane et la leucine (Vega-Villasante *et al.*, 1995 ; Kishimura et Hayashi, 2002). En général, cette enzyme est une molécule composée d'une seule chaîne polypeptidique dont le poids moléculaire est compris entre 25 et 28 KDa (Simpson, 2000). Elle est plus active dans la gamme de pH de 7,5 à 8,5 et est plus stable à un pH d'environ 9,0. Sa température optimale est comprise entre 45 et 55°C (Klamkloa, 2008 ; Bougatef *et al.*, 2010). Les chymotrypsines de poisson ont une vitesse de réaction plus élevée et hydrolysent plus de liaisons peptidiques dans divers substrats protéiques (caséine, collagène et albumine de sérum bovin) que leur homologue de mammifère provenant du pancréas de bœuf (Kishimura *et al.*, 2008).

### B. La collagénase

La collagénase (EC.3.4.24.7) est une protéase à sérine qui hydrolyse les molécules de topocollagène triple de type I. II. III (Zefirova *et al.*, 1996 ; Balti, 2011). Sa fonction physiologique dans plusieurs organismes est due à son pouvoir digestif, elle diffère des collagénases musculaires qui appartiennent aux protéases des métalloenzymes à zinc en raison des différences existantes au niveau de leur site actif et présente à la fois des activités de type trypsine et chymotrypsine (Shahidi et Kamil, 2001 ; Kim, 2013).

Les collagénases d'origine marine possèdent des masses moléculaires comprises entre 24 et 36 KDa. Elles sont actives dans une gamme de pH de 6,5 à 8,0 et inactives à des pH < 6,0 (Balti, 2011 ; Sylla, 2011). Ce sont des protéases thermosensibles qui perdent leur activité à une température de 40°C. Ces enzymes ont des applications potentielles en tant

qu'attendrisseurs de viande dans la fabrication de viandes et de produits carnés de haute qualité (Shahidi et Kamil, 2001 ; Kim, 2013).

### C. L'élastase

L'élastase (EC.3.4.21.11) est une protéase produite initialement par le pancréas sous forme de précurseur inactif et est destinée à la digestion des protéines telles que l'élastine et la protéine fibrillaire soluble du tissu conjonctif (Balti, 2011). L'action protéolytique n'est cependant pas limitée à l'élastine native, car les élastases sont efficaces pour hydrolyser diverses protéines solubles. C'est une enzyme, ayant une spécificité pour les liaisons peptidiques où le clivage se produit au niveau des groupes carbonyles des acides aminés portant de petites chaînes latérales non polaires (Ageirsson et Bjarnason, 1993 ; Simpson, 2000).

Au niveau de l'intestin l'élastase s'active et fonctionne à un pH alcalin. Contrairement à l'élastase du porc, celle de poisson présente de faibles interactions au niveau du cœur hydrophobe, ce qui contribue à sa meilleure adaptation à des basses températures (Balti, 2011 ; Shahidi et Kamil, 2001 ; Kim, 2013). Des exemples de certaines protéases digestives de quelques espèces de poissons et leurs caractéristiques sont représentées dans le **tableau 6**.

**Tableau 06** : La température optimale, le pH optimal, la masse moléculaire et le substrat spécifique de certaines protéases intestinales du poisson

Enzyme	Espèces	PM KDa	T °C	pH	Substrat	Références
Trypsine	Bogue ( <i>Boops boops</i> )	23,0	55	9,0	BAPNA <sup>a</sup>	(Barkia <i>et al.</i> , 2010)
	Saumon royal ( <i>Oncorhynchus tshawysha</i> )	28,0	60	8,0	BAPNA <sup>a</sup>	(Kurtovic <i>et al.</i> , 2006)
	Sardine du pacifique ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> )	25,5	50	8,0	BAPNA <sup>a</sup>	(Castillo-yanez <i>et al.</i> , 2005)
Chymotrypsine	Marbré ( <i>Lithognathus mormyrus</i> )	27,0	55	11,0	SAAPF <sub>P</sub> na <sup>b</sup>	(Bougatef <i>et al.</i> , 2010).
	Sardine du pacifique ( <i>Sardinops sagax caerulea</i> )	26,0	50	8,0	SAAPF <sub>P</sub> na <sup>b</sup>	(Castillo-yanez <i>et al.</i> , 2006)
Collagénase	Morue de l'Atlantique ( <i>Gadus Morhua</i> )	24,0	45 55	8 9,5	SAAPF <sub>P</sub> na <sup>b</sup>	(Kristjansson <i>et al.</i> 1995)
	Maquereau ( <i>Scomber japonicus</i> )	14,8	55	7,5	Collagène de type I	(Park <i>et al.</i> , 2002)
	Poisson fichier ( <i>Novoden medestrus</i> )	27,0	55	7,0 8,0	Collagène de type I	(Kim <i>et al.</i> , 2001)
Elastase	Morue de l'Atlantique ( <i>Gadus Morhua</i> )	24,8	25	9,3	SAAApn <sup>c</sup>	(Asgeirsson et Bjarnason, 1993)
	Poisson chat ( <i>Solea Solea. L</i> )	19,5	37	7,5	Caséine	(Clarck <i>et al.</i> , 1985)

<sup>a</sup> N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginine-P-nitroanilide ;

<sup>b</sup> Succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-Phe-P- nitroanilide ;

<sup>c</sup> Succinyl-Ala-Ala-Ala-P- nitroanilide.

## II.2.2. Applications potentielles des protéases digestives du poisson

Environ 60 % des enzymes présentes sur le marché mondial sont des protéases (**Gurumallesh *et al.*, 2019**), dont elles constituent une classe importante d'enzymes à large potentiel d'applications industrielles. Le choix de la protéase est basé sur le coût, la spécificité vis-à-vis du substrat, les optima de pH et de température et la sensibilité aux inhibiteurs et aux activateurs (**Balti, 2011**).

Les enzymes digestives de poisson possèdent plusieurs propriétés uniques et intéressantes qui pourraient offrir divers avantages et les rendre mieux adaptées comme auxiliaires technologiques dans plusieurs applications par rapport aux enzymes d'autres sources (**Klomklao, 2008**). De plus, elles présentent une alternative avantageuse dans les pays où des raisons philosophiques ou religieuses interdisent l'utilisation d'enzyme provenant de certains animaux. (**Guérard, 1985**).

Ces enzymes sont d'excellents catalyseurs utilisés dans diverses bio-processus industrielles, principalement dans les domaines ; alimentaire, médical, pharmaceutique et autres (**Klomklao, 2008 ; Ducruet *et al.*, 2019**).

### II.2.2.1. Industrie Agroalimentaire

#### A. Fabrication du fromage

Une attention considérable a récemment été accordée à la recherche de divers substituts à la présure animale (sources bovine et porcine) (**Shahidi et Kamil, 2001**). Cependant, les protéases gastriques de poisson ont été considérées comme des substituts prometteurs de la présure en raisons économiques, efficacité, capacité à coaguler à basses températures et la stabilité à une gamme de pH un peu élevée (**Zhao *et al.*, 2011 ; Ducruet *et al.*, 2019**). De ce fait, la pepsine des viscères de poisson permet une coagulation efficace du lait grâce à son activité intéressante au plan de l'hydrolyse de caséine, notamment de la fraction Kappa à pH 5,5 - 6,4 (**Shahidi et Kamil, 2001**). Cette hydrolyse constitue la phase primaire de processus de coagulation du lait. Cependant la trypsine de poisson pourrait être utilisée comme auxiliaire dans la phase d'affinage et de maturation du fromage (**Guérard, 1985 ; Kim, 2013**).

#### B. Attendrissement de la viande après la rigidité cadavérique

Les collagénases de poisson se sont révélées d'être spécifiques pour la dégradation du collagène insoluble dans la viande, contrairement aux protéases végétales utilisées auparavant qui entraînent une hydrolyse excessive par leur dégradation à la fois du collagène et des

protéines myofibrillaires, aboutissant à un aspect pâteux et un ramollissement indésirable de la texture de la viande (Martin, 1994 ; Okada et Morissy, 2007). Ces collagénases fonctionnent à un pH relativement faible, s'inactivent après un traitement thermique doux et s'activent à basse température, ce qui permet de réaliser des économies d'énergie en les faisant fonctionner dans les conditions auxquelles les viandes sont conservées pendant l'entreposage, ce qui donne un attendrissement optimale offrant ainsi des viandes et des produits carnés de haute qualité (Okada et Morissy, 2007 ; Arvanitoyannis et Kassaveti, 2008).

### C. Suppression du gout oxydé du lait

L'oxydation du lait est un phénomène indésirable dans l'industrie laitière. Par ailleurs le traitement du lait à la trypsine de poisson améliore sa stabilité au rancissement oxydatif des lipides, probablement en raison d'une meilleure fixation du cuivre par la protéine du lait modifiée par l'enzyme (Shahidi et Kamil, 2001). De plus, il est avantageux d'utiliser la trypsine provenant de poissons adaptés à la température froide, en raison de son instabilité thermique, elle s'inactive par le processus de pasteurisation, par conséquent, l'enzyme résiduelle ne serait pas présente pour provoquer l'hydrolyse ultérieure des protéines du lait (Martin, 1994).

### D. Industrie de panification et des boissons

Les protéases de poisson sont largement utilisées dans l'industrie de panification, se concentrent principalement sur la dégradation du gluten de blé (protéine insoluble) (Gurumallesh *et al.*, 2019), ce qui réduit le temps de mélange et augmente le volume du pain (Kim, 2013 ; Sumantha *et al.*, 2006).

Ces enzymes peuvent aussi être utilisées en œnologie toutefois sont confrontées aux conditions physico-chimiques du jus de raisin (Ducruet *et al.*, 2019).

### E. Transformation de poisson

L'utilisation des enzymes protéolytiques digestives de poissons fait partie de nombreux procédés de traitement des produits de la mer, tels que la préparation des hydrolysats, de sauce, ainsi que la purification et la production d'œufs de poisson (Caviar) (Balti, 2011 ; Sylla, 2011).

#### ➤ Préparation des hydrolysats de poisson

Diverses recherches sur les protéases digestives de poissons ont montré des taux de production d'hydrolysats comparables à celles des protéases microbiennes actuellement appliquées dans la préparation des hydrolysats. En effet, les protéases digestives de poissons ont des spécificités relativement étroites et uniques ce qui empêche la formation des peptides amers. Par conséquent, les protéases de poissons peuvent être de meilleurs candidats pour la production d'hydrolysats de protéines de poissons qui sont utilisées pour renforcer la valeur nutritive des aliments (Shahidi et Kamil, 2001 ; Sylla, 2011).

### ➤ Préparation de sauce de poisson

Les protéases digestives de poissons essentiellement la trypsine et la chymotrypsine sont utilisées avec succès comme auxiliaires de transformation des fruits de mer, notamment l'accélération de la fermentation de la sauce de poisson, par une augmentation considérable de l'hydrolyse protéique. La sauce par cette supplémentation enzymatique contenait significativement plus d'azote total, de protéines solubles et de teneur en acides aminés libres (Klomklao *et al.*, 2006 ; Klomklao, 2008).

### ➤ Purification et production d'œufs de poisson

L'utilisation des méthodes enzymatiques particulièrement les enzymes des viscères de poisson comme la pepsine, qui permet l'élimination des écheveaux en rompant les liens qui adhèrent les œufs, offre plusieurs avantages parmi eux une meilleure récupération des œufs avec moins de dommages, contrairement aux méthodes mécaniques (Shahidi et Kamil, 2001 ; Okada et Morissy, 2007).

#### II.2.2.2. Industrie pharmaceutique et recherche médicale

Les protéases de poisson sont utilisées pour la fabrication des produits spéciaux tels que les peptones pharmaceutiques appliquées pour la régulation de la digestion (Boury, 1960). Néanmoins ces protéases sont aussi séduisantes qu'elles puissent être utilisées comme médicament afin de traiter plusieurs maladies essentiellement infectieuses, inflammatoires et gastro-intestinales (Zhao *et al.*, 2011).

##### A. Médicaments à base de pepsine

Des capsules et des comprimés à base de pepsine de poisson, sont utilisées dans la régulation de la digestion, comme antiseptique dentaire et dans le traitement de maladies telles que la gastralgie, les vomissements obstinés, diarrhée infantile, aepsie et certains cancers (Zhao *et al.*, 2011).

##### B. Médicaments à base de la trypsine et la chymotrypsine

Des recherches actives ont également été menées sur les enzymes protéolytiques du poisson, essentiellement la trypsine et la chymotrypsine dérivées des viscères de la morue de l'Atlantique (Bjarnason, 2004). Ces recherches ont mis au point un nouveau produit appelé « Penzim », utilisé sous forme de gel et de lotion dans le traitement des affections cutanées, notamment le psoriasis et d'autres affections de la peau (l'eczéma, l'acné, les candidoses) (Jonsdottir *et al.*, 2004 ; Okada et Morissey, 2007).

D'autres médicaments à base de ces enzymes sont aussi utilisés pour traiter les douleurs, les inflammations aiguës ou chroniques y compris les maladies auto-immunes (la polyarthrite rhumatoïde), les ulcères, les hémorroïdes, les cicatrices cornéennes et l'accélération de la cicatrisation des plaies.

Ces enzymes sont utiles pour traiter et prévenir les infections virales telles que les poussées d'herpès, l'hépatite, la grippe et les infections à coronavirus, les infections fongiques,

bactériennes ou parasitaires (**Bjarnason, 2004**). De plus, ces principes actifs sont utilisés dans la thérapie de remplacement des enzymes pancréatiques ou la supplémentation en cas des maladies cœliaques et d'insuffisance pancréatique (**Bose et al., 2019**).

### II.2.2.3. Industrie des détergents

Les protéases de poisson présentent un grand intérêt dans l'industrie des détergents. La stabilité de leur activité à basse température leur offre la capacité à l'amélioration du pouvoir détergent en favorisant l'élimination des tâches protéiques, contrairement aux autres protéases et produits chimiques qui ne possèdent pas des propriétés équivalentes même à haute température (**Kim et al., 2002**).

### II.2.2.4. Autres applications

#### A. Extraction de collagène

Les enzymes protéolytiques de poissons sont efficaces pour l'extraction du collagène (**Rustad, 2003**). **Nalinanon et al. (2007)** ont étudié l'utilisation de la pepsine de poisson *vivaneau obèse* comme aide pour augmenter le rendement en collagène extrait de la peau du poisson. L'ajout de la pepsine a amélioré le rendement par rapport à l'extraction par une solubilisation acide (ASP) (**Nalinanon et al., 2007 ; Zhao et al., 2011**).

#### B. Déprotéinisation des déchets de crevettes

L'utilisation des protéinases alcalines des organes digestifs de poisson, en particulier de la trypsine dans l'extraction de caroténoprotéines des déchets de transformation de crevettes augmente le rendement de récupération (**Klomklao et al., 2005**).

**Klomklao et al. (2007)** ont récupéré des caroténoprotéines à partir de déchets de crevettes tigrées noires en utilisant la trypsine de caeca pyloriques de poisson bleu. Le produit obtenu contenait une teneur élevée en caroténoprotéines qui peuvent être utilisés comme compléments alimentaires en aquaculture ou comme colorant et arôme dans les produits alimentaires (**Shahidi et Kamil, 2001**).

Les enzymes protéolytiques endogènes de poisson peuvent être également utilisées pour l'enlèvement enzymatique de la peau de poisson (calmar), détachement des coquilles chez certains crustacés, également pour l'ensilage de poisson et la production d'essence de perle à partir des écailles de poisson. On peut envisager l'emploi de ces protéases dans la dégradation et la solubilisation de matières protéiques d'origine animale ou végétale (**Klamklao, 2008**).

## *Chapitre III :*

# *Méthodes d'étude des protéases digestives de la sardine*

## Chapitre III. Les méthodes d'étude des protéases digestives de la sardine

La sardine commune *Sardina pilchardus* est une espèce de poisson très largement consommée par les populations du bassin méditerranéen, particulièrement en Algérie. Le choix de cette espèce est justifié en raison de sa grande disponibilité et de son importance commerciale. C'est un produit de pêche le plus important car d'une part il se vend quotidiennement à la pêche et d'autre part il présente un coût relativement faible par rapport aux autres poissons. (Benomar, 2017 ; Benguendouz, 2018 ; Affan, 2019).



**Figure 07** : Photographie originale des échantillons de sardine pêchée dans la côte Algérienne (2020)

### III.1. Extraction des protéases digestives de la sardine *Sardina Pilchardus*

#### III.1.1. Préparation de l'échantillon

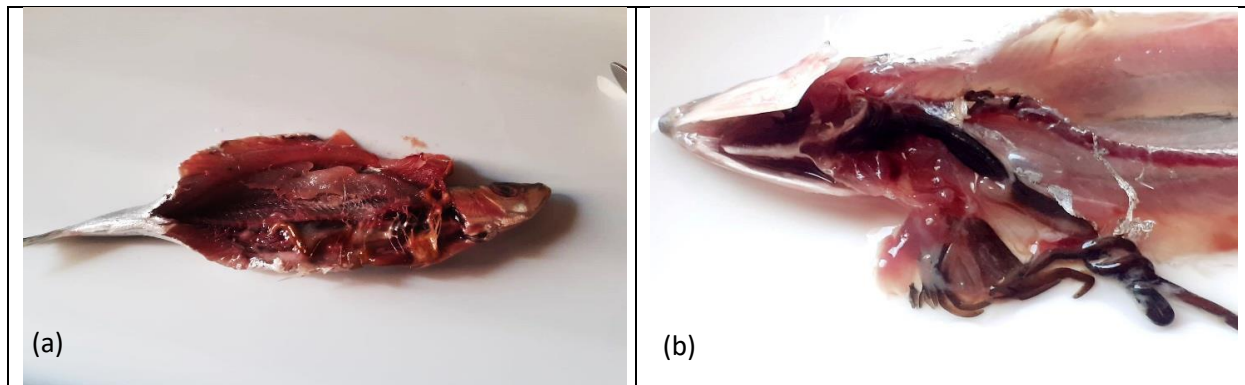
Pour étudier le potentiel des sous-produits marins des poissons, l'ensemble du système digestif de la sardine commune *Sardine Pilchardus* a été extrait dans le but de rechercher, identifier et caractériser les enzymes protéolytiques présentes (Namjou *et al.*, 2019).

Des sardines fraîches achetées ont été lavées deux fois à l'eau froide puis disséquées soigneusement et éviscérées (**Figure 08**). Le système digestif entièrement prélevé (estomac, caecum pylorique, intestin et foie) (**Figure 09**) a été nettoyé à l'eau distillée pour éliminer les tâches de sang et d'autres impuretés. Les organes sont pesés puis sont immédiatement utilisés, ou congelés et conservés dans des boîtes stériles en plastique scellées à  $-20 \pm 2$  °C jusqu'à leur utilisation pour l'extraction d'enzymes digestives, afin de minimiser leur autolyse (Bougatef *et al.*, 2007 ; Bougatef *et al.*, 2008 ; Ben Khaled *et al.*, 2010 ; Ben Khaled *et al.*, 2011).

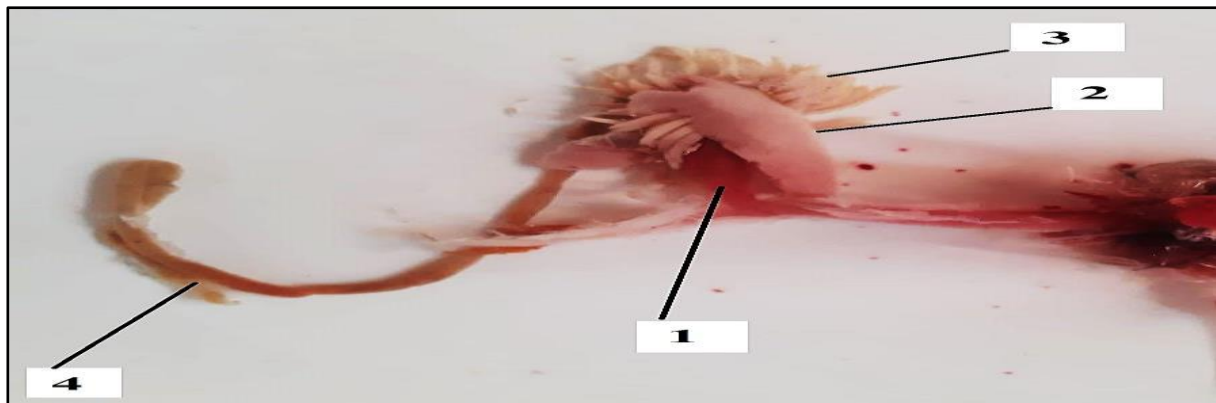
Selon Acevedo Gomez *et al.*, (2018) la durée maximale de la conservation de ces organes ne doit pas dépasser deux semaines.

En vue d'extraire une enzyme digestive précise, son organe de localisation est prélevé et conservé séparément des autres organes, comme c'est le cas de Bougatef *et al.* (2008) et

Nalinanon *et al.* (2010) qui ont séparé l'estomac de l'Emissole lisse *Mustelus mustelus* et celle du thon rouge *Katsuwonus pelamis* pour l'extraction de la pepsine.



**Figure 08** : Photographies originales représentant la dessiccation (a) et l'éviscération (b) de la sardine (2020)



**Figure 09** : Photographie originale des différentes parties du système digestif récupérées de la sardine après dessiccation et éviscération : 1. Estomac ; 2. Foie ; 3. Caecum pylorique ; 4. Intestin (2020)

### III.1.2. Obtention de l'extrait brut enzymatique

Le protocole utilisé pour la préparation de l'extrait brut enzymatique à partir du système digestif de la sardine comprend trois étapes principales :

#### A. La décongélation

Consiste à mettre les organes sous courant d'eau distillée (26-28°C) jusqu'à ce que la température au cœur atteigne 0 à 4° C selon Nasri *et al.*, (2015), Aissaoui *et al.*, (2017), ou de -2 à 0° C selon Bougatef *et al.*, (2008), Acevedo Gomez *et al.*, (2018).

#### B. L'homogénéisation

Dans cette étape les viscères décongelés ont été homogénéisés dans un tampon approprié avec différents rapports échantillon/ tampon (P/V) selon chaque auteur. Chong *et al.*, (2002), Nasri *et al.*, (2015), Aissaoui *et al.*, (2017) ont utilisé un rapport de 1/1. Tandis qu'un rapport de 1/2 a été utilisé par Bougatef *et al.*, (2007), Bougatef *et al.*, (2008).

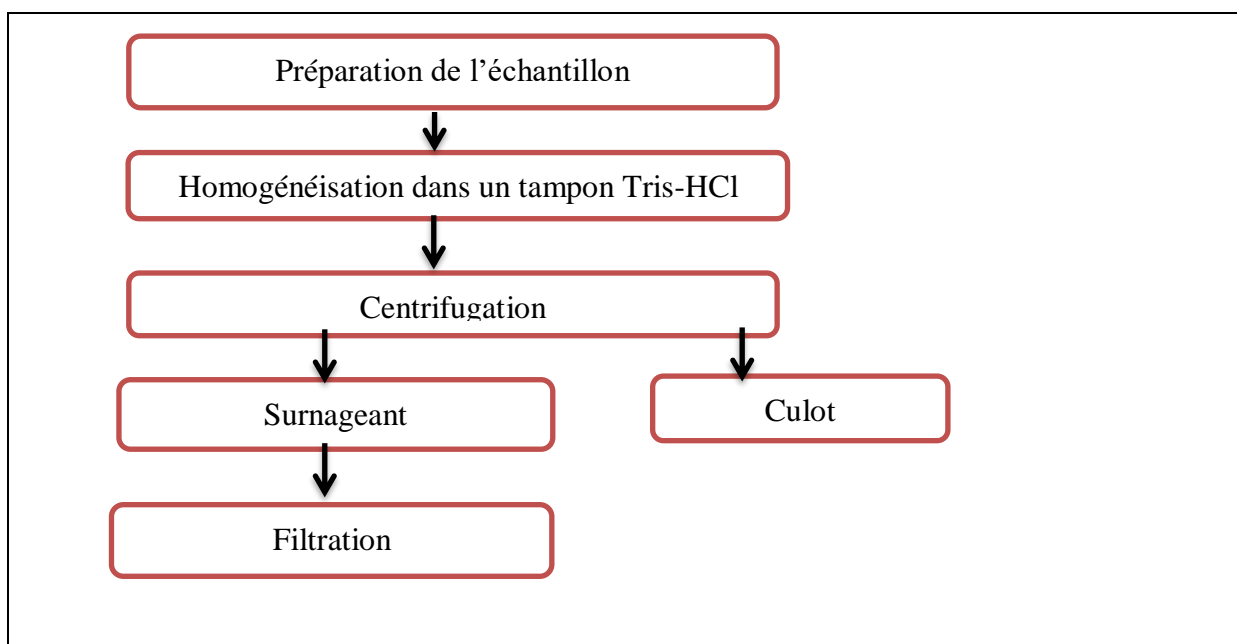
Narasimha Murthy *et al.*, (2017), Vega-Villasante *et al.*, (1995) ont utilisé un rapport 1/3 et 1/4 respectivement, à l'aide d'un homogénéisateur de tissu (Blinder, ultraturaux, broyeur de type potter...etc) pendant une durée allant de 30 s à 1 min, pour provoquer la lyse des cellules afin de libérer les protéases (Guérard, 1985 ; Alliot *et al.*, 1974 ; Taghizadeh Andevvari *et al.*, 2019).

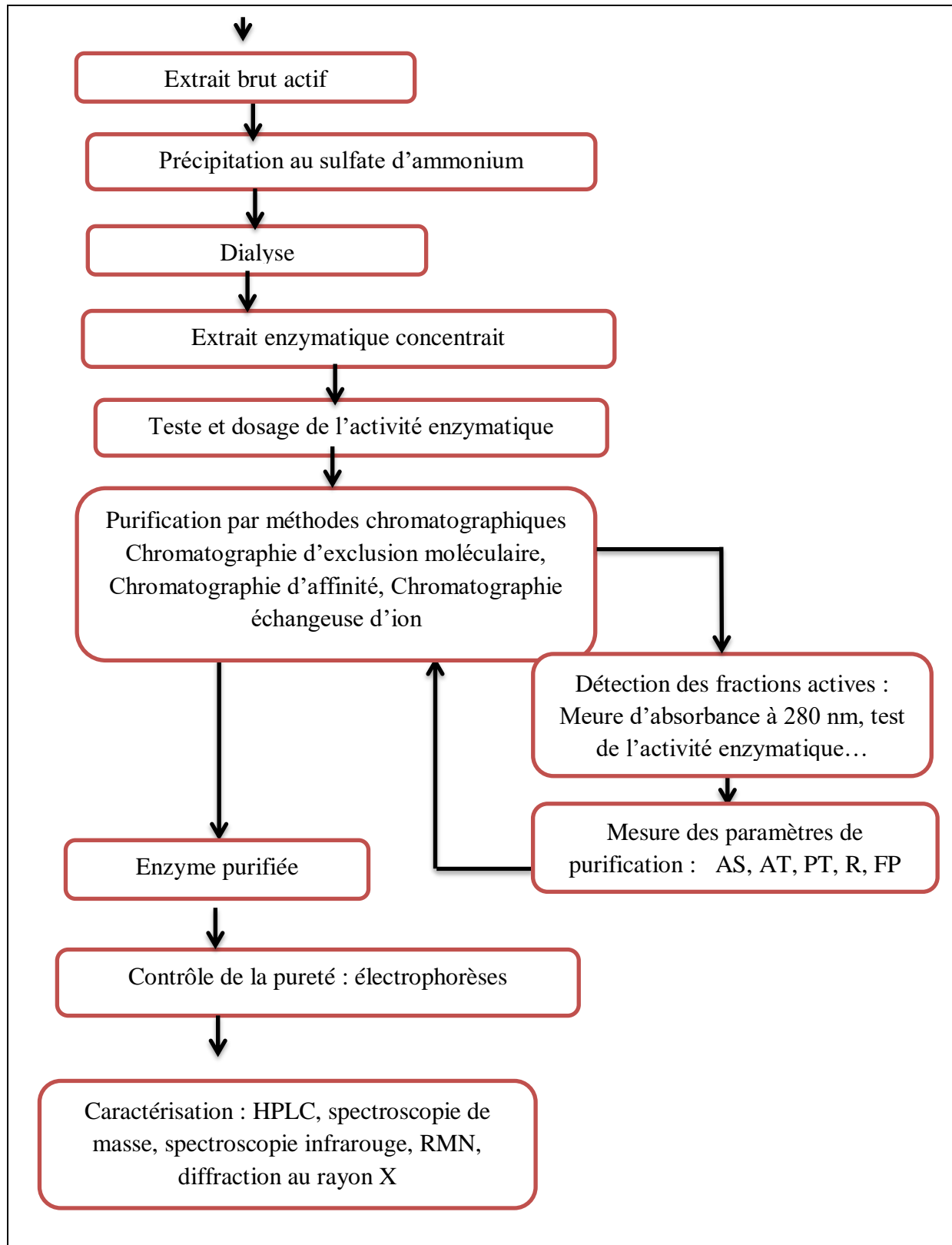
Plusieurs tampons ont été utilisés pour l'extraction des protéases digestives de poisson, néanmoins le plus utilisé est le Tris-HCl (pH 8,0) (Chong *et al.*, 2002 ; El Hadj Ali *et al.*, 2011 ; Bkhairia *et al.*, 2016).

La température joue un rôle important dans le recouvrement de l'enzyme brute, de se faire la procédure d'extraction doit être effectuée à basse température (0-4°C) afin de minimiser sa dénaturation. Le pH est aussi un paramètre essentiel qui doit être contrôlé dans cette étape entre une valeur de 7,0 et 8,0 pour toutes les protéases digestives (Khangembam *et al.*, 2012; Sholeh *et al.*, 2019 ; Ribeiro Cardoso Dos Santos *et al.*, 2020).

### C. La centrifugation

L'homogénat obtenu a été ensuite centrifugé à 6000 g selon (Beynon, 1984) pendant 60 min, 8000 g pendant 30 min selon (Kantaphant *et al.*, 2010), 8500 g pendant 30 min selon (El Hadj Ali *et al.*, 2011), 9 000 g pendant 30 min selon (Narasimha Murthy *et al.*, 2017), 10 000 g pendant 20 min selon (Celis-Guerrero *et al.*, 2004), 15 000 g pendant 30 s selon (Taghizadeh Andevvari *et al.*, 2019), en utilisant une centrifugeuse réfrigérée qui permet de garder la température à 4°C. Pour éliminer les débris de tissu, le culot est jeté et le surnageant recueilli a été filtrés sur le papier wattman N° 1 (Kantaphant *et al.*, 2010) ou sur le N° 3 (Anson, 1938). Le filtrat « Extrait brut actif » obtenu contenant les enzymes digestives solubilisées est soit utilisées immédiatement, ou maintenues à -20° C en aliquotes d'environ 1 ml jusqu'à leur utilisation dans les tests de dosage et les étapes de purification qui suivent. Avec une durée maximale de stockage ne dépassant pas 3 mois (Krogdahl *et al.*, 2015 ; Acevedo Gomez *et al.*, 2018).





**Figure 10:** Procédure d'extraction, de purification et de caractérisation des protéases digestives de la sardine

## III.2. Méthodes de dosage

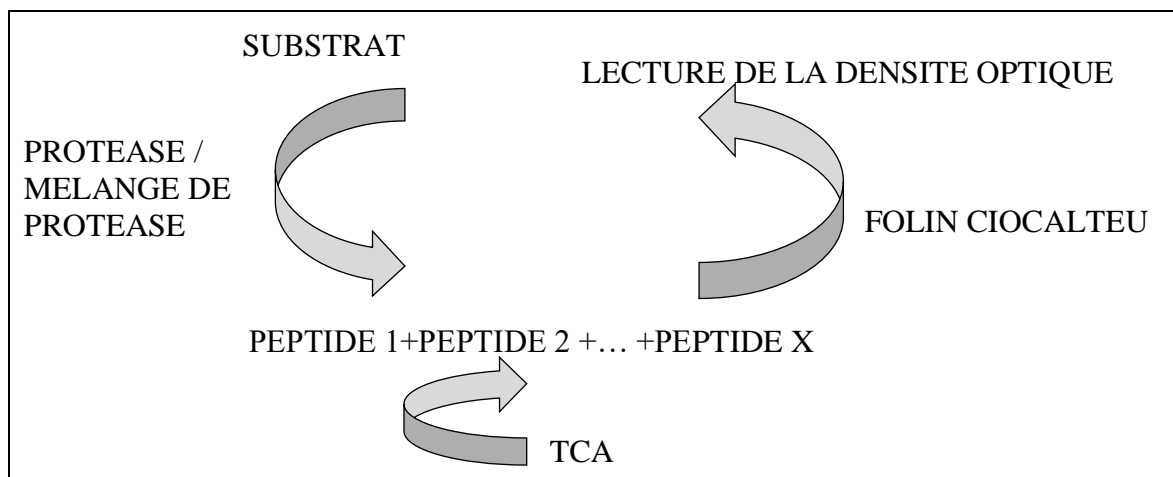
### III.2.1. Dosage de l'activité protéolytique

#### III.2.1.1. Méthode d'Anson, 1938

Elle se base sur l'estimation de la teneur des peptides simples et des acides aminés libres formés par l'hydrolyse d'une protéine substrat sous l'action d'une protéase ou un mélange de protéases.

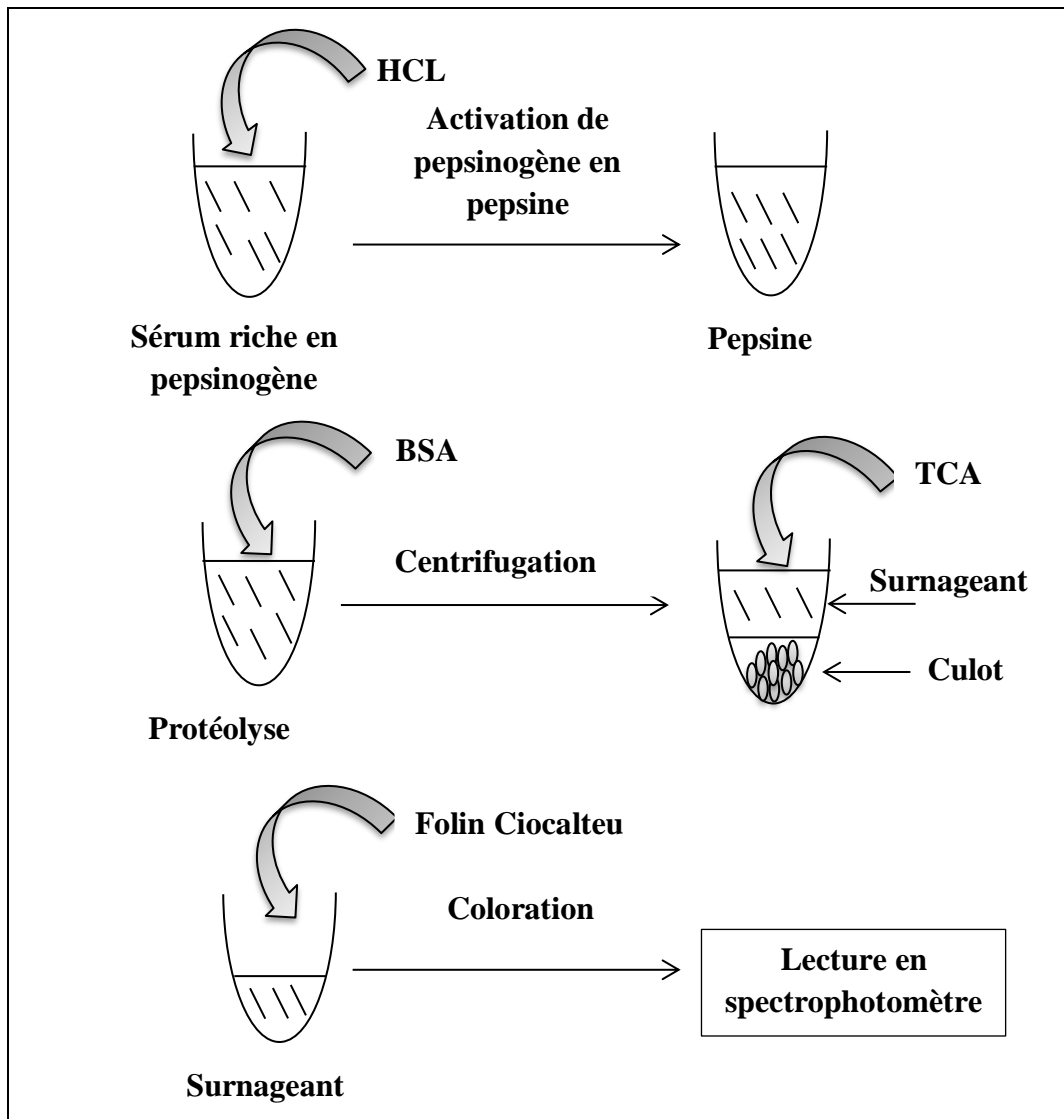
Après la protéolyse la réaction enzymatique est stoppée par l'addition de l'acide trichloracétique (TCA), qui fait précipiter les protéines non attaquées par la protéase, puis les éliminer par différents procédés (centrifugation, filtration). La mesure de l'absorbance des produits azotés libres restants en solution après coloration au réactif de Folin- Ciocalteu (réagit avec la Tyrosine « Tyr » et le Tryptophane « Trp »), permet de déterminer l'activité protéolytique par spectrophotométrie à 750 nm pour l'hémoglobine et la caséine et à 680 nm pour la BSA (Kerboeuf *et al.*, 2002 ; Sidikou *et al.*, 2005 ; Baudin, 2013).

Cette activité s'exprime par référence à l'absorption d'une solution de tyrosine qui sert de référence d'acide aminé aromatique avec des concentrations connues (0 à 100) µg/ml. En présence d'un substrat protéique, une unité d'activité protéolytique correspond à la libération de 1µg de tyrosine par heure et par 1ml d'extrait testé (Anson et Mirsky., 1932 ; Anson, 1938). Néanmoins de nombreux auteurs utilisent la milli-unité de tyrosine (mU = U x 1000) (Kerboeuf *et al.*, 2002). La méthode est donc de type enzymatique ou protéolytique dont le principe est présenté dans la (Figure 10).



**Figure 11** : Principe générale de dosage de l'activité protéolytique par méthode d'Anson 1938 (Sidikou *et al.*, 2005)

Différents substrats non spécifiques sont utilisables dans cette méthode, principalement l'hémoglobine, la caséine, l'ovalbumine et l'albumine bovin (BSA), dont le principe de ce dernier est représenté dans la Figure 11 (Kerboeuf *et al.*, 2002 ; BongaMbokoh *et al.*, 2003 ; Mendes *et al.*, 2009). Néanmoins la gélatine ne peut pas être utilisée en raison qu'elle n'est pas précipitée par le TCA (Anson, 1938).



**Figure 12** : Principe général du dosage du pepsinogène sanguin par la méthode protéolytique d'Anson 1938 sur BSA comme substrat (BongaMbokoh *et al.*, 2003)

Cependant la caséine et l'hémoglobine sont très largement utilisées comme des substrats standards dans les tests de dosage de l'activité protéolytique, vue les avantages qu'elles présentent : la non-toxicité, la richesse en acides aminés aromatiques (Tyrosine, Tryptophane), la disponibilité et l'approvisionnement facile; en plus elles sont pratiquement solubles dans les tampons (Wehrle *et al.*, 1999).

Il existe aussi des substrats spécifiques (synthétiques) mais ils sont plutôt destinés à l'analyse de l'activité de l'enzyme purifiée. Ils ne sont pas adaptés au dosage à partir de l'extrait brut (Kerboeuf *et al.*, 2002) (Mode opératoire de la méthode d'Anson, 1938 : voir annexe II).

### III.2.1.2. Méthode de Park *et al.*, 1995

Le principe de cette méthode est identique à celui d'**Anson, (1938)** en utilisant un substrat chromogène L'Azocaséine. Son hydrolyse par les protéases conduit à la libération du produit « azo » donnant une coloration rouge avec une absorption maximale à 440 nm. Cette coloration est proportionnelle au taux d'azo libéré dans le milieu réactionnel.

Pour la détermination de l'activité spécifique en utilisant le substrat azocaséine, l'unité d'activité protéolytique correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 µg d'azo à 440 nm par min. Le coefficient d'extinction de l'azo-caséine  $\epsilon_{1\%/440\text{nm}} = 37 \text{ L. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  utilisé pour calculer l'activité enzymatique (**Parente *et al.*, 2010 ; Djellouli, 2018**).

Plusieurs adaptations de la méthode d'**Anson, 1938** basées sur le même principe ont été utilisées par les auteurs pour le dosage de l'activité enzymatique de certaines protéases digestives des poissons représentées dans le **tableau 07**.

**Tableau 07** : Les différents substrats utilisés pour le dosage de l'activité enzymatique par la méthode d'**Anson, 1938** de quelques protéases digestives de poisson

Enzyme	Espèce	Substrat	Références
Protéase alcaline	( <i>Onchynchus Mykiss</i> )	Caséine	( <b>Taghizade Handevvari <i>et al.</i>, 2018</b> )
Protéase digestive	/	Caséine	( <b>Saranya <i>et al.</i>, 2018</b> )
Pepsine	( <i>Chanos Chanos</i> ) / ( <i>Ameiurus melas</i> )	Hémoglobine	( <b>Nurhayat <i>et al.</i>, 2020</b> )
protéase intestinale	( <i>Scorpaena notata</i> )	Azocazéine	( <b>Aissaoui <i>et al.</i>, 2017</b> )
Pepsine	( <i>Katsuwonus pelamis</i> )	Hémoglobine ; BSA ; Ovalbumine.	( <b>Nalinanon <i>et al.</i>, 2010</b> )
Protéase aspartique	( <i>Sardinella aurita</i> )	Hémoglobine	( <b>Ben Khaled <i>et al.</i>, 2011</b> )
Protéases endogènes	( <i>Sardinops melanostictus</i> )	Hémoglobine et caséine	( <b>Klomkloao <i>et al.</i>, 2008</b> )
Cathepsine D	( <i>Gadus Moruha. L</i> )	Hémoglobine	( <b>Wang <i>et al.</i>, 2007</b> )
Trypsine thermostable	( <i>Latjanus Synagris</i> )	Azocaséine	( <b>Esposito <i>et al.</i>, 2010</b> )
Pepsine	( <i>Hemigaleus balfouri</i> )	Hémoglobine	( <b>Sholeh <i>et al.</i>, 2019</b> )

### III.2.1.3. Détection de l'activité enzymatique par la technique de Zymographie

Les techniques électrophorétiques assurent également la révélation des activités enzymatiques spécifiques sur des gels par la technique dite l'enzymographie ou zymographie (**Quesada *et al.*, 1996 ; Yan et Bloome, 2003**). C'est une technique analytique simple et de grande sensibilité qui permet l'identification des protéases et de détecter leur potentiel protéolytique (**Choi *et al.*, 2009 ; Walksman et Kurz, 2012 ; Grudkaush *et al.*, 2013**). De plus elle assure la visualisation simultanée du nombre et du poids moléculaire approximative des enzymes protéolytiques dans un échantillon donné, sur la base de leur protéolyse d'un

substrat protéique copolymérisé dans le gel de poly-acrylamide (Walksman et Kurz, 2009 ; Cho *et al.*, 2020).

La gélatine est largement utilisée comme substrat dans cette technique (un produit de bon marché et valable pour la majorité des protéases). En effet, toute protéine digérée par la protéase d'intérêt et qui reste soluble dans les systèmes tampons d'électrophorèse, peut être utilisée comme une alternative à la gélatine (ex: caséine, hémoglobine, collagène, fibrine, héparine, SAAPFFpNA...) (Garcia carreno, 1993 ; Troeberg *et al.*, 2003 ; Kumar et Samarth, 2019).

#### ➤ Principe

Elle repose sur la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) non réducteur (absence de chauffage et d'agents réducteurs [2-Mercaptoéthanol, Dithiothréitol DTT]) contenant le substrat protéique intégré dans la matrice du gel qui reste immobilisé pendant l'électrophorèse. Après la migration, les protéines séparées sont partiellement rénaturees par élimination du SDS avec un détergent non-ionique, tel que le Triton X-100, Tween-20...etc.

Ensuite le gel (zymogramme) est incubé dans un tampon d'activation approprié qui permet à la protéase de récupérer son activité pendant une durée et à une température optimale en fonction du type d'enzyme et du type de substrat intégré dans le gel. A la fin, le gel est coloré au Bleu brillant de Coomassie (BBC) R-250 puis décoloré par le mélange (méthanol, acide acétique, eau) afin de visualiser les activités protéolytiques après la dégradation du substrat sous forme des bandes translucides (claires) ou légèrement colorées sur un fond bleu sombre, dont l'intensité de ces bandes est linéairement liée à la quantité de protéases (Walksmer, 2009 ; Pan *et al.*, 2011 ; Walksmen et Kurz, 2017 ; Kumar et Samarth, 2019).

Cette technique a été utilisée pour la mise en évidence de l'activité protéasique de plusieurs enzymes digestives de poisson en utilisant divers substrats. La caséine a été utilisée par Villanneva-Gutiérrez *et al.*, (2020) pour détecter l'activité enzymatique de la trypsine et la Chymotrypsine de *Totoaba macdonaldi*, la trypsine de *Clupeonella Cultiventris Caspia* par Zamani *et al.*, (2014), tandis que l'hémoglobine été le substrat choisi pour visualiser l'activité de la pepsine de *Lateolabrax Japonicus* par Cao *et al.*, (2011). Felberng *et al.* (2010) et Aissaoui *et al.* (2017) ont utilisé la zymographie sur gélatine pour la recherche de l'activité enzymatique de la protéase de *Clupea harengus* et de la Sardine *Sardina Pinchrudus* et celle de la protéase intestinale de *Scorpaena notata* respectivement.

#### III.2.1.4. Evaluation des propriétés technologiques des protéases de la sardine

##### ➤ Test de coagulation (méthode d'Arima *et al.*, 1970)

L'activité coagulante des protéases entraîne le clivage des liaisons Phe<sub>105</sub>- Met<sub>106</sub> de la caséine K<sub>κ</sub>, ce qui rend les micelles de caséine instable en provoquant leur agrégation ce qui conduit à la formation d'un coagulum (un caillé) (Kumar *et al.*, 2006 ; El Bendary *et al.*, 2007 ; Shieh *et al.*, 2009 ; Bruno *et al.*, 2010 ; Kumari *et al.*, 2012).

### ➤ Principe

La méthode d'**Arima *et al.* (1970)** se base sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de coagulation du lait écrémé et qui s'exprime en terme d'unité d'activité coagulante (**UAC**) nommée aussi unité présure (**UP**). Cette dernière représente la quantité d'enzyme par (ml) d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml du lait écrémé à 10% préparé dans 0,01 M du CaCl<sub>2</sub> à pH 6,5 en 100 secondes et à 30° C. Elle se calcule selon l'expression suivante :

$$AC (UP) = 10xV/TxQ$$

Avec

- ✓ **V** : volume du lait écrémé à coagulé (10ml) ;
- ✓ **Q** : volume de l'extrait enzymatique coagulant utilisé (1ml) ;
- ✓ **T<sub>C</sub>** : temps de coagulation (en secondes).

L'activité coagulante peut être également exprimée en force de coagulation, basée sur le calcul du temps de coagulation sur le même substrat mais à 35°C. Exprimée en Unité Soxhlet (**US**), cette force de coagulation correspond au nombre d'unités de poids ou de volume du lait coagulable en 40 min par unité de poids ou de volume de la préparation enzymatique. Elle se calcule selon la formule suivante :

$$F (US) = 2400xV/TcxQ$$

Avec

- ✓ **2400** : temps standard du test (40 min) en secondes (40 min x 60 sec) ;
- ✓ **V** : volume du lait écrémé à coaguler (10 ml) ;
- ✓ **Q** : volume de l'extrait enzymatique coagulant employé (1ml);
- ✓ **T<sub>C</sub>** : temps de coagulation du lait (en secondes) (**Nouani *et al.*, 2009**).

Les deux méthodes se basent sur la mesure du temps de floculation, qui correspond à l'intervalle du temps qui s'écoule entre l'addition de l'extrait enzymatique coagulant et l'apparition des premières particules du caillé sur la paroi interne de tube incliné.

**Guérard, (1985)** et **Souaré *et al.*, (2017)** ont utilisé cette méthode pour tester l'activité coagulante de la pepsine extraite à partir de la muqueuse gastrique de la roussette (*Scyliorhinus canicula*) et celle extraite des viscères de poisson Chanchard (*trachurus mediterraneus*) respectivement.

### III.2.2. Dosage des protéines

La détermination de l'activité spécifique d'un extrait enzymatique implique d'y doser le taux de protéines, en tant qu'indicateur des concentrations des protéases digestives. De nombreuses méthodes ont été mises au point pour déterminer cette concentration. Ce sont généralement des méthodes spectrophotométriques basées sur diverses caractéristiques spectrales ou réactionnelles des acides aminés constituant les protéines, parmi les méthodes

les plus utilisées sont celles de Lowry et de Bradford (Kruger, 2002 ; Walker, 2002 ; Rosenberg, 2004).

### III.2.2.1. La méthode de Bradford (1976)

#### ➤ Principe

Elle est basée sur l'interaction en milieu acido-alcoolique entre les protéines et le BBC G-250. Ce colorant rouge/brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il s'adsorbe aux protéines ce qui provoque un déplacement de son pic d'absorption maximale qui passe de (464nm, forme cationique) au (595nm, forme anionique).

Cette adsorption se fait principalement et de façon spécifique par des liaisons ioniques avec des acides aminés basiques (Arg, Lys, His) et aromatiques de la molécule protéique.

Plusieurs auteurs ont utilisé cette méthode en raison de sa haute qualité déterminée par sa simplicité, rapidité, grande sensibilité avec une bonne stabilité de la coloration. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes. Seuls les détergents (ex : SDS), autres surfactants (ex: Triton X-100) et des bases fortes interfèrent fortement avec cette méthode (Bradford, 1976 ; Roe, 2001 ; Kruger, 2002 ; Walker, 2002 ; Rosenberg, 2004 ; Boumazza, 2015). (Préparation du réactif de Bradford et le mode opératoire de la méthode : Voir l'annexe III).

### III.2.2.2. La méthode Lowry *et al.* (1951)

#### ➤ Principe

Cette méthode est fondée sur le résultat de deux réactions :

- La réaction de Biuret, dans laquelle les liaisons peptidiques régissent avec le cuivre dans des conditions alcalines pour produire du  $\text{Cu}^+$  qui réagit avec le réactif de folin.
- Et la réaction de folin-ciocalteu qui consiste à réduire le phosphomolybdotungstate en bleu de l'hétéropolymolybdène par oxydation des acides aminés aromatique présents dans les protéines, principalement la tyrosine et le tryptophane et à un degré moindre la cystéine et l'histidine catalysés par le cuivre.

Ces réactions donnent une forte couleur bleue, qui dépend en partie de la teneur en tyrosine et en tryptophane. La méthode est sensible jusqu'à environ 0,01 mg de protéine/ ml (Lowry *et al.*, 1951 ; Kruger, 2002 ; Walker, 2002 ; BongaMbokoh *et al.*, 2003 ; Penda, 2007 ; Chevereux, 2009 ; Zhao *et al.*, 2011 ; Ben Kahoul, 2016).

Pour les deux méthodes précédentes de dosage, le changement de l'absorbance est proportionnel à la quantité du colorant lié, indiquant ainsi la concentration en protéine dans l'extrait. La concentration en protéine totale se détermine à l'aide d'une courbe standard réalisée avec l'albumine du sérum bovin (BSA) (Bradford, 1976 ; Rosenberg, 2004 ; Belhamiche, 2005 ; Rouj, 2011). (Le mode opératoire de deux méthodes de dosage : Voir l'annexe III).

Chkrabate *et al.* (2005) et Acevedo Gomez *et al.* (2018) ont adapté la méthode de Bradford, 1976 pour le dosage de la concentration de la trypsine de *Hypophthalmichthys molitrix* et de la protéase aspartique du *Prochilodus lineatus*, respectivement. Tandis que la méthode de Lowry *et al.* (1951) a été utilisée pour le dosage du taux de la trypsine de

*Actanthopagrus lattis* (Namjou *et al.*, 2019) et la celle de *Thonnus alalunga* (Poonsin *et al.*, 2019).

### III.3. Précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium

Les protéines sont des molécules très sensibles à leur environnement et peuvent facilement perdre temporairement ou définitivement leurs propriétés biologiques. La précipitation différentielle (fractionnée) est l'une des méthodes les plus rapides qui permet de récupérer les protéines sous forme concentrées tout en gardant leurs activités biologiques (Walker, 2002 ; Rosenberg, 2004, Mike et Qin, 2017).

#### ➤ Principe

En principe les électrolytes (les sels) sont très solubles en milieu aqueux, ils combinent à la fois la déshydratation et la neutralisation des protéines. Ce type de précipitation est basé sur le changement des conditions ioniques qui rendent les protéines insolubles et cela varie pour chaque type de ces biomolécules et donc on peut ajuster les concentrations du sel pour isoler la protéine désirée (Walker, 2002 ; Janson, 2011).

A des concentration en sel assez élevées, les charges requises en surface sont neutralisées et la solubilité de la protéine décroît rapidement, la protéine est privée des molécules d'eau qui l'hydratent, celle-ci sorte de la solution et précipite, puisque l'eau disponible pour sa solubilisation est détournée vers la solvataion du sel, c'est le phénomène de relargage au sel (Salting-out) qui permet de stabiliser la conformation native et la fonction de la protéine et diminuer au maximum sa dénaturation.

La principale méthode de précipitation différentielle est celle qui utilise le sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , vu sa grande solubilité dans l'eau avec un pouvoir précipitant élevé et il est facilement retiré de la solution de protéine par simple dialyse. De plus, la méthode permet une pré-purification et considéré comme une étape de concentration des protéines. (Coulon *et al.*, 2004 ; Culter, 2004 ; Koolman et Rohm, 2005 ; Voet *et al.*, 2005 ; Burgess, 2009 ; Rouj, 2011).

La concentration en sel est exprimée en pourcentage de saturation. La quantité de sulfate d'ammonium solide nécessaire pour obtenir la précipitation d'une protéine est calculée soit à partir de la loi, soit déterminée directement à partir du tableau des pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium (Tableau 08) ci-dessous :

$$m (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 (\text{g}) = \frac{515 (x-x_0)}{100-(0.27x)}$$

Avec :

m : quantité de sulfate d'ammonium en (g)

$x_0$  : taux de saturation initiale

x : taux de saturation à atteindre

**Tableau 08** : Monogramme des pourcentages de saturation en sulfate d'ammonium pour 1 l de solution tampon et une température de 0-4 °C (**Dawson et al., 1969**)

Concentration initiale de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0 °C en (%)	Concentration finale de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0° C en (%)																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	saturation de sulfate d'ammonium Solide																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

Le précipité dans la plage choisie pour la saturation des protéines d'intérêt est recueilli par centrifugation, puis celui-ci subira une dialyse (**Ben Chiheub, 2015**).

Cette méthode a été utilisée comme une étape de pré-purification pour la précipitation de plusieurs protéases de poissons, quelques exemples sont représentés dans le **tableau 09**.

### III.4. Dialyse des extraits enzymatiques

La dialyse est un processus de séparation basé sur le phénomène d'osmose en utilisant une membrane semi-perméable généralement en acétate de sodium.

Seules les molécules possédantes une taille inférieure au diamètre des pores sont capables de diffuser de part et d'autre de la membrane et d'atteindre l'équilibre avec le volume total de la solution dans le système (ex : l'eau, les sels «  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  » et de petits métabolites). Par contre, les macromolécules telles que les protéines ne sont pas diffusables où elles seront retenues dans le même compartiment de la membrane.

La dialyse est non seulement utilisée pour éliminer les molécules de sels «  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  » (dessalage), mais aussi utilisée comme moyen de concentrer une solution diluée (**Rosenberg, 2004 ; Voet et al., 2005; Sheehan, 2009 ; Janson, 2011 ; Rouj, 2011**).

**Tableau 09** : Exemples de certaines protéases de poisson précipitées par sulfate d'ammonium à différents taux de saturation

Protéase	Espèce	Taux de saturation	Dialyse	Références
Protéase aspartique	( <i>Prochilodus lineatus</i> )	à 60%	24 H à 4° C	(Acevedo Gomez <i>et al.</i> , 2018)
Protéase digestive	/	à 80%	24 H à 4° C	(Saranya <i>et al.</i> , 2018)
Trypsine	( <i>Common Dolphinfish</i> )	à 100%	24 H à 4° C	(Ribeiro Cardoso Dos Sautos <i>et al.</i> , 2020)
Protéase viscérales	( <i>Euthynnus affinis</i> ) / ( <i>Catla Catla</i> ) / ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	20%-40%	24 H à 4° C	(Narasimha Murthy <i>et al.</i> , 2018)
Pepsine	( <i>Latimeria Chalimnea</i> )	20%-50%	24 H à 4° C	(Tanji <i>et al.</i> , 2007)
Pepsine	( <i>Lateolabrax Japonicus</i> )	20%-60%	24 H à 4° C	(Cao <i>et al.</i> , 2011)
Pepsine	( <i>Mustelus mustelus</i> )	20%-70%	24 H à 4° C	(Bougatef <i>et al.</i> , 2008)
Protéase alcaline	( <i>Onchynchus Mykiss</i> )	20%-80%	24 H à 4° C	(Taghizade Handevvari <i>et al.</i> , 2018)
Trypsine	( <i>Actanthopagrus luttis</i> )	30%-70%	24 H à 4° C	(Namjou <i>et al.</i> , 2019)

### III.5. Purification et caractérisation des protéases digestives de la sardine

Comme toute protéine, les protéases peuvent être extraites, purifiées et caractérisées par différentes techniques de séparation et de caractérisation afin de faciliter l'étude de leurs propriétés structurales et fonctionnelles (Selmane, 2010 ; Benchiheb, 2015).

#### III.5.1. Méthodes de purification

La purification d'une enzyme à partir d'un extrait brut consiste à éliminer toutes les protéines étrangères, tout en perdant le moins d'enzyme possible en cours des étapes de purification. Il s'agit donc d'obtenir des fractions successives où le rapport activité enzymatique totale /concentration des protéines totales augmente. Le maximum de ce rapport est atteint quand l'enzyme est pure. Toutes les étapes de purification sont effectuées à des températures n'excédant pas 4° C (Rosenberg, 2004 ; Bougatef *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007).

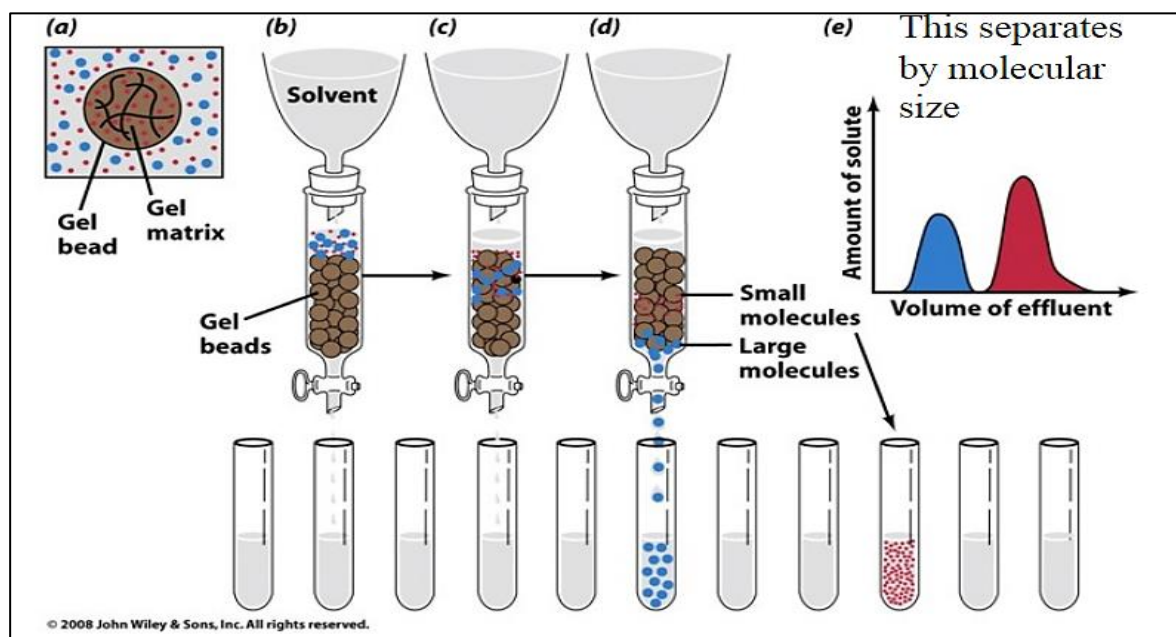
La purification des protéases fait appel soit à plusieurs étapes chromatographiques successives, soit une seule étape chromatographique est suffisante pour obtenir la purification (Voet *et al.*, 2005).

## III.5.1.1. Chromatographie d'exclusion moléculaire

## ➤ Principe

Elle est basée sur le fractionnement des protéines en fonction du poids moléculaire et de la taille relative de ces molécules, avec un ordre d'éluion décroissant. La phase stationnaire est constituée par des billes poreuses, dont le principe consiste à faire migrer l'échantillon à analyser à travers ces granules, où les molécules suffisamment petites sont retenues dans la structure poreuse de la matrice (résine) ce qui ralentie leur progression, alors que les grosses sont progressivement exclues de la phase stationnaire en passant entre les billes et laissent la colonne rapidement (Figure 12) (Roe, 2001 ; Koolman et Rohm, 2005 ; Ben chiheb, 2015 ; Balasubramanian *et al.*, 2004).

Les résultats sont contrôlés au fur et à mesure que le tampon sort de la colonne, généralement en mesurant l'absorbance UV à 280 nm avec dosage du rapport activité enzymatique totale /concentration des protéines totales (Rosenberg, 2004).



**Figure 13** : Principe fondamental de la Chromatographie d'exclusion moléculaire (Voet *et al.*, 2005)

Cette technique est généralement utilisée comme première étape pour la purification de la plupart des protéases, y compris les protéases digestives des poissons ou plusieurs auteurs l'ont utilisé, notamment pour purifier la pepsine de *Thonnus alalunga* sur une colonne de Sephadex-G 50 suivi d'une chromatographie échangeuse d'ions DEAE-Cellulose (Nalinanon *et al.*, 2010). Elle était la seule étape de purification pour la trypsine produite par *Sardina pilchrdus* (Bougatef *et al.*, 2007) et la protéase alcaline de *Onchynchus Mykiss* (Taghizade Handevvari *et al.*, 2018) sur une colonne de Sephadex G-100 et la trypsine de *Common Dolphin* sur colonne Sephacryl S-100 HR (Ribeiro Cardoso Dos Sautos *et al.*, 2020). Pour la trypsine de *Thonnus alalunga* le tamisage moléculaire sur Sephadex G-75 est

également utilisée (Poonsin *et al.*, 2019). Trois séries de chromatographie de gel filtration sur Sephacryl S-200, Sephadex G-50 et DEAE-cellulose ont été utilisées par Klomklao et Benjakul, (2017) afin de purifier la trypsine de *Thonnus Alalunga*.

### III.5.1.2. Chromatographie échangeuse d'ions

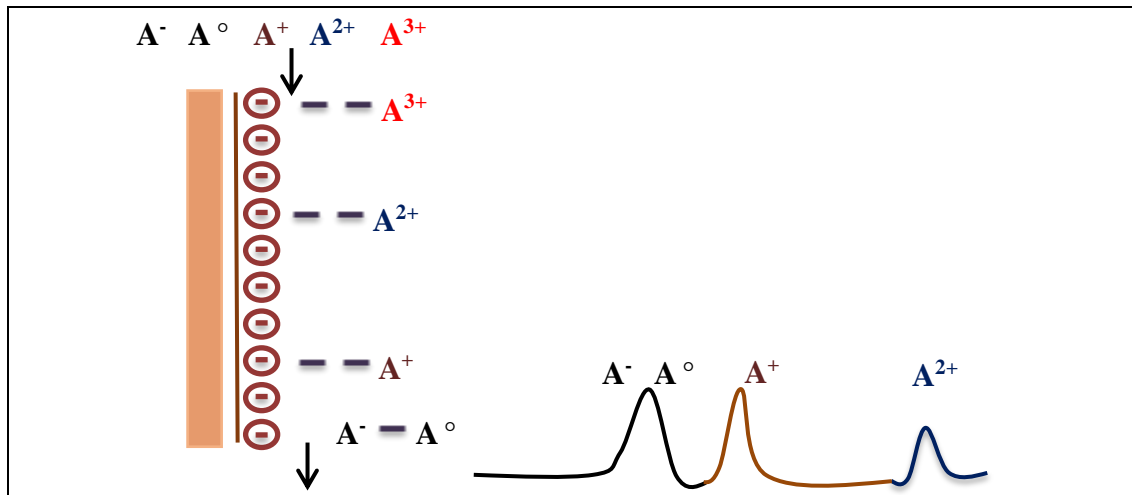
#### ➤ Principe

La chromatographie d'échange d'ions assure la séparation des molécules ionisables, qui repose sur l'attraction entre la phase stationnaire, connue sous le nom d'échangeur d'ions, et le composé à analyser sur la base des différences dans les propriétés de charge nette. Cet échangeur d'ions est un polymère insoluble (cellulose, les gels d'agarose, Dextran réticulé, polystyrène, les polymères d'acrylamide ...) renferme des groupes ionisables qui lui sont chimiquement greffés, ayant les propriétés d'échanger les molécules chargées de façon réversible.

On distingue deux types d'échangeurs d'ions ; les échangeurs cationiques et les échangeurs anioniques. Les protéines ayant une affinité relativement faible avec l'échangeur d'ion seront faiblement retenues et migrent plus rapidement dans la colonne. À l'inverse, les protéines qui interagissent fortement avec l'échangeur d'ions seront retenues et leur élution sera tardée (Culter, 2004 ; Cummins *et al.*, 2010 ; Wilson et Walker, 2010 ; Ben Chiheb, 2015 ; Ben Kahoul, 2016).

Il existe deux manières d'éluer les molécules fixées sur l'échangeur: par paliers ou par gradient

- Modification du pH de la phase mobile de telle sorte que les molécules qui sont chargées ne le soient plus ou qu'elles portent une charge du même signe que l'échangeur d'ions et donc l'interaction électrostatique entre les deux sera perdue.
- Remplacement du tampon d'élution par un tampon de concentration à des quantités croissantes en sel, ce dernier apporte forcément un ion de même charge que les molécules fixées, cet ion s'appelle un contre ion (Figure 13) (Rosenberg, 2004 ; Voet *et al.*, 2005).



**Figure 14** : Principe de la chromatographie échangeuse d'ions (sur une sérine échangeuse de cation) (Janson, 2011)

Les fractions actives sont obtenues après mesure de l'absorbance UV à 280 nm et l'activité protéolytique est dosée (Rosenberg, 2004).

Comme la méthode de gel-filtration, la chromatographie échangeuse d'ions est utilisée dans la plupart des protocoles de purification des protéases digestives de poissons, c'est le cas la trypsine de *Labeo rohita* (Khangembam et Chakrabarti, 2018) et celle de *Sardinella longiceps* (Khandagale et al., 2017) en utilisant le DEAE-Cellulose comme support. Alors que le DEAE-Sephacryl est le gel utilisé pour la séparation de la trypsine de *Cirrhinus mirigala* (Khangembam et Chakrabarti, 2015).

La protéase acide de *Ctenopharyngodon idellus* a été purifiées sur chromatographie échangeuse d'anion Mono Q-sépharose (Liu et al., 2008). Une échangeuse d'ions sur DEAE-Sephadex A-50 est utilisée pour la purification de la trypsine produite par *Balistes Capriscus* (Jellouli et al., 2009).

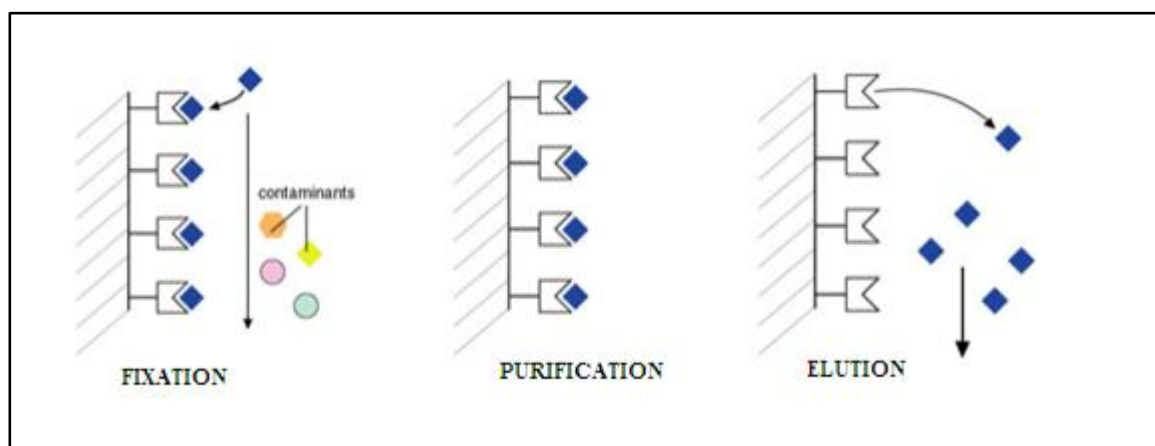
### III.5.1.3. Chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité (CA) est l'une des techniques de séparation les plus puissantes, permettant d'obtenir la séparation la plus fine avec des rendements élevés (Amersham, 1999 ; Zhoa et al., 2018).

#### ➤ Principe

Elle est basée sur l'affinité très spécifique que possède la molécule à séparer vis -à- vis de l'effecteur greffé sur la phase stationnaire, ce qui permet à la molécule de se lier au support par des liaisons covalentes et réversibles. Quand un mélange protéique complexe traverse ce matériel chromatographique, les protéines d'intérêt par absorption sélective se lient au ligand immobilisé, tandis que les autres composants passent au travers et sortent de la colonne en même temps que le tampon (Figure 14). On peut alors récupérer la protéine désirée sous forme très pure en modifiant les conditions d'éluion. La méthode choisie pour l'éluion de la

cible varie en fonction de l'affinité de l'interaction entre la cible et le ligand de sorte que la protéine se détache de la matrice chromatographique (Sheehan, 2009 ; Wilson et Walker, 2010 ; Arora *et al.*, 2016 ; Zhoa *et al.*, 2018).



**Figure 15 :** Principe générale de la chromatographie d'affinité (Vialaret, 2019)

Les fractions actives sont obtenues après mesure de l'absorbance UV à 280 nm et l'activité protéolytique est dosée (Rosenberg, 2004).

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour la purification des protéases digestives des poissons notamment la protéase de *Clupea harengus* et de *Sardina Pinchrus* en utilisant le SBTI-Sépharose 4 B comme support (Felberg *et al.*, (2010). Tandis que le gel de Sepharose 4 B été utilisé pour la séparation de la trypsine de *Lutjanus vitta* (Khantaphant et Benjakul, 2010) et pour celle issue de *Cirrhinus mirigala* le P-aminobenzamidine sépharose a été utilisé comme gel de séparation (Khangembam et Chakrabarti, 2015).

#### III.5.1.4. Electrophorèse SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium, ou SDS-PAGE, est une technique analytique utilisée pour la séparation des protéines ; elle se base uniquement sur la taille des molécules (Laemmli, 1970 ; Walsh, 2014).

##### ➤ Principe

En milieu basique (pH 8,8), dans les conditions dénaturantes en présence d'un excès en SDS (détergent anionique puissant) dans le tampon de charge ou tampon de « Laemmli ». Le SDS s'adsorbe sur les protéines et les transforme en poly-anions linéaires dont ce phénomène est dû au dépliement des protéines, provoqué par la répulsion électrostatique des molécules de l'agent dénaturant; éliminant donc les facteurs de séparation basés sur la différence de formes et de charges (Figure 15). En plus, le  $\beta$ -mercaptoéthanol (agent réducteur) en combinaison avec la chaleur coupe les ponts disulfures internes des protéines établis par les résidus Cys (structure quaternaire).

La charge globale négative entraîne ainsi la migration des protéines vers l'anode, la séparation se fait alors en fonction de la masse moléculaire par un effet de tamisage sur la

matrice créée par polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide. La révélation des protéines ainsi séparées se fait par coloration du gel au BBC G-250 suivie d'une décoloration jusqu'à l'apparition nette de bandes (Rosenberg, 2004 ; Belhamiche, 2005 ; Koolman et Rohm, 2005 ; Wilson et Walker, 2010 ; Rouj, 2011 ; Clark, 2016).

C'est une excellente méthode permettant de vérifier la pureté de l'enzyme au cours de la purification et d'identifier si l'enzyme possède une structure monomérique ou oligomérique, elle permet ainsi de déterminer le poids moléculaire à l'aide de différents marqueurs de taille (Roe, 2001 ; Benchiheb, 2015). (Voir la préparation des solutions et des gels : annexe IV).

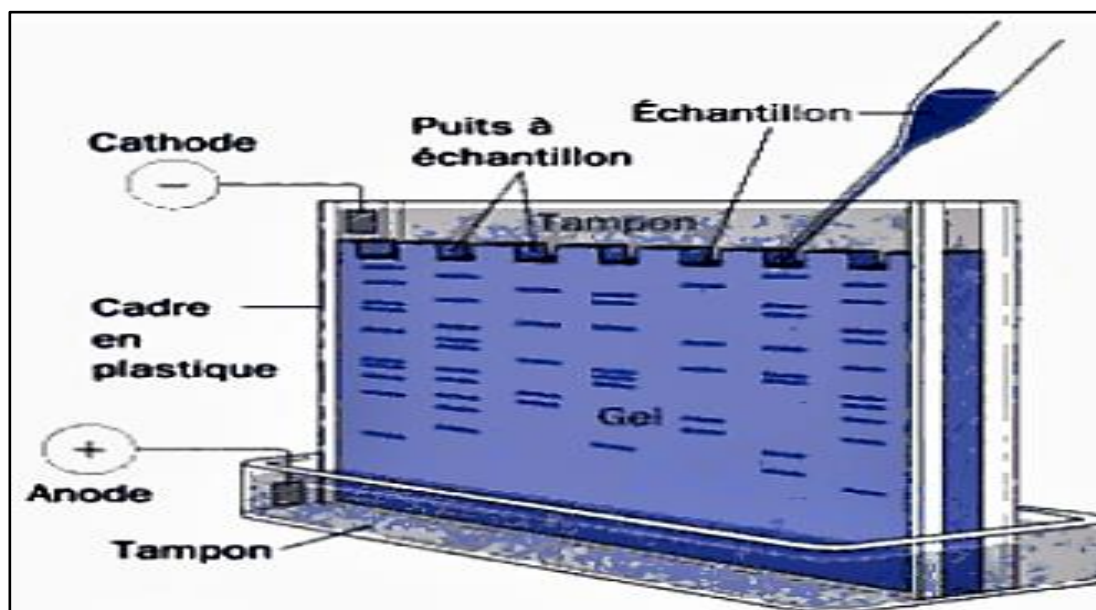


Figure 16 : Principe de la séparation des protéines par SDS-PAGE (Voet *et al.*, 2005)

Il existe une linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique au sein du gel de poly-acrylamide. Une courbe d'étalonnage doit être établie afin de déterminer le poids moléculaire de la protéine étudiée avec  $\text{Log (PM)} = f(\text{Rf})$  (Belhamiche, 2005). Le « Rf » représente le rapport frontal de la protéine considérée qui est calculé par la relation suivante:

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance parcourue par la protéine}}{\text{Distance de migration du bleu de bromophénol}}$$

La migration électrophorétique des protéases en conditions dénaturantes a été aussi utilisée pour la vérification de la pureté et la détermination du poids moléculaire de certaines protéases de poissons, comme par exemple la protéase aspartique de *la Bagre panamensis* (Osuna-Ruiz *et al.*, 2019) et celle de *Cynoscion othonopterus/ Cynoscion parvipinnis/ Cynoscion xanthulus* (Gonzalez-Felix *et al.*, 2020) suivi d'un zymogramme.

Bkhairia *et al.* (2016), Lamas *et al.* (2017) l'ont aussi utilisé dans le cas de la trypsine de *Liza aurita* et celle de *Engraulis anchoita* respectivement, après plusieurs étapes de purification.

### III.5.1.5. Paramètres de purification

Quatre paramètres de purification sont déterminés afin d'évaluer et d'interpréter les différentes étapes de la purification (Janson, 2011 ; Walsh, 2014 ; Djellouli, 2018).

➤ **Activité totale (AT):**

$$AT (U) = \text{Activité totale (U/ml ou U. ml}^{-1}) \times \text{volume totale de l'extrait (ml)}$$

➤ **L'activité spécifique (AS):**

$$AS (U/mg) = \frac{\text{Activité totale (U)}}{\text{concentration en protéines (mg)}}$$

➤ **Le rendement en activité (R):**

$$R(\%) = \frac{\text{Activité totale de chaque étape de purification (U)}}{\text{Activité totale de l'étape initiale (U)}} \times 100$$

➤ **Le facteur de purification (FP):**

$$FP = \frac{\text{Activité spécifique de chaque étape de purification (U/mg)}}{\text{Activité spécifique de l'étape initiale (U/mg)}}$$

## III.5.2. Méthodes de caractérisation

### III.5.2.1. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (ou à haute pression) (CLHP ou HPLC) est une méthodologie avec un pouvoir de séparation fortement amélioré grâce à l'utilisation de colonnes à haute résolution d'où des temps de résolution fortement réduits. (Rosenberg, 2004 ; Benhaïm, 2018).

➤ **Principe**

Elle est basée sur la séparation des constituants d'un mélange protéique par entraînement au moyen d'une phase mobile sous haute pression (liquide) le long d'une phase stationnaire (solide ou liquide fixé), grâce à la répartition sélective des solutés entre ces deux phases. Chaque soluté est donc soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une force de mobilité (due à la phase mobile). Cette technique est utilisée pour la séparation des différentes molécules ainsi que leur composition en acides aminés, peptides et protéines, ce qui permet leur caractérisation. Le dispositif de l'HPLC est représenté dans la (Figure 16).

Pour la séparation des protéines, l'HPLC adaptée est celle en phase inverse, par l'utilisation d'une phase stationnaire très peu polaire, et une phase mobile polaire (le plus souvent des mélanges de méthanol ou d'acétonitrile avec de l'eau) (Bruno *et al.*, 2010 ; Janson, 2011 ; Walsh, 2014 ; Ben Kahoul, 2016).

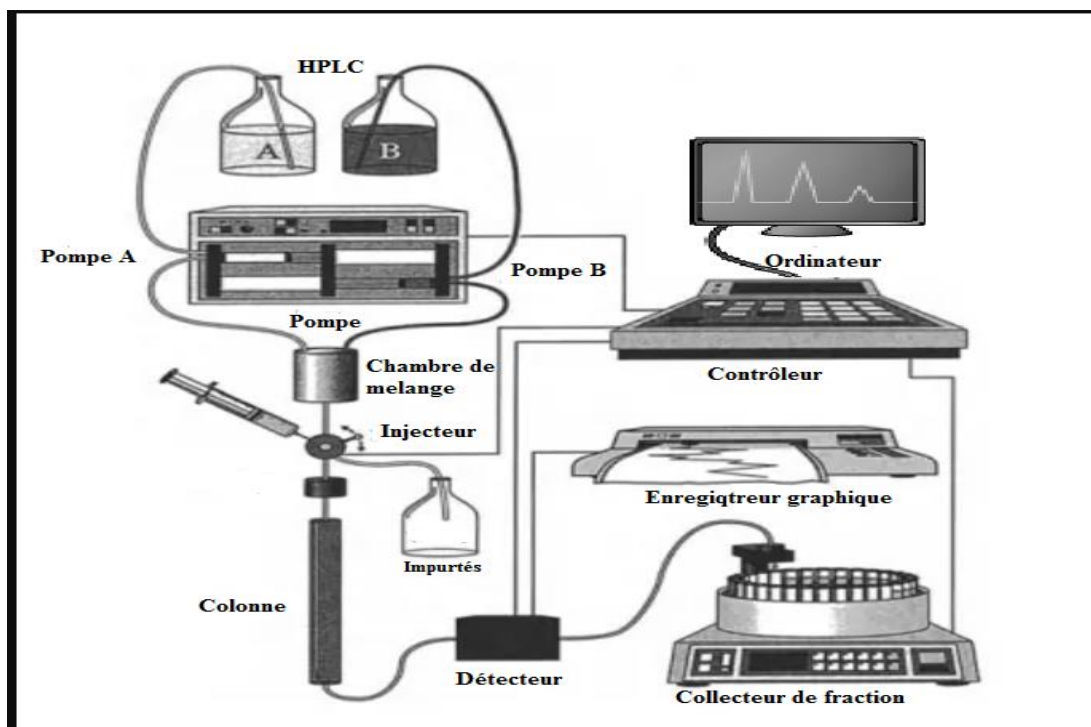


Figure 17 : Représentation schématique d'un dispositif d'HPLC (Rosenberg, 2004)

Plusieurs auteurs ont utilisé cette technique pour la caractérisation de certaines protéases digestives de poisson, comme par exemple, la pepsine de *Mustelus mustelus* (Bougatef *et al.*, 2008), la protéase intestinale de *Scorpaena notata* (Aissaoui *et al.*, 2017) et la trypsine de *Commun Dolphinfish* (Ribeiro Dos Santos *et al.*, 2020).

### III.5.2.2. La spectroscopie infrarouge (IR)

L'analyse par spectroscopie infrarouge est basée sur le fait que les molécules ont des fréquences spécifiques de vibrations internes. Ces fréquences se produisent dans la région infrarouge du spectre électromagnétique :  $\sim 4000 \text{ cm}^{-1}$  à  $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$ .

Lorsque l'énergie apportée par le faisceau lumineux est voisine de celle de la fréquence vibrationnelle de la molécule, une partie du rayonnement IR est absorbée par l'échantillon et l'autre partie est transmise. Les fréquences des radiations absorbées sont mesurées et le spectre résultant de l'énergie absorbée en fonction de la fréquence de vibration permet d'identifier et d'analyser les groupements fonctionnels présents dans les molécules via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. On peut également utiliser la collection unique de bandes d'absorption pour confirmer l'identité d'un composé pur ou pour

détecter la présence d'impuretés spécifiques (Wilson et Walker, 2010 ; Olivier et Bridget, 2014). Une photographie d'un spectromètre infrarouge est représentée dans la figure 17.



Figure 18 : Photographie d'un spectromètre infrarouge (Rosenberg, 2004)

### III.5.2.3. La spectrométrie de masse (SM)

C'est une technique analytique la plus intimement associée à la protéomique, elle est extrêmement précieuse dans la détermination de la masse moléculaire des protéines jusqu'à 500 kDa, avec une précision supérieure à 0,01% (Walsh, 2014).

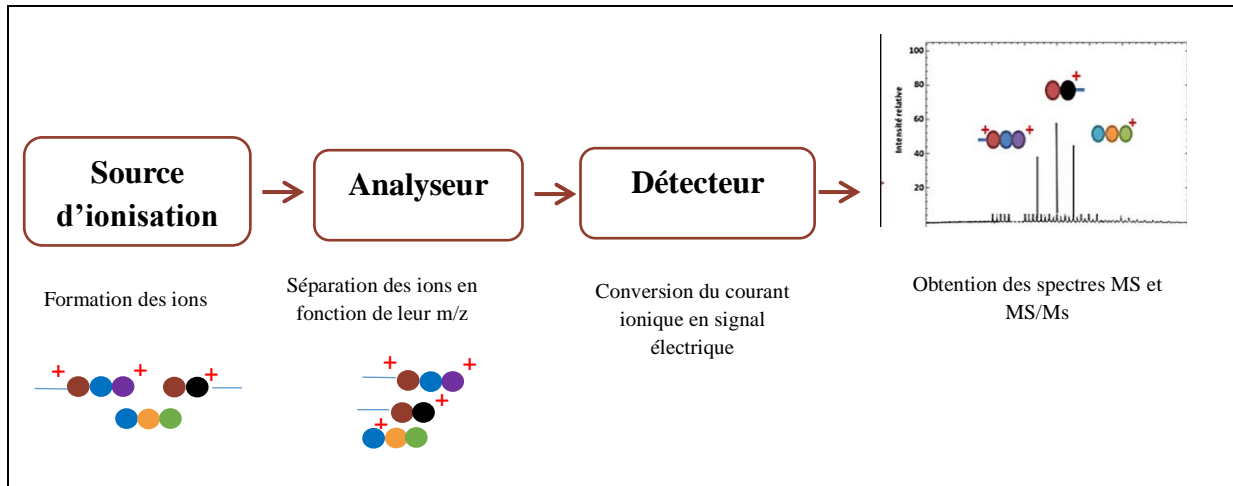
#### ➤ Principe

Elle est basée sur la génération des protéines ionisées en phase gazeuse et la séparation en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Les ions génèrent un spectre de pics uniques qui détermine donc l'identité de la molécule d'origine (Benhaïm, 2018).

Un spectromètre de masse se compose de plusieurs parties, disposées en série, permettant successivement :

L'introduction de l'échantillon au niveau de la source où s'effectue l'évaporation et l'ionisation des molécules (passage de l'état naturel en ions à l'état gazeux) ; l'accélération des ions et la séparation en fonction de leur rapport  $m/z$  tout au long d'un analyseur de masse, en suite, les ions sont détectés sous forme de signaux qui se traduisent en spectre de masse dans un détecteur. Ce transfert des ions de la source vers le détecteur est assuré par l'effet de champ électrique et/ou magnétique (Figure 18) (Roe, 2001 ; Tchilabalo Dilezitoko, 2013 ; Damian et Berkowitz, 2020).

La SM permet non seulement la détermination de la masse moléculaire des protéines intactes, mais aussi l'analyse de la structure primaire, l'identification rapide par l'empreinte de masse de leurs peptides, le séquençage partiel ou complet des acides aminés, ainsi que la détection des modifications des protéines (oxydation, déamination et protéolyse). Ce qui fait que cette technique est de plus en plus dans la caractérisation des protéines. (Palii *et al.*, 2007 ; Garin *et al.*, 2014 ; Walsh, 2014).



**Figure 19** : Représentation schématique des constituants d'un spectromètre de masse (Vialaret, 2019)

Plusieurs adaptations de la technique pour la caractérisation des protéases digestives de poisson, à savoir pour détermination d'empreinte de la masse peptidique de protéase de *Clupea harengus* et *Sardina Pinchrdus* (Felberg *et al.*, 2010), ainsi que pour le séquençage des acides aminés de la trypsine du *Colossoma macropomum* (Marcushi *et al.*, 2010), et de *Catla Catla Hamiltou* (Khangembam *et al.*, 2012) et celle de *Cirrhinus mirigal* (Khangembam et Chakrabarti, 2015).

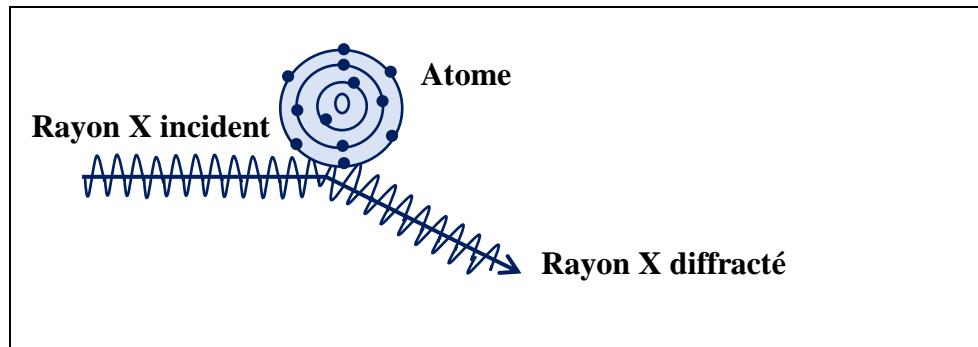
### ➤ Détermination de la structure supérieure des protéines

La diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN) sont les techniques les plus largement utilisées pour obtenir des informations structurales de haute résolution sur les protéines.

#### III.5.2.4. La diffraction aux rayons X (DRX)

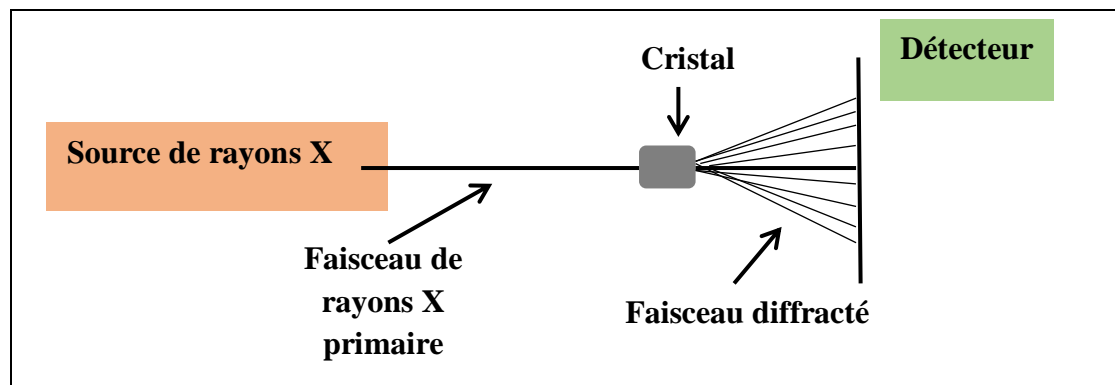
##### ➤ Principe

La DRX consiste à bombarder un échantillon de protéine sous forme cristalline avec un faisceau de rayons X monochromatique qui s'échappe de sa source à travers une fenêtre étroite. La plupart de ces rayons passent directement à travers le cristal, mais certains sont diffractés par les électrons des atomes de ce cristal (Figure 19). Les points diffractés sont enregistrés sur une plaque d'image qui est ensuite balayée. Le diagramme de diffraction qui en résulte, enregistré sur un détecteur, reflète la structure tridimensionnelle des molécules de protéines présentes dans le cristal (Figure 20) (Kasai et Kakudo, 2005 ; Rosenberg, 2004 ; Walsh, 2014 ; Bouchaala, 2017).



**Figure 20 :** Diffraction des rayons X par les électrons d'un atome de cristal des protéines (Serna *et al.*, 2014)

Les informations du modèle de diffraction peuvent ensuite être analysées par une expression mathématique appelée une transformation de Fourier. Permettant d'obtenir une résolution structurale au niveau atomique de l'ordre de 1-1,5Å (0,1-0,15nm), cela donne des informations concernant le positionnement relatif des atomes présent dans la protéine (Joley *et al.*, 2012 ; Olivier et Bridget, 2014).



**Figure 21 :** Principe général sur la diffraction aux rayons X (Walsh, 2014)

### III.5.2.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN mesure les fréquences de résonance caractéristiques de tout noyau magnétiquement actif dans une molécule protéique (Damian et Berkowitz, 2020).

#### ➤ Principe

L'analyse par RMN consiste à appliquer un rayonnement électromagnétique puissant dans la gamme des radiofréquences à un échantillon de la protéine en question. Elle est basée sur le fait qu'un certain nombre de noyaux atomiques présentent un moment magnétique. Il s'agit notamment des isotopes  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^{31}\text{P}$ .

Ceci est dû au fait que les noyaux se comportent comme s'ils tournaient autour d'un axe. Si une protéine est placée dans un champ magnétique puissant, ces noyaux en rotation agissent avec ce dernier comme de minuscules aimants. Le spin de ces noyaux s'aligne sur ce champ. Cet alignement peut être converti en un état excité si une énergie de radiofréquence est appliquée. Par la suite, les noyaux retournent à leur état non excité, émettant ainsi un rayonnement de radiofréquence qui peut être détecté et mesuré, permettant ainsi de fournir des informations structurales tridimensionnelles sur la protéine (Walsh, 2014).

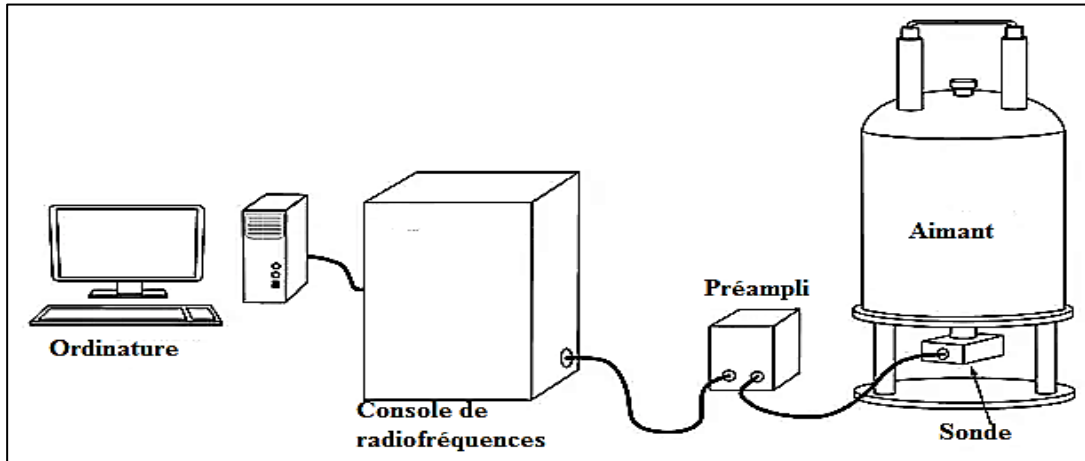


Figure 22 : Dispositif de RMN (Damian et Berkowitz, 2020)

## *Conclusion et perspectives*

## **Conclusion et perspectives**

L'objectif fixé dans ce travail était de rechercher et identifier des enzymes protéolytiques présentes dans l'homogénat du système digestif de la sardine bleue *Sardina Pilchardus*, la purification de l'extrait enzymatique brut et la caractérisation biochimique des extraits purifiés en étudiant le site actif, le poids moléculaire et autres paramètres physicochimiques, ce qui seraient d'un grand apport pour la valorisation de ces protéases.

Les protéases digestives de poisson sont uniques par rapport aux protéinases homologues des mammifères, et présentent également des propriétés saillantes et intéressantes ; l'instabilité thermique et une activité élevée à basse température de traitement. Ces propriétés permettent de réfléchir à la valorisation future des sous-produits de production intensive de ce poisson en tant que source importante de ces enzymes à haute valeur ajoutée. Ces protéinases digestives peuvent être donc un outil très utile dans divers industries (**Klomklao, 2008**).

Bien que la recherche scientifique sur les protéases digestives des poissons reste passionnante, en partie en raison du caractère unique de ses ressources et des possibilités qu'elles peuvent offrir dans divers domaines notamment dans les domaines de la biotechnologie, alimentaire et de la médecine, la question demeure de savoir si elle atteindra son véritable potentiel au-delà du cadre du laboratoire et deviendra sur le marché mondial (**Okada et morrisey., 2007 ; Morrissey et al., 2005**).

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

### A

- Acevedo Gomez AV, Gomez G, Chamorro E, Bustillo S, Leiva LC (2018).** Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): Characterization and application for collagen extraction. *Food Chemistry*, **269**: 610-617.
- Affan F (2019).** *Effets des protéines extraites des co-produits ou du filet de la sardine sur la pression artérielle, la dyslipidémie athérogène, le contrôle glycémique et le stress oxydatif, chez le rat rendu obèse.* Thèse de doctorat en Nutrition, Intérêt et risque sur la santé, Ahmed Ben Bella, Oran, 95 p.
- Aissaoui N, Marzouki MN, Abidi F (2017).** Purification and biochemical characterization of a novel intestinal protease from *Scorpaena notata*. *International Journal of Food Properties*, **20** (2): 1-15.
- Alarcón F, Díaz-López M, Moyano F, Biología D (1997).** Studies on Digestive Enzymes in Fish: Characterization and Practical Application. *Cahiers Options Méditerranéennes*, **22**: 113- 121.
- Alliot É, Febvre A, Métailler R (1974).** Les protéases digestives chez un téléostéen carnivore *Dicentrarchus labrax*. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, **14** (2): 229-237.
- Amersham P (1999).** *Protein purification Handbook.* Amersham Pharmacia biotech AB, Piscataway-USA, 95 p.
- Amiza MA, Owusu KA (2002).** A Single Step of Gastricsin-Like Proteinase from Atlantic Cod (*Gadus murhua*). *Journal of Biological Sciences*, **2** (9): 591-595.
- Anson ML (1938).** The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, **22** (1): 79–89.
- Anson, ML, Mirsky AE (1932).** The estimation of pepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology*, **16**: 59-63.
- Argeirsson B, Bjarnason J B (1993).** Properties of elastase from Atlantic Cod, a Cold-adapted proteinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1164**: 91-100.
- Arima K, Yu J, Iwasaki S (1970).** Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In: Perlmann G, Lorand L (eds) *Methods in enzymology*, Academic, New York **19**: 466-459.
- Arora S, Saxena V, Ayyar BV (2016).** Affinity chromatography : A versatile technique for antibody purification. *Methods*, **116**: 84-94.
- Arvanitoyannis IS, Kassaveti A (2008).** Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, **43**: 726-745.

**B**

- Balasubramanian D, Bryce FA, Dharmaligam K, Green J, Kunthla J. (2004).** Concepts in Biotechnology. Ed Universities Press, India, 486 p.
- Balti R (2011).** *Valorisation des produits et co-produits de la seiche commune (Sepia officinalis) pour l'obtention de biomolécules à haute valeur ajoutée à usage alimentaire et nutraceutique.* Thèse de doctorat en génie biologique, Université de Lille 1 sciences et technologie et université de Sfax-Tunisie, 248 p.
- Balti R, Brkia A, Bougatef A, Ktari N, Nasri M (2009).** A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterization. *Food chemistry*, **113**: 146-154.
- Banga-Mboko H, Godeau J M, Drion P, Sidikou ID, Remy B, Beckers J F (2003).** The use of blood pepsinogen as a biomarker of the integrity of the porcine gastric mucosa. 2. Measurements of blood pepsinogen and its usefulness in the detection of gastric diseases. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **147** (2): 95-104.
- Barkia A, Bougatef A, Nasri R, Fetoui E, Balti R, and Nasri M (2010).** Trypsin from the viscera of Bogue (*Boops boops*): isolation and characterization. *Fish Physiology Biochemistry*, **36**: 893-902.
- Barrett AJ (1994).** Methods in Enzymology, Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases, *Academic Press, San Diego*, **244**: 765 p.
- Barrett AJ, Rawlings ND (1995).** Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallopeptidases: Evolutionary Families of Metallopeptidases, *Academic Press Inc.*, London, 183–228.
- Baudin B (2013).** *Méthodes de mesure des activités enzymatiques.* Service de biochimie - hôpital Saint-Antoine, Paris, 923 p.
- Belhamiche N (2005).** *Extraction, purification et caractérisation de la coagulase de Mocrus Pusillus.* Thèse de Doctorat en Sciences alimentaires, Institut National Agronomique de El-Harrache- Alger, 70 p.
- Ben Elhouli M, Zarai Jaouadi N, Rekik H, Bejar W, Boulkour Touioui S, Hmidi M, Badis A, Bejar S, and Jaouadi B (2015).** A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650, *International Journal of Biological Macromolecules*, **79**: 871-882.
- Ben Khaled H, Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, Jellouli K, Ali NE-H, Ghorbel S, Nasri M (2011).** A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*) : Purification and characterization. *Food Chemistry*, **128**: 847-853.
- Ben Khaled H, Jellouli K, Souissi N, Ghorbel S, Barkia A, Nasri M (2010).** Purification and characterization of three trypsin isoforms from viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*). *Fish Physiology Biochemistry*, **37**: 123-133.

- Benchiheb M (2015).** *Etude des protéases de quelques plantes endémiques. Purification, propriétés, mécanisme d'action et applications technologiques.* Thèse de Doctorat en Biotechnologie et Biochimie, Université de Constantine 1, 144 p.
- Benguendouz A (2018).** *Caractérisation nutritionnelle, toxicologique et aptitudes technologiques de « Sardine pilchardus » pêchée dans la côte Algérienne.* Thèse de doctorat en Sciences alimentaires, Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 163p.
- Benhaïm M (2018).** *Développements méthodologiques en protéomique quantitative pour mieux comprendre la biologie évolutive d'espèces non séquencées.* Thèse de doctorat en chimie analytique, Strasbourg, France, 183 p.
- Benkahoul M (2016).** *Evaluation, Extraction et caractérisation de l'activité coagulante des protéases de deux chardons endémiques, Galactites tomentosa et Onopordum acanthium.* Thèse de Doctorat en Sciences, Université de Constantine 1, 127 p.
- Benomar S (2017).** *Les hydrolysats de protéines de sardine (Sardina pilchardus) et de Bogue (Boops boops) réduisent différemment la cholestérolémie et la peroxydation lipidique chez le rat rendu hypercholestérolémie.* Thèse de doctorat en Nutrition, Intérêt et risque su la santé, Ahmed Ben Bella, Oran, 136 p.
- Beynon RJ (1984).** *Proteases—Potential Role in Health and Disease. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Walter et August, New York, 591 p.
- Bjarnason JB (2004).** Pharmaceutical and cosmetic compositions comprising cod serine proteases and their pharmaceutical and cosmetic use. *European patent specification*, EP1202743, 23 p.
- Bkhairia I, Khaled BH, Ktari N, Miled N, Nasri M, Ghorbel S (2016).** Biochemical and molecular characterisation of a new alkaline trypsin from *Liza aurata* : Structural features explaining thermal stability. *Food Chemistry*, **196** : 1346-1354.
- Bose U, Howitt CA, Colgrave ML (2019).** Proteases as Digestive Aids. *Food Chemistry*, **2**: 314-321.
- Bouchaala N. (2017).** *Etude des propriétés structurale et physicochimique des systèmes Nd-Fe-Co.* Thèse de Doctorat en Chimie, Institut de chimie et des matériaux- Paris- Est et Université de Sfax-Tunisie, 309 p.
- Bougatef A (2013).** Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications – comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, **57**: 257-265.
- Bougatef A, Balti R, Nasri R, Jellouli K, Souissi N, Nasri M (2010).** Biochemical properties of anionic trypsin acting at high concentration of NaCl purified from the intestine of a carnivorous fish: smooth hound (*Mustelus mustelus*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 5763-5769.
- Bougatef A, Balti R, Zaied SB, Souissi N, Nasri M (2008).** Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chemistry*, **107**: 777-784.

- Bougatef A, Souissi N, Fakhfakh N, Ellouz-Triki Y, Nasri M (2007).** Purification and characterization of trypsin from the viscera of sardine (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, **102**: 343-350.
- Bouhali F (2016).** *Étude de la biologie de la sardine S. pilchardus (Walbaum, 1792) des côtes Est-Algérienne.* Thèse de doctorat en Bioressources Marines, Badji Mokhtar, Annaba, 142 p.
- Bouhali FZ, Lechekhab S, Ladaimia S, Assia B, Amara R, Borhane D (2015).** Reproduction et maturation des gonades de *Sardina pilchardus* dans le golfe d'Annaba (Nord-Est algérien). *Cybium: international journal of ichthyology*, **39** (2): 143-153.
- Boukhari B D N (2015).** *Effets de l'huile des coproduits de la Sardine (Sardina Pilchardus) sur le transport des lipides, l'équilibre glycémique, le statut redox et quelques marqueurs de l'inflammation, chez le rat rendu obèse.* Thèse de Doctorat en Nutrition, Intérêts et Risque sur la santé, Université d'Oran 1, 151 p.
- Boumazza S (2015).** *Evaluation rapide des protéines par turbidimétrie : Application à quelques effluents agro-alimentaires avant et après un traitement de clarification.* Thèse de Doctorat en Biochimie Appliquée, Université d'Annaba, 148 p.
- Boury M (1960).** Les enzymes protéolytiques du poisson. *Science et Pêche*, **82**: 1-4.
- Bradford M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry*, **72** (1): 248-254.
- Bruno M A, Lazza C M, Errasti M E, Lopez L M, Caffini N O, Pardo MF (2010).** Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. *LWT - Food Science and Technology*, **43**: 695-701.
- Burgess RR (2009).** Protein precipitation techniques. *Methods Enzymology*, **463**: 331-342.

## C

- Cao M J, Chen W Q, Du CH, Yoshida A, Lan W G, Liu G M, Su W J (2011).** Pepsinogens and pepsins from Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). *Biochemistry and Physiology part B Biochemistry-Molecular Biology*, **158**: 259-265.
- Cao M J, Osatomi K, Suzki M, Hara K, Tachibana K, Ishihara T (2000).** Purification and characterization of two anionic trypsins from the hepatopancreas of Carp, *Fish Science*, **66**: 172-1179.
- Castillo-Yanez, F J, Pacheco-Aguilar, R, Garcia-Carreno F L, Navarrete-Del Toro Mde L (2005).** Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Biochemistry and Physiology part B Biochemistry-Molecular Biology*, **140**: 91-98.

- Castillo-Yanez, F J, Pacheco-Aguilar, R, Garcia-Carreno F L, Navarrete-Del Toro Mde L (2005).** Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chemistry*, **99**: 252-259.
- Celis-Guerrero LE, Garcia-Carreno FL, del Toro MA (2004).** Characterization of proteases in the digestive system of spiny lobster (*Panulirus interruptus*). *Marine Biotechnology (NY)*, **6**: 262-269.
- Chakrabarti R, Mansingh Rathore R, Mittal P, Kumar S (2006).** Functional changes in digestive enzymes and characterization of proteases of silver carp (♂) and bighead carp (♀) hybrid, during early ontogeny. *Aquaculture*, **253**: 694-702.
- Chevreux S (2009).** *Spéciation directe de metalloprotéines séparées sur gels d'électrophorèse: Analyses xas de la superoxyde dismutase et ICP-MS de protéines arseniées.* Thèse de Doctorat en Chimie analytique et environnement, Université Bordeaux 1, 201 p.
- Chikhi SMR (2018).** Le secteur de la pêche maritime en algérie: enjeux et réalités. The maritime fisheries sector in algeria: challenges and realities. *Etudes Economiques Approfondies*, **7**: 81-111.
- Cho N S, Kim BH, Park CS, Han Y J, Lee H W, Choi J H, Lee S G, Song J J (2009).** Multiple-layer substrate zymography for detection of several enzymes in a single sodium dodecyl sulfate gel. *Analytical Biochemistry*, **386**: 121-122.
- Cho Y J, Park J H, Chung G Y, Shin H S (2020).** Facile Identification and Isolation of Protease Using SDS-PAGE and Zymography, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **25**: 164-169.
- Chong ASC, Hashim R, Chow-Yang L, Ali AB (2002).** Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture*, **203**: 321–333.
- Clark DP (2016).** Proteomics. In : Pazdernik N J. *Biotechnology*. Washington p. 295-333.
- Clark J, Macdonald NL, Stark JR (1985).** Metabolism in marine flat fish III. Measurement of elastase activity in the digestive tract of Dover Sole (*Solea Solea L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **81B**: 695-700.
- Cohen T, Gertler A (1981).** Pancreatic proteolytic enzymes from Carp (*Cyprinus carpio*) I. Purification and physical properties of trypsin, chymosin, elastase and carboxypeptidase B. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **69B** : 647-653.
- Coulon D, Cabanne C, Fitton V (2004).** Penicillin acylase purification with the aid of hydrophobic charge induction chromatography. *Journal of Chromatography B*, **808** (1): 111- 115.
- Creac'h P V (1963).** Les enzymes protéolytiques des poissons. *Annales de la nutrition et de l'alimentation*, 375-468.
- Culter P. (2004).** Protein purification protocols: methods in molecular biology 2ème Ed Humana Press, USA, **244**, 484 p.

**Cummins P M, Dowling O, O'Connor B F (2011).** Chapters 12: Ion-exchange chromatography: basic principles and application to the partial purification of soluble mammalian prolyl oligo-peptidase, from Walls Dermot and Loughran Sinéad T., *Protein Chromatography: Methods and protocols*, Methods in Molecular Biology, **681**.

## **D**

**Damian H J, Berkowitz S A (2020).** *Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals*. Elsevier, Sudbury, MA, United States, 563 p.

**Davidson A (2002).** Les poissons de la Méditerranée, Edisud, Aix-en-Provence, France, 299 p.

**Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones K M (1969).** *Data for biochemical research (2nd edn)*. Clarendon Press, Oxford, 616 p.

**De Luca V, Maria G, De Mauro G, Catara G, Carginale V, Ruggiero G, Capasso A, Parisi E, Brier S, Engen JR, Capasso C (2009).** Aspartic proteinases in Antarctic fish. *Marine Genomics*, **2**: 1-10.

**De-vecchi S D, Coppes Z (1996).** Marine Fish digestive proteases relevance to food industry and south-west Atlantic region a review. *Journal of Food Biochemistry*, **20**:193-214.

**Djellouli M (2018).** *Production et caractérisation de peptides bioactifs issus de l'hydrolyse de protéines alimentaires par les protéases des bactéries lactiques. Cas des protéines de co-produits marines*. Thèse de Doctorat en Biotechnologie, Université d'Oran 1, 193 p.

**Ducruet J, Aurand J-M, Cahuzac R, Silvestri AC, Roelé J, Bach B, Cléroux M, Koestel C, Laurenzini F, Roesti J (2019).** Développement de nouvelles applications pour l'utilisation de protéases en œnologie. *BIO Web of Conferences*, **12**: 1-8.

## **E**

**El Hadj Ali N, Hmidet N, Bougatef A, Nasri R, Nasri M (2009).** A laundry detergent-stable alkaline trypsin from striped seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera: purification and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 10943-10950.

**EL Hadj Ali N, Hmidet N, Ghrbel-Bellaaj O, Fakhfakh-Zouari N, Bougatef A, Nasri M (2011).** Solvent-stable digestive alkaline proteinases from Striped Seabream (*Lithognathus mormyrus*) viscera : characteristics, application in the deproteinisation in laundry commercial detergents. *Applied biochemistry and biotechnology*, **164** (7): 1096-1110.

**El-Beltagy A E, El-Adawy T A, Rahma E H, El-Bedawey A A (2004).** Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). *Food Chemistry*, **86** : 33-39.

**El-Bendary M. A., Moharam Maysa E. and Ali Thanaa H. (2007).** Purification and characterization of milk-clotting enzyme production by *Bacillus sphaericus*. *Journal of Applied Sciences Research*, **3** (8): 695-699.

**Esposito T S, Marcuschi M, Amaral I P, Carvalho L B, Bezerra R S (2010).** Trypsin from the processing waste of the lane snapper (*Lutjanus synagris*) and its compatibility with oxidants, surfactants and commercial detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**: 6433-6439.

## F

**FAO (2018).** *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable.* Rome, 254 p.

**Felberg H S, Hagen L, Slupphaug G, Batista I, Nunes M L, Olsen R L, Martinez I (2010).** Partial characterisation of gelatinolytic activities in herring (*Clupea harengus*) and sardine (*Sardina pilchardus*) possibly involved in post-mortem autolysis of ventral muscle. *Food Chemistry*, **119**: 675-683.

**Ferrall-Fairbanks MC, Kieslich CA, Platt MO (2020).** Reassessing enzyme kinetics: Considering protease-as-substrate interactions in proteolytic networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117** (6): 3307-3318.

**Forest A (2001).** Ressources halieutiques hors quotas du Nord Est Atlantique : bilan des connaissances et analyse de scénarios d'évolution de la gestion. Ifremer Eds, tome, **2**: 215 P.

## G

**Gaillard O (2003).** La trypsine (TIR) Immunoreactive trypsin. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **18**: 254-255.

**Garcia-Carreno FL, Dimes LE, Haard NF (1993).** Substrate-Gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, **214**: 65-69.

**Garcia-Carreno FL, MAN Del Toro (1997).** Classification of Proteases Without Tears. *Biochemical Education*, **25** (3): 161-167.

**Garrido S, Marçalo A, Zwolinski J, Van Der Lingen CD (2007).** Laboratory investigations on the effect of prey size and concentration on the feeding behaviour of *Sardina pilchardus*. *Marine Ecology Progress Series*, **330**:189-199.

**Gonzalez-Felix M, De La Ree-Rodriguez C, Perez-Velazquez M (2020).** Partial characterization, quantification and optimum activity of trypsin and lipase from the sciaenids *Cynoscion othonopterus*, *Cynoscion parvipinnis* and *Cynoscion xanthulus*. *Archives of Biological Sciences*, **72** (1) : 81-93.

**Grudkowska M, Lisik P, Rybka K (2013).** Two-dimensional zymography in detection of proteolytic enzymes in wheat leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, **35**: 3477-3482.

**Guérard F (1985).** Une utilisation des enzymes proteolytiques extraites des visceres de poissons : La coagulation du lait. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, **49** (3-4): 199-203.

**Gurumallesh P, Alagu K, Ramakrishnan B, Muthusamy S (2019).** A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, **128**: 254-267.

## *H*

**Hartley BS (2012).** *Proteolytic enzymes*, Department of Biochemistry, School of Medicine, Seattle, Washington, 71 p.

**Hidalgo MC, Urea E, Sanz A (1999).** Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, **170**: 267–283.

## *J*

**Janson JC (2011).** *Protein purification: principals, high resolution methods and applications*. 3ème Ed John Wiley and Sons, 548 p.

**Jardillier JC, Renaud D, Vatie J, Agenray J (1971).** Etude cinétique de l'action de la pepsine sur l'hémoglobine application à l'exploration fonctionnelle gastrique. *Clinica Chimica Acta*. **38**: 187-197.

**Jellouli K, Bougatef A, Daassi D, Balti R, Barkia A, Nasri M (2009).** New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes caprisacus*) with high activity at low temperature: Purification and characterisation. *Food Chemistry*, **116**: 644-650.

**Jemaa S (2014).** *Étude de la structure des populations et du régime alimentaire de l'anchois européen (Engraulis encrasicolus) et de la sardine européenne (Sardina pilchardus): relations avec l'environnement*. Thèse de doctorat en Géosciences, Écologie, Paléontologie, Océanographie, Littoral, Côte d'Opale, 241p.

**Joly Y, Matteo, S D, Bunău O (2012).** Resonant X-ray diffraction: Basic theoretical principles. *The European Physical Journal Special Topics*, **208**: 21-38.

K

- Kasai N, Kakudo M, Kasai-Kakudo (2005).** *X-ray Diffraction by Macromolecules*. Kodansha, 507 p.
- Kerboeuf D, Koch C, Le Dréan, E, Lacourt A (2002).** Méthode simplifiée de mesure de la concentration en pepsinogène dans le sérum. *Revue de médecine vétérinaire*, **153**: 707-712.
- Khandagale A, Mundodi L, Balladka K, Correspondence A, Khandagale, Sarojini B (2017).** Isolation and characterization of trypsin from fish viscera of Oil Sardine (*Sardinella longiceps*). *International journal of fisheries and aquatic studies*, **5** (2): 33-37.
- Khangembam B K, Chakrabarti R (2015).** Trypsin from the digestive system of carp *Cirrhinus mrigala*: purification, characterization and its potential application. *Food Chemistry*, **175** : 386-394.
- Khangembam B K, Chakrabarti R (2018).** Viscera of *Labeo rohita*: A Potential Source of Trypsin for Industrial Application. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **27**: 1078-1092.
- Khangembam B K, Yvr K S, Chakrabarti R (2012).** Purification and characterization of trypsin from the digestive system of carp *Catla catla* (Hamilton). *International Aquatic Research*, **4** (1): 9.
- Khantaphant S, Benjakul S (2010).** Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, **120**: 658-664.
- Kim H R, Seo H J, Byun D S, Heu M S, Pyeun J H (2002).** Proteolytic enzymes from fish and their utilization. *Fisheries science*, **68** (2): 1557-1562.
- Kim S K (2013).** *Marine proteins and peptides: biological activities and applications*. (Ed.) John Wiley & Sons, USA, 818 p.
- Kim S K, Byun HG, Park P J, Shahidi F (2001).** Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 2992-2997.
- Kirti Rani, Rana R, Datt S (2011).** Review on latest overview of protéases : Review article. *International journal of Current Life Sciences*, **2** (1): 12-18.
- Kishimura H, Hayashi K (2002).** Isolation and characteristics of trypsin from pyloric caeca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132B**: 485-490.
- Kishimura H, Klomklao S, Benjakul S, Chun B-S (2008).** Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). *Food Chemistry*, **106**:194-199.
- Klomklao S (2008).** Digestive proteinases from marine organisms and their applications. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, **30** (1): 37-46.

- Klomklao S, Benjakul S (2017).** Two trypsin isoforms from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification and physicochemical and biochemical characterization, *International Journal of Biological Macromolecules*, **107**: 1864-1870.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W (2004).** Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal of Food Biochemistry*, **28** (5): 355-372.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson B K (2006b).** Purification and characterization of trypsin from the spleen of tonggol tuna (*Thunnus tonggol*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**: 5617-5622.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson B K (2007c).** Trypsins from the pyloric caeca of bluefish (*Pomatomus Saltatrix*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **148B**: 382-389.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Simpson B K, Saeki H (2006).** Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology part B Biochemistry-Molecular Biology*, **144**: 47-56.
- Klomklao S, Benjakul S, Visessanguan W, Simpson B K, Kishimura H (2005).** Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, **40**: 3061-3067.
- Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S (2008).** Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chemistry*, **107**: 213-220.
- Koolman J, Rohm K-H (2005).** *Color of Biochemistry*. 2<sup>ème</sup> Ed Thieme Verlag, New York, 304 p.
- Koury B, Spinelli J, Wieg D (1971).** Protein autolysis rates at various pH's and temperatures in hake and pacific herring, and their effect in yielded in the preparation of fish protein concentrate. *Fishery Bulletin*, **69**: 214-246.
- Kristjansson M M, Gudmundsdottir S, Fox J W, Bjarnason J B (1995).** Characterization of collagenolytic serine proteinase from the Atlantic Cod (*Gadus Morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **110B**: 707-717.
- Krogdahl Å, Sundby A, Holm H (2015).** Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities, *Aquaculture*, **449**: 27-36.
- Kruger N (2002).** *The Bradford Method For Protein Quantitation*. Walker J M, Totowa\_New Jersey, 1139 p.
- Kumar A B, Samarth T (2019).** Casein Zymography for Analysis of Calpain-1 and Calpain-2 Activity. *Methods In Molecular Biology*, **1915**: 31-38.
- Kumar A, Sharma J, Mohanty K A, Grover S, Batish V K (2006).** Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part B, **145**: 108-113.
- Kumar D, Savitri T N, Verma R, Bhalla T C (2008).** Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, **3** (12): 661-672.

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

**Kurtovic I, Marshall S N, Simpson B K (2006).** Isolation and characterization of a trypsin fraction from the pyloric ceca of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*), *Comparative Biochemistry and Physiology part B Molecular Biololgy*, **143**: 432-440.

## L

**Ladaimia S (2017).** *Reproduction, âge et croissance de deux Téléostéens pélagiques des côtes de l'extrême Est algérien (El Kala): l'anchois, Engraulis encrasicolus (Linnaeus, 1758) et la sardine, Sardina pilchardus (Walbaum, 1792).* Thèse de Doctorat en Bioressources Marines, Université d'Annaba, 129 p.

**Laemmli UK (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

**Lamas DL, Yeannes MI, Massa AE (2017).** Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita* : partial purification and characterization. *BioTechnologia*, **98** (2):103-112.

**Liu Z Y, Wang Z, Xu S Y, Xu LN (2007).** Two trypsin isoforms from the intestine of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), *Comparative Biochemistry and Physiology part B Molecular Biololgy*, **177**: 655-666.

**Liu ZY, Wang Z, Zhang J (2008).** An acidic protease from the grass carp intestine (*Ctenopharyngodon idellus*), *Comparative Biochemistry and Physiology part B Molecular Biololgy*, **149** : 83-90.

**López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008).** Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, **283** (45): 30433-30437.

**Lourhzal W, Tahri EH, Faïd M (2003).** Ensilage des déchets de poisson et essai d'alimentation sur les rats. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, **23** (1): 15-20.

**Lowry HO, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ, (1951).** Measurement with the follin reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 265-275.

## M

**Marcuschi M, Esposito T S, Machado M F, Hirata I Y, Machado M F, Silva M V, Carvalho LB J, Oliveira V, Bezerra R S (2010).** Purification, characterization and substrate specificity of a trypsin from the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **396**: 667-673.

**Martin A M. (1994).** *Fisheries processing: biotechnological applications.* Springer Science & Business Media, 508 p.

- Matsuoka T, Kawashima T, Nakamura T, Yabe T (2017).** Characterization and comparison of recombinant honeybee chymotrypsin-like protease (HCLPase) expressed in *Escherichia coli* and insect cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **81** (7): 1401-1404.
- Mendes C, Brito M, Porto T, Porto A, Bezerra R, Carvalho L, Caneiro-Leão A, Arneiro-da-Cunha M (2009).** Aquaculture by-product: a source of proteolytic enzymes for detergent additives, *Chemical Papers*, 63 p.
- Mike S Lee, Qin C Ji. (2017).** *Protein Analysis using Mass Spectrometry : Accelerating Protein Biotherapeutics from Lab to Patient*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken- USA, 266 p.
- Morrissey M T, Lin J, Ismond A (2005).** Waste management and by-products utilization. In Park J. W (Ed.), *Surimi and surimi seafood*. New York : Taylor and Francis, 279-323.
- Morrissey M T, Okada T (2007).** Marine enzymes from seafood by-products, In *Maximising the Value of Marine By-Products*, 374-396.
- Mosztbacher D, Demcsak A, Sahin-Toth M (2020).** Measuring digestive protease activation in the mouse pancreas. *Pancreatology*, **20** : 288-292.

## N

- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H (2010).** Purification and biochemical properties of pepsins from the stomach of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), *European Food Research and Technology*, **231**: 259-269.
- Nalinanon, Benjaku S, Visessanguan, Kishimura H (2007).** Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, **104** (2): 593-601.
- Namjou F, Yeganeh S, Madani R, Ouraji H (2019).** Extraction, purification, and characterization of trypsin obtained from the digestive system of yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Archives of Razi Institute*, **74** (4): 405-411.
- Narasimha Murthy L, Phadke GG, Unnikrishnan P, Annamalai J, Joshy CG, Zynudheen AA, Ravishankar CN (2017).** Valorization of Fish Viscera for Crude Proteases Production and Its Use in Bioactive Protein Hydrolysate Preparation. *Waste and Biomass Valorization*, **9**: 1735-1746.
- Nasri R, Abed H, Karra-châabouni M, Nasri M, Bougatef A (2015).** Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **4**: 355-361.
- Nouani A, Belhamiche N, Slamani R, Belbraouet S, Fazouane F, Bellal M M (2009).** Extracellular protease from *Mucor pusillus*: purification and characterization, *International Journal of Dairy Technology*, **62**:112-117.

**Nurhayati T, Ambarsari L, Nurilmala M, Abdullah A, Rakhmawati I A I (2020).** Pepsin activity from gastric of milkfish and catfish in Indonesian Waters. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **404** (1): 12060.

## O

**Olivar H S, Bridget M M (2014).** *X-Ray Diffraction : Modern Experimental Techniques*. Taylor et Francis group, CRC Press, USA, 438 p.

**Olivar MP, Salat J, Palomera I, (2001).** Comparative study of spatial distribution patterns of the early stages of anchovy and pilchard in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **217**: 111-120.

**Osuna-Ruiz I, Espinoza-Marroquin MF, Salazar-Leyva JA, Pena E, Alvarez-Gonzalez CA, Banuelos-Vargas I, Martinez-Montano E (2019).** Biochemical characterization of a semi-purified aspartic protease from sea catfish *Bagre panamensis* with milk-clotting activity. *Food Science and Biotechnology*, **28**: 1785-1793.

**Oulhiz A (2019).** *Évaluation, valorisation et utilisation des coproduits de la crevette rouge *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) et du thon *Thunnus thynnus* (Linné, 1758) pour l'alimentation du tilapia rouge (*Oreochromis sp.*)*. Thèse de doctorat en Ecologie et Environnement Marin, Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 178 p.

## P

**Palii C, Mitrofan L, Montreuil J, Artenie V (2007).** L'approche proteomique et ses applications. *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară*, **3**:1-11.

**Pan D, Hill A P, Kashou A, Wilson K A, Tan-Wilson A (2011).** Electrophoretic transfer protein zymography, *Analytical Biochemistry*, **411**: 277-283.

**Parente J A, Salem-Izacc, SM, Santana J M, Pereira M, Borges C L, Bailao A M, Soares C M (2010).** A secreted serine protease of *Paracoccidioides brasiliensis* and its interactions with fungal proteins, *BMC Microbiology*, **10**: 292.

**Park P J, Lee S H, Byun H G, Kim S H, Kim SK (2002).** Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. *Journal of biochemistry and molecular biology*, **35** (6): 576-582.

**Park S Y, Gibbs B F, Lee B H (1995).** Effects of crude enzyme of *Lactobacillus casei* LLG on water-soluble peptides of enzyme-modified cheese. *Food research international*, **28** (1): 43-49.

**Pavlisko, Rial A, Coppes Z (1997b).** Characterization of trypsin purified from the pyloric caeca of the southwest Atlantic white croaker *Micropogonis furnieri* (Sciaenidae). *Journal of food Biochemistry*, **21**: 383-400.

**Penda RE (2007).** *Contribution à l'étude de la valorisation des protéines d'hydrolysats obtenues par hydrolyse enzymatique des co-produits (tête, viscères) de la Sole tropicale (Cynoglossus senegalensis) au Sénégal.* Thèse de doctorat en Médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie, Cheikh anta diop, Dakar, 58 p.

**Poonsin T, Simpson B K, Benjakul S, Visessanguan W, Yoshida A, Klomklao S (2019).** Albacore tuna spleen trypsin: Potential application as laundry detergent additive and in carotenoprotein extraction from Pacific white shrimp shells, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **17**: 638-646.

## Q

**Quesada A, Fajardo I, Rodriguez-Agudo D, Pachon J-M, Medina M A (1996).** Zymography of extracellular matrix proteases. *Biochemical Education*, **24** (3): 170-171.

## R

**Raghunath M T, Shamkant B B (2010).** Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. In *Journal of Pharmacy Research*, **3** (9): 2048-2068.

**Rao M B, Tanksale AM, Ghatge M S, Deshpande VV (1998).** Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62** (3): 597-653.

**Rasoanarivo R, Folack J, Champalbert G, Bucker B (1991).** Relations entre les communautés phytoplanctoniques et l'alimentation des larves de *Sardina pichardus* Walb. Golfe de Fos (*Méditerranée occidentale*): influence de la lumière sur l'activité alimentaire des larves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **151**: 83-92.

**Ribeiro Cardoso Dos Santos DM, Victor dos Santos CW, Barros de Souza C, Sarmiento de Albuquerque F, Marcos dos Santos Oliveira J, Vieira Pereira HJ (2020).** Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (common dolphinfish) : Purification, characterization, and application in commercial detergents. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **25**: 1-7.

**Roe S (2001).** Protein purification and applications: a practical approach. 2ème Ed Oxford University Press, USA, 262 p.

**Rosenberg I M (2004).** Protein analysis and purification: benchtop techniques. 2ème Ed Birkhäuser, USA, 520 p.

**Rouj S (2011).** *Protéolyse chez lactobacillus : purification et caractérisation de protéases et aminopeptidase.* Thèse en biochimie bactérienne, université d'Oran Es Senia, Oran, 132 p.

**Rustad T (2003).** Utilisation of marine by-products. *Electronic journal of environmental, agricultural and food chemistry*, **2** (4): 458-463.

S

- Salehi M, Aghamaali MR, Sajedi RH, Asghari SM, Jorjani E (2017).** Purification and characterization of a milk-clotting aspartic protease from *Withania coagulans* fruit. *International Journal of Biology Macromolar*, **98**: 847-854.
- Sanchez-Chiang L, Ponce O (1981).** Gastric zymogens and gastrisins from *Merluccaius gayi*- Purufication and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **68B**: 251-257.
- Sandhya C, Sumantha A, Pandey A (2004).** Proteases. In: *Enzyme Technology*, A. Pandey, C. Webb, C.R. Soccol, C. Larroche (Eds.), *Asiatech Publishers Inc.*, New Delhi, (India), 312–325.
- Saranya RJ, Jayaprya JA, Tamil Selvi A (2018).** Purification, characterization, molecular modeling and docking study of fish waste protease. *Int J Biol Macromol*, **118** (Pt A): 569-583.
- Selmane D (2010).** *Etude de l'extraction des protéines de coproduits d'abattage et de leur valorisation comme ingrédients fonctionnels*. Thèse de doctorat en Alimentation et Nutrition. Blaise Pascal, Clermont- Ferrand, 154 p.
- Serna F, Lagneau J, Carpentier JM (2014).** La diffraction des rayons X : une technique puissante pour résoudre certains problèmes industriels et technologiques. *Chimie nouvelle*, **116** : 1-11.
- Shahidi F, Kamil YVAJ (2001).** Enzymes from fish and aquatics invertebrates and their application in the food industry. *Trends food sci. Technol.*, **12**: 435-464.
- Sheehan D (2009).** *Physical biochemistry: principles and application*. 2ème Ed John Wiley and Sons, 407 p.
- Shieh C-J, Thi Phan L, Shih I-L (2009).** Milk clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. *Biochemical Engineering Journal*, **43**: 85-91.
- Sholeh MM, Ambarsari L, Nurcholis W, Nurhayati T (2019).** Characterization of ammonium sulphate fraction of pepsin from fish stomach. *Earth and Environmental Science*, **404**: 1-6.
- Sidikou I D, Remy B, Hornick J L, Losson B, Yenikoye A, Beckers J F (2005).** Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastrointestinales. *Annales de Médecine Vétérinaire*, **149**: 213-228.
- Sila A, Nasri R, Jridi M, Balti R, Nasri M, Bougatef A (2012).** Characterisation of trypsin purified from the viscera of Tunisian barbel (*Barbus callensis*) and its application for recovery of carotenoproteins from shrimp wastes. *Food Chemistry*, **132**: 1287-1295.
- Simpson B K (2000).** Digestive proteases from marines animals. In N. F. Haard, & B. K. Simpson (Eds), *Seafood enzymes*. New York, NY : Marcel Dakker, Inc, 191-213.

**Souaré M. L, Traoré L, Sidimé Y, Sidibé M, & Sangaré A (2017).** Utilisation de la pepsine de chinchard (*trachurus mediterraneus*) dans la fabrication d'un fromage frais. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, **44**, 64-69.

**Sumantha A, Larroche C, Pandey A (2006).** Microbiology and industrial biotechnology of food- grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, **44** (2): 211-220.

**Sylla KSB (2011).** *Valorisation de coproduits de la sole tropicale (Cynoglossus senegalensis) par hydrolyse enzymatique : Application en nutrition avicole.* Thèse de doctorat en Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, Bretagne sud, 80 p.

## T

**Taghizadeh Andevari G, Rezaei M, Tabarsa M, Rustad T (2019).** Extraction, partial purification and characterization of alkaline protease from rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) viscera, *Aquaculture*, **500**: 458-463.

**Talantikite K S (2015).** *Purification et caractérisation d'une enzyme coagulante d'origine microbienne pour application en fromagerie.* Thèse de Doctorat en génie alimentaire et biotechnologie, Université M'Hamed Bougara- Boumerdes, 217 p.

**Tanji M, Yakabe E, Kageyama T, Yokobori S, Ichinose M, Miki K, Ito H, Takahashi K (2007).** Purification and characterization of pepsinogens from the gastric mucosa of African coelacanth, *Latimeria chalumnae*, and properties of the major pepsins, *Comparative Biochemistry Physiology part B Biochemistry Molecular Biology*, **146**: 412-420.

**Tchilabalo Dilezitoko A (2013).** *Un ensemble d'outils protéomiques pour la caractérisation de protéines d'organismes très divers : Plantes, Champignons et Parasites.* Thèse de Doctorat en Chimie Analytique, Université de Strasbourg, 309 p.

**Troeberg L, Nagase H (2003).** Zymography of metalloproteinases. *Current Protocols in Protein Science*, Ed John Wiley and Sons, Inc., 21.15.1-21.15.12.

## V

**Valin C (1967).** Isolement d'une fraction protéique a activité protéolytique du muscle de bovin. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*. **7** (4): 475-483.

**Vega-Villasante F, Nolasco H, Civera R (1995).** The digestive enzymes of the Pacific brown shrimp *Penaeus californiensis*—II. Properties of protease activity in the whole digestive tract. *Biochemistry and Molecular Biology*, **112B**: 123-129.

**Vialaret J (2019).** *Développement et validation de méthodes de protéomique innovantes pour des applications de biochimie clinique.* Thèse de doctorat en sciences agricoles, Montpellier, France, 163p.

**Victor Dos Santos C W, Da Costa Marques M E, De Araujo Tenorio H, De Miranda E C, Vieira Pereira HJ (2016).** Purification and characterization of trypsin from *Luphiosilurus alexandri* pyloric cecum, *Biochemistry and Biophysics Reports*, **8**: 29-33.

**Villanueva-Gutiérrez E, Maldonado-Othón CA, Perez-Velazquez M, González-Félix ML (2020).** Activity and Partial Characterization of Trypsin, Chymotrypsin, and Lipase in the Digestive Tract of *Totoaba macdonaldi*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **29**: 322-334.

**Voet D, Voet J G, Rousseau G (2005).** *Biochimie*. 2ème Ed De Boeck Université, Bruxelles, 1600 p.

## W

**Walker J M (2002).** *The protein protocols handbook*. 2ème Ed Humana Press (USA), 1146 p.

**Walsh G (2014).** *Proteins: biochemistry and biotechnology*. 2ème Ed John Wiley and Sons, England, 447 p.

**Wang P A, Stenvik J, Larsen R, Maehr H, Olsen R L (2007).** Cathepsin D from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) liver. Isolation and comparative studies. *Comparative Biochemistry Physiology par B Biochemistry Molecular Biology*, **147**: 504-511.

**Wehrle K, Crowe N, Boeijen I, Arendt E K (1999).** Screening methods for the proteolytic breakdown of gluten by lactic acid bacteria and enzyme preparations. *European Food Research Technolog*, **209** : 428-433.

**Whitehead, P.J., FAO 1985.** *Species catalogue, Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei)*. An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolfherrings. Part 1, Chirocentridae, Clupeidae and Pristigasteridae, **125** :1–303.

**Wilkesman J, Kurz L (2009).** Protease Analysis by Zymography: A review on techniques and patents. *Recent Patents on Biotechnology*, **3**: 175-184.

**Wilkesman J, Kurz L (2012).** Advances in zymography techniques and patents regarding protease analysis. *Recent patents on biotechnology*, **6** (2) : 106-114.

**Wilkesman J, Kurz L (2017).** Cysteine protease zymography: brief review. In *Zymography*. Walker. J, Humana Press, Second Edition, New York, NY, 310 p.

**Wilson K, Walker J, (2010).** *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (7th ed.). Cambridge, Cambridge University Press, 730 p.

## Υ

**Yan S J, Blomme E A G (2003)**. In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections. *Veterinary pathology*, **40** (3): 227-236.

## Z

**Zamani A, Rezaei M, Madani R, Habibi Rezaie M (2014)**. Trypsin Enzyme from Viscera of Common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*): Purification, Characterization, and Its Compatibility with Oxidants and Surfactants, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **23**: 237-252.

**Zamora-Sillero J, Tavares Küttler M, Borges Tesser M, Monserrat JM, Prentice C (2019)**. Effect of dietary common carp by-product protein hydrolysates on antioxidant status in different organs of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture Nutrition*, **25**: 110-118.

**Zefirova O N, Mamaeva A V, Chupov VV, Valuev L I, Plate NA (1996)**. Synthesis and properties of immobilized collagenolytic *Paralithoides camtschatica*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **32**: 461-464.

**Zhao L, M Budge S, E Ghaly A, S Brooks M (2011)**. Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *Journal of Food Processing & Technology*, **2** (6): 1-14.

**Zhoa, M, Vandersluis M, Stout J, Haupts U, Sanders M, Jacquemart R (2018)**. Affinity chromatography for vaccines manufacturing: Finally ready for prime time ?, *Vaccine*, **37**: 5491-5503.

## Résumé

Ce travail est une contribution à la recherche et l'identification d'une activité protéolytique digestive à intérêt industriel chez la sardine commune « *Sardina Pilchardus* ». C'est une espèce de poisson pélagique très répandue dans toute la Méditerranée notamment en Algérie avec un grand intérêt économique et sociale.

L'activité protéolytique est le résultat d'une coupure de liaison peptidique suite la présence d'une protéase. Cependant, les protéases digestives des viscères de poisson ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs propriétés uniques et intéressantes qui sont très appréciées dans un large éventail d'applications et de procédés industriels. Les protéases les plus importantes des viscères de poisson sont les enzymes gastriques acides (pepsine, chymosine, gastriscine et cathepsine D) et les enzymes intestinales alcalines (trypsine, chymotrypsine, collagénase et l'élastase) qui peuvent être extraites et purifiées par différentes méthodes chromatographiques toute en évaluant l'activité protéolytique par les méthodes de dosage sur divers substrats protéiques. La caractérisation de ces protéases par les méthodes de protéomique innovantes est nécessaire pour permettre une étude de leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

**Mots clés :** Sardine bleue (*Sardina Pilchardus*), protéases digestives, activité protéolytique, viscères, système digestive, valorisation, purification, caractérisation.

## Abstract

This work is a contribution to the research and identification of a digestive proteolytic activity of industrial interest in the common sardine "*Sardina Pilchardus*". It is a species of pelagic fish that is widely distributed throughout the Mediterranean, particularly in Algeria, and is of great economic and social interest.

The proteolytic activity is the result of a cut in the peptic bond following the presence of a protease. However, the digestive proteases of fish viscera have aroused growing interest due to their unique and interesting properties which are highly appreciated in a wide range of applications and industrial processes. The most important proteases in fish viscera are acidic gastric enzymes (pepsin, chymosin, gastriscin and cathepsin D) and alkaline intestinal enzymes (trypsin, chymotrypsin, collagenase and elastase) which can be extracted and purified by different chromatographic methods while evaluating the proteolytic activity by assay methods on various protein substrates. The characterization of these proteases by innovative proteomics methods is necessary to allow a study of their structural and functional properties.

**Keywords:** Sardine blue (*Sardina Pilchardus*), digestive proteases, proteolytic activity, viscera, digestive system, valorisation, purification, characterization.

## ملخص :

هذا العمل هو مساهمة في البحث وتحديد النشاط الهضمي للبروتينات الهضمية ذات الأهمية الصناعية في السردين المشترك "*Sardina Pilchardus*" هو نوع من أسماك السطح يستخدم على نطاق واسع في جميع أنحاء البحر الأبيض المتوسط ، وخاصة في الجزائر ، وله اهتمام اقتصادي واجتماعي كبير.

النشاط التحليلي للبروتين هو نتيجة انشقاق الرابطة الهضمية بعد وجود البروتياز. ومع ذلك ، فإن البروتياز الهضمي من أحشاء الأسماك قد حظيت باهتمام متزايد بسبب خصائصها الفريدة والقيمة التي تحظى بتقدير كبير في مجموعة واسعة من التطبيقات والعمليات الصناعية. أهم البروتياز في أحشاء الأسماك هي الإنزيمات المعوية الحمضية (الببسين ، الكيموسين ، gastriscine والكاتيبسين د) والإنزيمات المعوية القلوية (التربسين ، الكيموتربسين ، الكولاجيناز والإيلاستاز) والتي يمكن استخلاصها وتنقيتها بطرق كروماتوغرافية مختلفة. أثناء تقييم النشاط التحليلي للبروتين بطرق الفحص على ركائز البروتين المختلفة. إن توصيف هذه البروتياز بطريقة (protéomique) المبتكرة ضروري للسماح بدراسة خصائصها الهيكلية والوظيفية

## الكلمات المفتاحية :

السردين الأزرق (*Sardina Pilchardus*)، البروتياز الهضمي ، النشاط البروتيني ، الأحشاء ، الجهاز الهضمي ، التثمين ، توصيف ، تنقية.