

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE



INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES

AGRO-ALIMENTAIRES (I.N.A.T.A.A.)

DEPARTEMENT DE TECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

En Sciences Alimentaires

Option : Technologie Alimentaire

**Hydrolyse enzymatique des caséines bovines par la ficine
et les cardosines en vue d'obtenir des peptides
antimicrobiens**

présenté par:

Mme. LEULMI Imene

Soutenu devant le Jury composé de :

Président : BOUDJELLAL A. Professeur. I.N.A.T.A.A. U.F.M.C

Promoteur : ZIDOUNE M. N. Professeur. I.N.A.T.A.A. U.F.M.C

Examineurs: BENATALLAH L. M.C/A. I.N.A.T.A.A. U.F.M.C

OULAMARA H. Professeur. I.N.A.T.A.A. U.F.M.C

Année universitaire 2015-2016

Remerciement

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, le Tout Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de magister.

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Recherche de nutrition et technologie alimentaire (LNTA) INATAA, Université des frères Mentouri Constantine

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon promoteur Monsieur ZIDOUNE M N, Il m'a appris à développer un œil critique sur mes résultats. Avec lui, j'ai développé mon esprit scientifique et j'ai pu apprendre à trouver des solutions devant les obstacles que l'on peut rencontrer en recherche. Puisse ce travail vous exprime ma vive gratitude et mon grand estime.

Mes vifs remerciements vont aux membres du jury:

Monsieur A. BOUDJELLAL directeur et Professeur à l'INATAA, qui me fait l'honneur et l'immense plaisir de présider le jury de soutenance. Ainsi que, Mm. BENATALLAH L. et Mm. OULAMARA H. d'avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver, ici l'expression de ma reconnaissance et mon respect.

Je voudrais exprimer mon sincère remerciement et reconnaissance à Madame ADOUI FAIZA qui m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail par son suivi et ses conseils pertinents.

Je voudrais exprimer également mon sincère remerciement à Madame BECILA Samira Maître de Conférences à l'INATAA d'avoir m'accepter au sein de laboratoire de viande MAQUAV pour faire les analyses électrophorétiques.

Je tiens à remercier sincèrement mes chères collègues à savoir: Kahina HAFID, Hanene SAADI, Imane LAZZOUNI, Amel BOULLLOUF et Sameh DJEBILI pour leur aide précieuse, leurs conseils qu'ils m'ont toujours offerts. Qu'ils trouvent ici l'assurance de ma reconnaissance et mes remerciements les plus distingués.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation tout au long de mes études. Je voudrais adresser mes remerciements au personnel des laboratoires pédagogiques de l'I.N.A.T.A.A.

Merci à ma famille qui m'a toujours appuyée malgré qu'elle n'y comprenne rien. À leur soutien envers mes travaux, Merci à mon mari CHAREB Abd El. Hamid qui est là pour m'encourager malgré toutes mes obligations. Merci de comprendre mes moments de panique. Quand je pense que je n'y arriverai pas.

SOMMAIRE

Sommaire

■ Liste des abréviations.....	i
■ Liste des figures.....	ii
■ Liste des tableaux.....	iii

Introduction	1
--------------------	---

■ *Partie 01 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE*

I. Peptides antimicrobiens.....	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. Structure des peptides antimicrobiens	4
I.2.1. Peptides linéaires	4
I.2.1.1. Peptides structurés en hélice α	4
I.2.1.2. Peptides non structurés	4
I.2.2. Peptides non linéaires	5
I.3. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens	6
I.3.1. Les peptides formant des pores membranaires	7
I.3.1.1. Le mode d'action en tapis	8
I.3.1.2. Le mode d'action des pores en douves de tonneau	8
I.3.1.3. Le mode d'action par formation de pores toroïdaux	9
I.3.2. Les peptides interférant avec le métabolisme cellulaire de la bactérie	9
II. Production des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique	10
II.1. Généralités	10
II.2. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique des caséines.....	11
II.2.1. Généralités sur les caséines bovines	11
II.2.1.1. Caséine α_{S1}	12
II.2.1.2. Caséine α_{S2}	12
II.2.1.3. Caséine β	13
II.2.1.4. Caséine κ	13
II.2.2. Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse des caséines	14
III. Protéases utilisées pour la production de peptides antimicrobiens.....	15
III.1. Aperçu général sur l'utilisation des protéases végétales pour la production des peptides actifs	16
III.2. Cas de la ficine.....	18

III.2.1. Généralités sur le figuier	18
III.2.1.1. Position systématique du figuier	18
III.2.1.2. Origine et répartition géographique	19
III.2.1.3. Caractéristiques botaniques de figuier	19
III.2.2. Localisation du système enzymatique dans le végétal.....	20
III.2.3. Caractéristiques de la ficine	21
III.2.4. Mécanisme et spécificité d'action de la ficine	22
III.3. Cas de l'extrait des fleurs de cardon	22
III.3.1. Généralités sur <i>Cynara cardunculus</i>	22
III.3.2.1. Position systématique.....	23
III.3.1.1. Origine géographique.....	23
III.3.3. Caractéristiques botaniques de cardon.....	23
III.3.4. Localisation du système enzymatique dans le végétal.....	24
III.3.5. Caractéristiques du système enzymatique.....	25
III.3.6. Mécanisme et spécificité d'action du système enzymatique.....	25

Partie 02 : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel biologique	27
I.1. Caséine	27
I.2. Poudre de lait	27
I.3. Matériel enzymatique.....	28
1.3.1. Extrait enzymatique de la Ficine	28
1.3.2. Extrait enzymatique des fleurs de cardon.....	29
1.3.2.1. Récolte et conservation des fleurs de cardon	29
1.3.2.2. Extraction du système enzymatique	29
II. METHODES D'ANALYSE	30
II.1. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques.....	30
II.1.1. Mesure de la teneur en matière sèche.....	30
II.1.2. Mesure du pH.....	31
II.1.3. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques	31
II.2. Mesure des activités enzymatiques des extraits.....	32
II.2.1. Evaluation de l'activité coagulante	32
II.2.2. Détermination de l'activité protéolytique	33
II.3. profil électrophorétique des extraits enzymatiques.....	36

II.4. CONDUITE DE LA PROTEOLYSE	38
II.5. CARACTÉRISATION DES HYDROLYSATS OBTENUS.....	39
II.5.1. Evaluation quantitative de l'hydrolyse par la méthode de l'orthophtaldialdéhyde (OPA).....	39
II.5.2. Evaluation qualitative de l'hydrolyse par électrophorèse	40
III. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des hydrolysats des caséines bovines ...	40

Partie 03 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS ENZYMATIQUES BRUTS	43
I.1. Caractéristiques de l'extrait brut de la ficine	43
I.2. Caractéristiques de l'extrait brut des fleurs de cardon	44
I.3. Caractéristiques des activités enzymatiques des extraits.....	45
I.4. Profil électrophorétique des extraits enzymatiques	47
II. Caractéristiques générales des hydrolysats des caséines bovines obtenus.....	49
II.1. Suivi quantitatif du degré d'hydrolyse par la méthode d'OPA	49
II.1.1. Hydrolyse par la ficine	49
II.1.2. Hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon	50
II.2. Profils moléculaires électrophorétique des peptides obtenus.....	52
II. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des hydrolysats des caséines bovines	57
Conclusion et perspectives	65
Références bibliographiques.....	68
Annexes	IV
Résumé	

LISTE DES
ILLUSTRATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

AMPs : Peptides antimicrobiens

ATCC: American type culture collection

BSA: Bovine Serum Albumin.

CMP: caséinomacropeptide

CN: caséine

GMP: glycomacropeptide

Da, KDa: Dalton, Kilo Dalton

E.C. Enzyme Commission

E/S : Ratio enzyme/substrat

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetate.

MH : Müller- Hinton

MT : marqueurs de taille

OPA : Ortho Phtaldi Aldehyde

PAM : Peptides Anti Microbiens

pH : potentiel d'Hydrogène

TCA: Tri Chloroacetic Acid

SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine

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

UAC : Unité D'activité Coagulante

UP : Unité Présure

Codes utilisés pour désigner les acides aminés

Acide aspartique	D	Asp	Acide glutamique	E	Glu
Alanine	A	Ala	Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn	Cystéine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln	Glycine	G	Gly
Histidine	H	His	Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu	Lysine	K	Lys

Méthionine	M	Met	Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro	Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr	Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr	Valine	V	Val

LISTE DES FIGURES

Partie étude bibliographique		Page
Figure 1	Structures tertiaires de peptides antimicrobiens	6
Figure 2	Mécanisme d'attraction	7
Figure 3	Modèles décrivant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique par les peptides antimicrobiens	8
Figure 4	Mode d'action intracellulaire des PAM	9
Figure 5	Photo d'un figuier (<i>Ficus carica L</i>)	20
Figure 6	Diagramme schématique d'une fleur de cardon	24
Partie matériel et méthodes		
Figure 1	Collecte du latex	28
Figure 2	Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine	28
Figure 3	Capitule et fleurs de cardon utilisés	29
Figure 4	Diagramme d'extraction de l'extrait brut des fleurs du cardon	30
Figure 5	protocole opératoire pour le dosage de l'activité protéolytique	35
Figure 6	Réaction de l'orthophtaldialdéhyde (OPA) avec les groupements amines	39
Figure 7	Représentation schématique de protocole de l'activité antibactérienne	42
Partie résultats et discussion		
Figure 1	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des extraits enzymatiques	48
Figure 2	Cinétiques d'hydrolyse de caséine avec l'extrait enzymatique brut de la ficine (E/S : 1/100, 1/500 et 1/750, 1/1000).	50
Figure 3	Cinétiques d'hydrolyse de caséine avec l'extrait enzymatique des fleurs de cardon (E/S : 1/100, 1/50 et 1/10).	51
Figure 4	Comparaison des cinétiques de l'hydrolyse avec la ficine et la cardosine à un ratio 1/100	52
Figure 5	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la ficine (E/S : 1/100)	53
Figure 6	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la ficine (E/S : 1/1000)	54
Figure 7	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon (E/S : 1/100)	55
Figure 8	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon (E/S : 1/50)	56
Figure 9	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique	56

d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon (E/S :
1/10)

Figure 10 Photos des résultats de l'activité antibactérienne des hydrolysats de la ficine. **59**

Figure 11 Photos des résultats de l'activité antibactérienne des hydrolysats de la cardosine **61**

LISTE DES TABLEAUX

	Partie étude bibliographique	page
Tableau 1	Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens	5
Tableau 2	Caractéristiques de constituants majeures des caséines bovines	12
Tableau 3	Spécificité d'action de cardosine A et cardosine B de <i>Cynara cardunculus</i> sur les caséines bovine, caprine et ovine	26
	Partie matériel et méthodes	
Tableau 1	Composition des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE)	37
	Partie résultats et discussion	
Tableau 1	Caractéristique de l'extrait brut du latex de <i>Ficus carica</i>	43
Tableau 2	Caractéristiques de l'extrait obtenu à partir de 10g de fleurs sèches de cardon.	44
Tableau 3	Activités enzymatiques des extraits bruts de la ficine et de fleurs de cardon	45
Tableau 4	Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par la ficine E/S : 1/100	58
Tableau 5	Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ration E/S : 1/10	59
Tableau 6	Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ration E/S : 1/50	60
Tableau 7	Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ration E/S : 1/100	60

INTRODUCTION

Jusqu'à présent, l'utilisation de conservateurs de synthèse constituait l'approche traditionnelle pour limiter les altérations alimentaires d'origine microbienne ainsi que de lutter contre les pathogènes conventionnels et émergents (MULTON, 2002). Toutefois, l'augmentation des empoisonnements alimentaires associés à la présence de bactéries pathogènes dans les aliments, combinée à la controverse entourant l'utilisation d'agents antimicrobiens traditionnels et l'aversion du consommateur envers les additifs alimentaires, justifient la mise au point de nouveaux agents antimicrobiens de source naturelle.

En outre, l'apparition des phénomènes de résistance aux antibiotiques observés chez de nombreuses souches de bactéries a grandement contribué à élargir la nécessité d'utiliser dans des délais relativement serrés de nouvelles alternatives, pour des fins thérapeutique et alimentaire, cela a permis de mettre en lumière plusieurs alternatives crédibles comme l'utilisation de bactériophages, de bactériocines et de peptides antimicrobiens, ces derniers représentent une des solutions les plus prometteuses (PARISIEN *et al.*, 2008).

De nombreux peptides antimicrobiens (PAMs) issus de différentes espèces ont été découverts. A ce jour, 2604 peptides (dont 261 bactériocines, 321 peptides d'origine végétale et 1957 d'origine animale) ont été identifiés et enregistrés dans la base de données des peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Parmi ces peptides figurent ceux issus d'hydrolyse enzymatique de protéines alimentaires. En effet, plusieurs études ont montré les propriétés antimicrobiennes de certaines protéines alimentaires (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine, poissons...) ainsi que la possibilité de générer des peptides actifs par hydrolyse enzymatique de protéines, *in vivo* ou bien *in vitro* (BELLAMY *et al.*, 1992 ; KITTS et WEILER, 2003 ; PELLEGRINI, 2003).

Les protéines laitières sont une source particulièrement bien dotée en de tels peptides, plusieurs études ont démontré que certains peptides issus des protéines laitières, dont les caséines, les protéines de lactosérum, possédaient des propriétés antimicrobiennes (PIHLANTO-LEPPALA *et al.*, 1999; EXPOSITO et RECIO, 2006, BENKERROUM, 2010). Certains peptides issus des caséines, sont reconnus pour leur activité antimicrobienne avec un spectre d'action encore plus large. LAHOV *et al.*, (1971), étaient les premiers à identifier un polypeptide de haut poids moléculaire et de caractère basique nommé casécidine après traitement du lait acidifié par la présure. Depuis, plusieurs peptides issus des différentes

fractions de la caséine de différentes espèces ont été séparés (HILL *et al.*, 1974 ; RECIO et VISSER, 1999 ; MALKOSKI *et al.*, 2001 ; BARANYI *et al.*, 2003; MINERVINI *et al.*, 2003 ; MC CANN *et al.*, 2006 ; ADOUI, 2014). La présence naturelle de peptides bioactifs, dont ceux à activité antimicrobienne, a été, également, mise en évidence, dans des produits laitiers traditionnels comme les fromages (SAITO *et al.*, 2000 ; RIZZELLO *et al.*, 2005 ; BÜETIKOFER *et al.*, 2007). Ces peptides actifs sont libérés durant la protéolyse accompagnant l'affinage des fromages où interviennent les enzymes coagulantes avec celles d'origine microbienne.

Si la majorité de ces PAMs ont été générés à partir de l'hydrolyse des protéines par des enzymes digestives. L'hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales pour générer des peptides antimicrobiens ne semble pas avoir fait d'objet d'étude. Plusieurs plantes ont été utilisées pour isoler des enzymes protéolytiques. Celles-ci deviennent de plus en plus intéressantes (HOGAN, ZHANG, LI, WANG, et ZHOU, 2009).

Dans ce contexte la question qui a motivé notre démarche est : « Peut-on générés à partir de l'hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales des peptides antimicrobiens ».

Des travaux ont été déjà menés par l'Equipe de Transformation et Elaboration des Produits Agro-alimentaires (T.E.P.A.) et qui ont porté sur l'utilisation des protéases végétales extraites à partir des fleurs de cardon (ZIKIOU, 2013) et du latex de figuier (SIAR, 2014) pour la fabrication des fromages. Ces extraits sont employés pour la fabrication de certains fromages traditionnels Algériens. Vue l'importance de ces deux enzymes, nous avons jugé intéressant d'entreprendre une suite de recherches en exploitant leur emploi dans la protéolyse des caséines bovines en vue d'obtenir des peptides ayant un effet antimicrobiens.

Notre objectif consiste à évaluer l'activité antimicrobienne des hydrolysats des caséines bovines générés sous l'action des protéases extraites à partir des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus L*) et du latex de figuier (*Ficus carica L*). Ainsi, notre travail porte sur :

- Extraction et caractérisation des systèmes enzymatiques obtenus à partir des fleurs séchées du cardon et du latex de figuier;
- Hydrolyse de la caséine bovine par les deux extraits enzymatiques ;
- Caractérisation partielle des hydrolysats obtenus avec les deux extraits enzymatiques ;
- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des hydrolysats obtenus.

Partie 01:

ETUDE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. PEPTIDES ANTIMICROBIENS

I.1. Généralités

Lors de ces dernières décennies, une diminution progressive de l'efficacité d'un grand nombre d'antibiotiques qui avaient été jusqu'alors utilisés avec succès contre plusieurs types d'infections bactériennes a été observée. L'accumulation rapide de mutations par les bactéries et l'utilisation continue et parfois inadéquate des antibiotiques ont abouti à l'émergence croissante de souches multirésistantes à l'échelle mondiale. Le développement de nouvelles classes d'agents antimicrobiens est donc devenu impératif (SILVA *et al.*, 2013).

Les Peptides antimicrobiens (PAMs) semblent être d'excellents candidats pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens (MARSHALL et ARENAS, 2003). Ils peuvent notamment servir de schéma de base pour le développement de nouveaux composés anti-infectieux, par des modifications physico-chimiques afin d'optimiser leurs performances (JORGE *et al.*, 2012).

Les PAMs se repartissent en deux catégories : ceux synthétisés par voie non ribosomale, et ceux dit naturels obtenus par synthèse ribosomale (HANCOCK et CHAPPLE 1999).

Les PAMs obtenus par synthèse ribosomale sont issus de différents organismes (mammifères, plantes, insectes, amphibiens et bactéries). Chez les organismes multicellulaires, ces peptides assurent la première ligne de défense de l'organisme, contre les agents pathogènes, où ils font partie intégrante du système immunitaire inné (BULET *et al.*, 2004 ; SCHRÖDER et HARDER, 2006 ; WIESNER et VILCINSKAS, 2010).

Ces peptides sont synthétisés soit, par voie métabolique : les peptides sont synthétisés, stockés et libérés lors d'une agression de l'organisme par un pathogène (MARSHALL et ARENAS, 2003 ; BROGDEN *et al.*, 2003). Soit par l'utilisation de certaines protéines présentes dans l'organisme. Ces protéines inactives à l'état natif, génèrent des peptides antimicrobiens après hydrolyse par des enzymes protéolytiques (COWLAND *et al.*, 1995 ; ZANETTI *et al.*, 1995 ; LAI et GALLO, 2009).

La taille des PAMs varie significativement allant de 9 à une centaine d'acides aminés. Cependant, ils possèdent tous des caractéristiques communes qui sont (WANG, 2013). :

1. Une large proportion d'acides aminés hydrophobes de 31 à 70% ;

2. Un nombre important de résidus arginine et/ou lysine dans leur séquence, leur permettant d'acquérir une charge nette positive (comprise entre 0 et +7) et donc d'interagir avec les membranes des bactéries ;
3. La capacité d'adopter une conformation amphiphile en présence de membranes.

I.2. Structure des peptides antimicrobiens

Du fait de la grande diversité de ces composés, il est difficile de les classer, mais ils peuvent cependant être repartis en deux familles en fonction de leur structure secondaire ; la première regroupe les peptides linéaires, et la seconde, regroupe l'ensemble des peptides non linéaires comportant un ou plusieurs ponts disulfures (TOKE, 2005 ; DUBOIS-DELVAL, 2006).

I.2.1. Peptides linéaires

La famille des peptides linéaires est la plus représentée au sein des peptides cationiques à caractères amphiphiles. Ces derniers regroupent un vaste ensemble de peptides (plus de 500 peptides antimicrobiens identifiés) uniquement lévogyre, comportant en moyenne une séquence de 20 à 50 acides aminés et ont des propriétés amphiphiles et un caractère cationique (ANDRES et DIMARCQ, 2007).

Selon l'adoption ou non d'une structure en hélice α , on a d'un côté des peptides linéaires formant des hélices et de l'autre des peptides non structurés (figure 1) (HAILESLASSIE *et al.*, 1999).

I.2.1.1. Peptides structurés en hélice α

Parmi les peptides cationiques linéaires, les cécropines (4 kDa) et les magainines (2kDa) sont les plus représentatifs de ceux qui adoptent la structure en hélice α . Ces peptides ont la particularité d'induire une perméabilité membranaire par un effet de type détergent qui peut être accompagné de la formation de pores. Cette particularité facilite leur pénétration à travers la membrane bactérienne (KITTS et WIELER, 2003 ; ANDRES et DIMARCQ, 2007).

I.2.1.2. Peptides non structurés

Ces peptides n'adoptent pas de structure secondaire en hélice α ou en feuillet β . Par contre, ils possèdent une séquence d'acides aminés plus particulière. En effet, ils contiennent un pourcentage élevé en certains acides aminés tels que :

- ⊗ Histidine dans les histatines retrouvées dans la salive humaine.
- ⊗ Tryptophane dans les indolicidines de bovin et les triterplices.
- ⊗ Proline et glycine dans de nombreux peptides d'insectes.
- ⊗ Proline et phénylalanine dans les prophénines.

Au contact de la membrane bactérienne, ils s'organisent en coude avec une répartition des résidus hydrophile/hydrophobe sur leur surface, et induisent la perméabilité de la membrane sans que celle-ci soit détruite (DUBOIS-DELVAL, 2006 ; ANDRES et DIMARCQ, 2007).

I.2.2. Peptides non linéaires

La famille des peptides non linéaires est caractérisée par la richesse de leur séquence en cystéines formant des ponts disulfures. En effet, l'élément de base de ces molécules comporte une hélice α et des feuillets β qui sont stabilisés par des ponts disulfures. Cette famille peut être encore répartie en trois classes en fonction du nombre des ponts disulfures que contiennent les peptides (TOKE, 2005 ; ANDRES et DIMARCQ, 2007).

La première classe correspond aux peptides ayant un ou deux ponts disulfures comme la protegrine (TOKE, 2005). La deuxième revient aux peptides contenant trois ou quatre ponts disulfures formant un cycle ouvert comme les défensines. La dernière classe regroupe les peptides cycliques (IZADPANA et GALLO, 2005).

La perte de ces ponts disulfures que minime soit-ils entraînent une perte partielle ou totale de l'activité antimicrobienne (PELLEGRINI *et al.*, 1999 ; FAZIO *et al.*, 2006).

Tableau 1 : Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens Base de données des peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>)

Structure	Nombre de peptides	Pourcentage
Peptide à structure en hélice α	332	14,06
Peptide à structure β	99	4,19
Peptide à structure mixte α et β	87	3,76
Structure peu commune	9	0,38
Peptide riche en un AA peu commun	82	3,47
Peptide à pont disulfure	385	16,3
Structure inconnue	1352	57,26

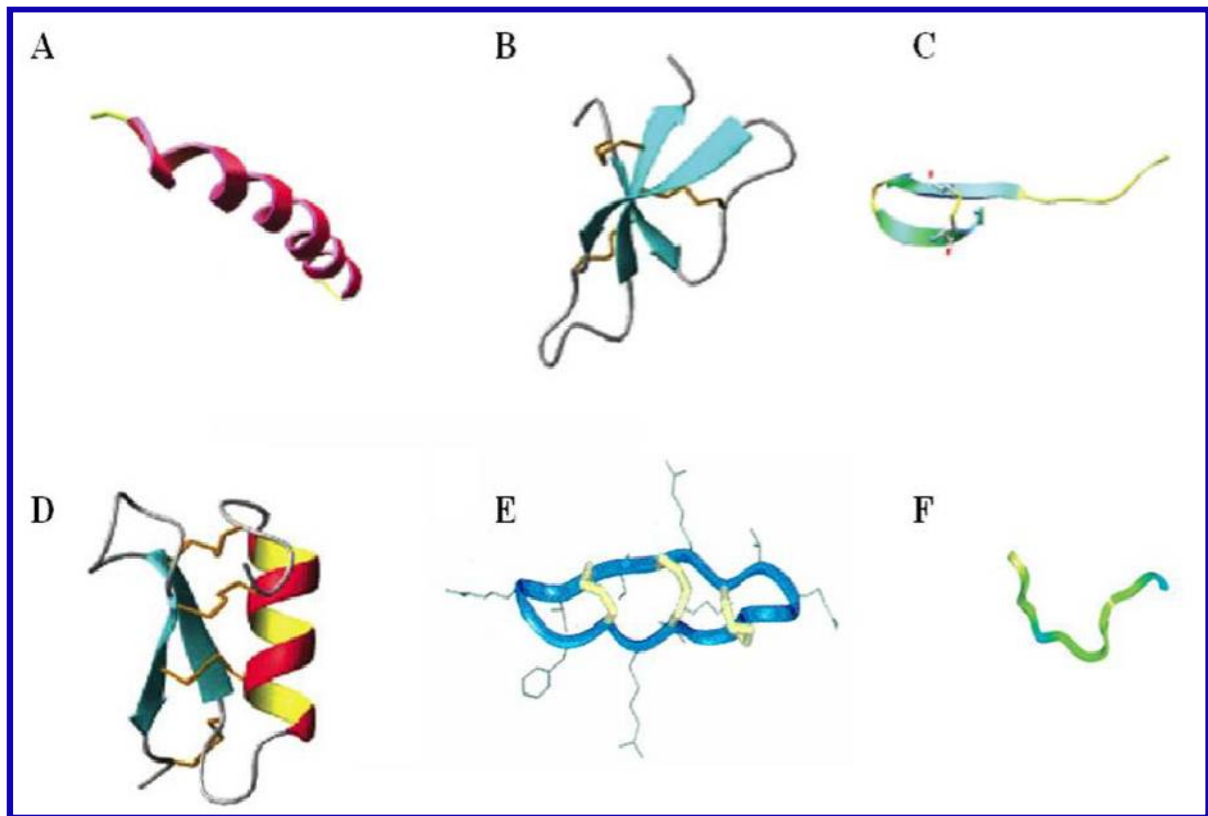


Figure 1 : Structures tertiaires des peptides antimicrobiens (d'après BULET *et al.*, 2004; HANCOCK et SAHL, 2006; TANG *et al.*, 1999). Structure en hélice α (A), structure en feuillet β (B), structure en épingle à cheveux (C), structure mixte en hélice α et en feuillet β (D), structure cyclique (E), structure désorganisée (F). Les ponts disulfures sont représentés en jaune.

I.3. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens

Les mécanismes d'action antimicrobienne des PAM ont fait l'objet d'importantes études lors de ces trois dernières décennies (CONDE *et al.*, 2012). Malgré l'importance du travail réalisé dans le domaine, les aspects de l'interaction PAM-bactérie létaux pour la cellule ne sont pas encore clairement établis. Cependant, des preuves convaincantes suggèrent que de nombreux PAM fonctionnent en se liant à la surface des membranes et en perturbant l'organisation des lipides de manière non spécifique (CONDE *et al.*, 2012).

Il existe 2 types d'action de peptides antimicrobiens : les peptides formant des pores membranaires et les peptides interférant avec le métabolisme cellulaire de la bactérie. Les cibles intracellulaires des PAM sont également associées à la mort de la bactérie (WIMLEY et HRISTOVA, 2011). De nombreuses techniques sont utilisées afin de comprendre le mécanisme responsable de l'activité antimicrobienne des peptides, parmi lesquelles la

microscopie, l'utilisation de membranes modèles, la formation de canaux ioniques, etc. (BROGDEN 2005).

I.3.1. Peptides formant des pores membranaires

Trois étapes ont été identifiées lors de la formation de pore : l'attraction, l'attachement et l'insertion peptidique entraînant la perméabilité membranaire.

◆ L'attraction

L'attraction est la première étape sans laquelle l'action antimicrobienne d'un peptide ne pourrait avoir lieu. La plupart des peptides antimicrobiens étant cationiques, les interactions électrostatiques se font avec les groupements phosphates des lipopolysaccharide (LPS) ou les phospholipides de la membrane des bactéries Gram négatives, ou avec l'acide téichoïque des bactéries Gram positives (HUANG 2000).

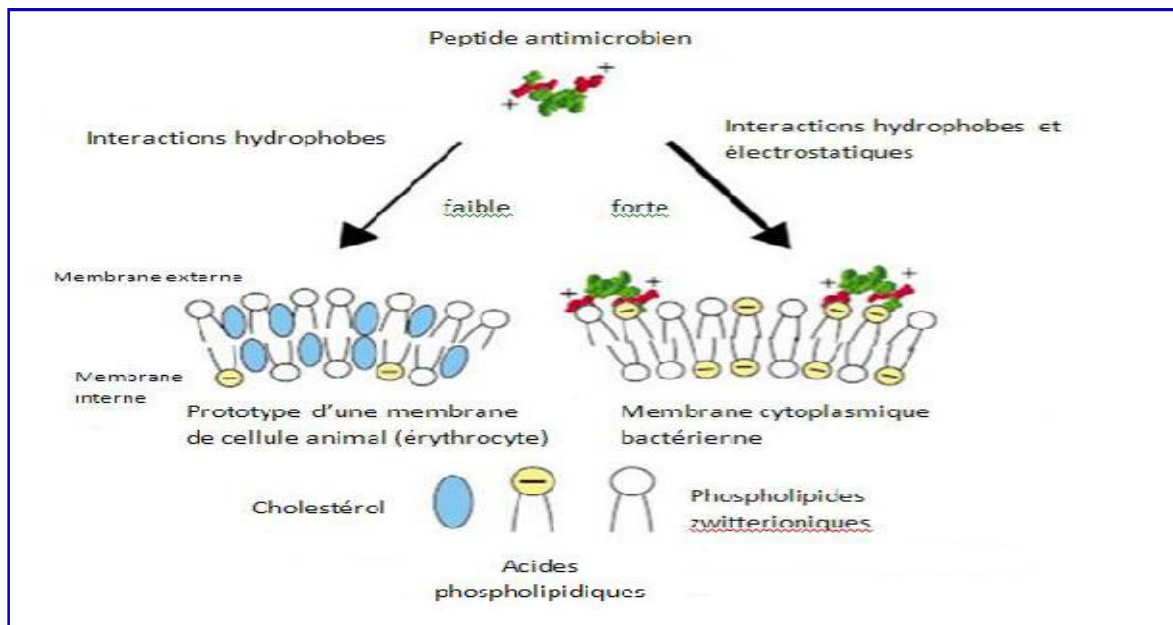


Figure 2: Mécanisme d'attraction (ZASLOFF, 2002).

◆ L'attachement

Une fois à la surface de la bactérie, les peptides doivent atteindre la membrane cytoplasmique. Les peptides s'enfoncent alors dans la région des têtes lipidiques, dans un état fonctionnellement inactif, ce qui a pour effet de tendre et d'amincir la membrane. L'amincissement de la membrane est spécifique au peptide et directement proportionnel à sa concentration (HUANG 2000).

◆ **Interaction peptide-membrane**

Les interactions des PAM avec la membrane cytoplasmique bactérienne ne sont pas encore complètement définies : plusieurs mécanismes sont proposés. La figure 3 présente les principaux modes d'action rencontrés.

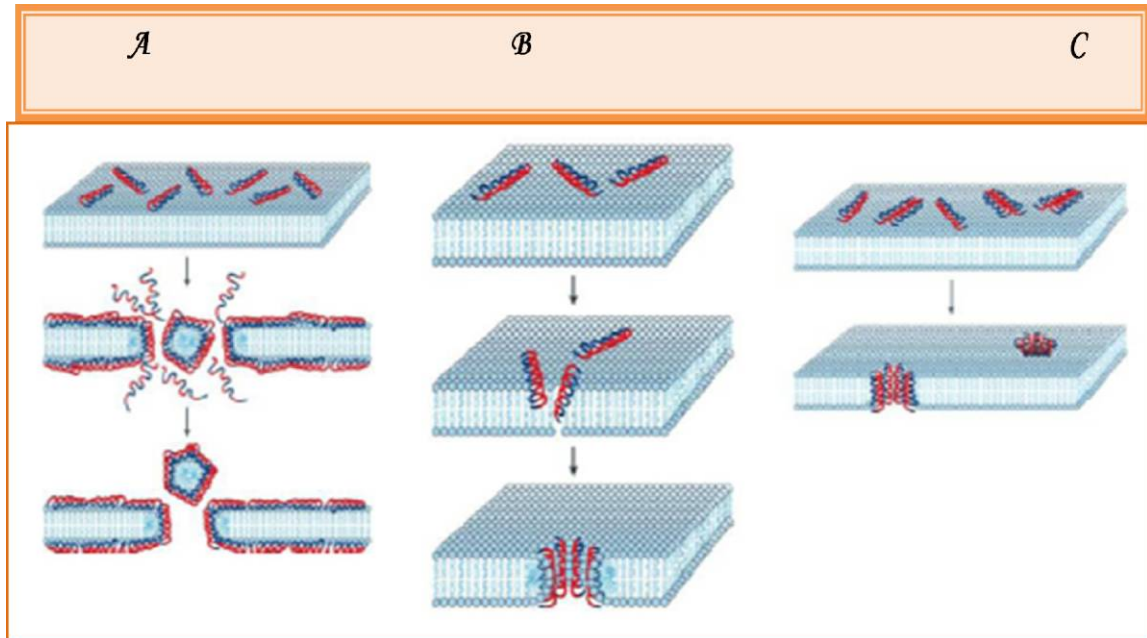


Figure 3: Modèles décrivant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique par les peptides antimicrobiens (A : Le modèle « tapis »; B : Le modèle « des pores toroïdaux »; C : Le modèle « en douve de tonneaux » D'après PARK *et al.*, 2011.

I.3.1.1. Mode d'action en tapis (Carpet-like model)

Il consiste au recouvrement de la membrane par les peptides d'une façon parallèle, les résidus hydrophobes face à la membrane. Ce qui conduit à la réorientation des résidus hydrophiles des phospholipides membranaires, puis dépolarisation membranaire et rupture de la membrane provoquant la formation de pores et fuites des métabolites cytoplasmiques, ou rupture totale de la membrane et mort cellulaire.

I.3.1.2. Mode d'action des pores en douves de tonneau (barrel stave model)

Il concerne les peptides en hélice α amphipathiques. Les surfaces hydrophobes se lient avec la partie lipidique de la membrane et les surfaces hydrophiles se tournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux. Les canaux transmembranaires ainsi formés détruisent les équilibres osmotiques, conduisant à la lyse de la cellule.

I.3.1.3. Mode d'action par formation de pores toroïdaux (wormhole model)

Consiste à l'enfouissement des parties hydrophobes des peptides, provoquant le déplacement des têtes hydrophiles des phospholipides et la courbure de la membrane. Lorsqu'un certain ratio peptide/lipide est atteint, la tension engendrée provoque le basculement des peptides perpendiculairement à la membrane, entraînant la naissance de pores mixtes : phospholipides et peptides amphiphiles. La présence de têtes hydrophiles des phospholipides chargés négativement à l'intérieur des pores contribue à les stabiliser en limitant les phénomènes de répulsion électrostatique.

I.3.2. Peptides interférant avec le métabolisme cellulaire de la bactérie

Comme l'illustre la figure 4 adaptée de travaux réalisés par BROGDEN 2005 une fois la membrane cytoplasmique traversée, les PAM vont interagir avec différents mécanismes du métabolisme cellulaire des bactéries. Ainsi, inhiber la synthèse de la paroi, des acides aminés, des protéines, de l'ADN ou moduler l'activité des enzymes. Tous ces dérèglements vont aboutir à la lyse des cellules. En effet, grâce à des études sur la translocation, il a été montré que des peptides riches en arginine peuvent à la fois être transportés à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif, mais également à travers la membrane plasmique, que ce soit pour les bactéries à Gram négatif ou à Gram positif (POWERS *et al.* 2003). Ces peptides traversent donc la membrane plasmique, puis interagissent avec l'ADN, l'ARN et/ou des protéines, et peuvent inhiber différentes voies de synthèses (POWERS *et al.* 2003; JENSSEN *et al.* 2006).

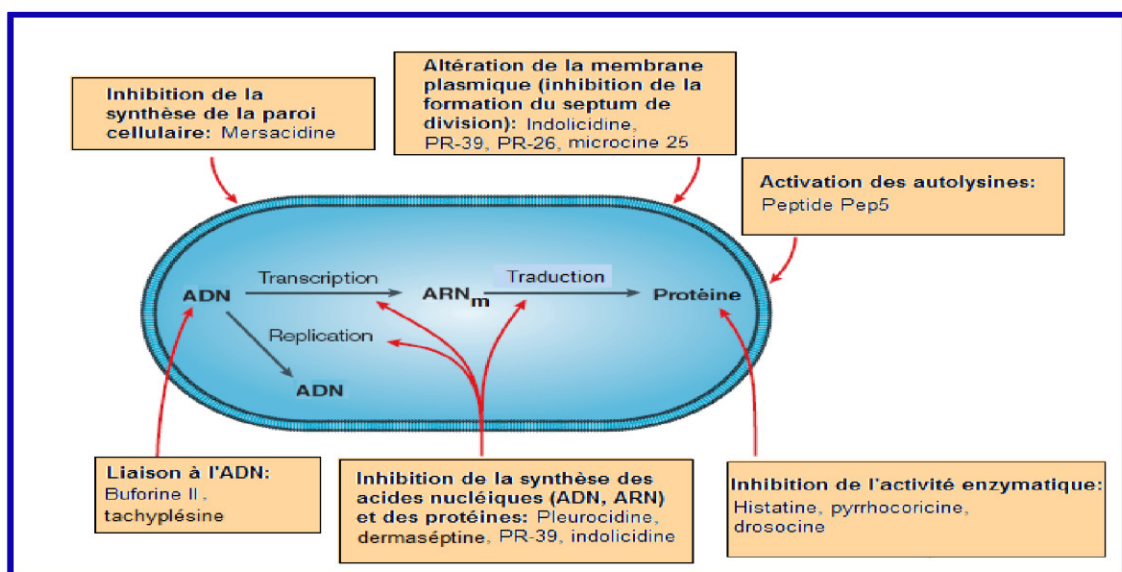


Figure 4: Mode d'action intracellulaire des PAM d'après BROGDEN, 2005

II. PRODUCTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTEINES

II.1. Généralités

Mise à part les bactériocines qui sont généralement obtenues par la fermentation de certaines bactéries lactiques, ou encore par l'acidification du lait suivi d'un traitement de chaleur (TOMITA *et al.*, 2002), les peptides antimicrobiens contenus dans la séquence des protéines sont plutôt obtenus par hydrolyse enzymatique (KORHONEN et PIHLANTO, 2006).

Plusieurs études ont démontré les propriétés antimicrobiennes de certaines protéines alimentaires (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine, les des poissons...) ainsi que la possibilité de générer des peptides actifs par hydrolyse enzymatique de protéines *in vivo* ou bien *in vitro*.

En effet, par hydrolyse enzymatique, *in vitro*, il était possible de libérer, à partir des protéines alimentaires, des peptides très actifs que les protéines initiales. Ou bien à partir de protéines dépourvue d'activité antimicrobienne à l'état native (KITTS et WEILER, 2003 ; PELLEGRENI, 2003).

Le lysozyme, la lactoferrine et l'ovotransferrine sont des exemples de ces protéines antimicrobiennes. En 1998, IBRAHIM *et al.*, ont isolés par hydrolyse acide ménagée de l'ovotransferrine de poule un peptide (109-200) actif contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli K 12.l*. le lysozyme de blanc d'œuf de poule, libère après action de la clostripaine un peptide (98-112) ayant des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (IBRAHIM *et al.*, 2001).

Des peptides antimicrobiens ont été trouvés par hydrolyse enzymatique d'autres protéines alimentaires. Ainsi, il a été montré la présence de 5 peptides présentant des activités antimicrobiennes dans un hydrolysat pepsique d'hémoglobine bovine, trois d'entre eux correspondant aux séquences 107-141, 137-141 et 133-141 de la chaîne α et le quatrième à la séquence 126-145 de la chaîne β . Ces peptides montrent une activité contre *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus* (NEDJAR-ARROUME *et al.*, 2006 et 2008).

Toute fois, ce sont les protéines du lait qui ont suscités plus d'intérêt. En effet, les propriétés biodéfensives de ces dernières ont été bien décrites et largement reconnu depuis plusieurs décennies.

Plusieurs études ont démontré que certains peptides issus des protéines laitières, dont les caséines, les protéines de lactosérum et les autres protéines mineures du lait, possédaient des propriétés antimicrobiennes (PIHLANTO-LEPPALA *et al.*, 1999; BENKERROUM, 2010; EXPOSITO et RECIO, 2006 ; ADOUI, 2014).

Les lactoferricines issues de l'hydrolyse enzymatique de la lactoferrine possèdent une activité bactéricide résultant d'une interaction directe des peptides (notamment les séquences 17-41 ou 20-30 de la lactoferrine bovine) avec la membrane bactérienne. Elles possèdent une activité d'inhibition de la croissance de nombreuses souches bactériennes telles que les bactéries à Gram + et Gram - mais aussi certaines levures et champignons (TOMITA *et al.*, 1994).

Suite à l'hydrolyse trypsique de la β -Lg, PELLEGRINI *et al.* (2001) ont identifié quatre peptides qui exercent une forte activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positives. Il s'agit des séquences β -Lg f15-20, f25-40, f78-83 et f92-100.

Par ailleurs, les caséines, protéines majeurs du lait, libèrent, par hydrolyse enzymatiques différents peptides antimicrobiens avec un large spectre d'action (ZUCHT *et al.*, 1995 ; RECIO et VISSER, 1999 ; MALKOSKI *et al.*, 2001 ; Mc CANN *et al.*, 2006).

En effet, des travaux récents réalisés au sein de notre laboratoire portant, sur la préparation des peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse des caséines bovines et camelines par la pepsine porcine ont abouti à l'identification de plusieurs séquences peptidiques ayant un effet antimicrobien (ADOUI, 2014).

II.2. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique des caséines

II.2.1. Généralités sur les caséines bovines

Le lait de vache contient environ 3.5 % de protéines, dont 80 % sont des caséines et 20% sont des protéines du lactosérum (SINGH et BENNETT, 2002).

Les caséines se définissent généralement comme la fraction protéique qui précipite suivant une acidification du lait à pH 4.6, à une température de 20°C (SINGH ET BENNETT, 2002 ; SWAISGOOD, 1996). Les composantes majeures de la fraction caséique sont les

caséines α_{s1} , α_{s2} , β et κ . Les caséines sont des protéines phosphorylées de faible poids moléculaire (19-25 kDa), riches en résidus proline, mais pauvre en cystéine. Elles sont peu structurées et fortement hydrophobes ($\beta > \kappa > \alpha_{s1} > \alpha_{s2}$). Dans le lait, 95 % des caséines se présentent sous la forme de micelles (50-500 nm) dont la structure véritable n'est toujours pas élucidée. Les micelles de caséines sont des particules colloïdales pouvant reffermer jusqu'à 11 000 molécules de caséine. Il semble toutefois que les micelles soient composées de sous-micelles sphériques (10-15 nm), où la caséine κ se trouve en surface. Du phosphate de calcium et des interactions hydrophobes seraient impliqués dans la liaison des sous-micelles entre elles.

Tableau 2:Caractéristiques de constituants majeurs de caséines (CAYOT et LORIENT, 1998)

	Caséine α_{s1}	Caséine α_{s2}	Caséine β	Caséine κ
Proportion (%)	36	10	34	13
Concentration (g/L)	9,6	6,7	9	13
Masse molaire (Da)	23600	25250	24000	19000
Nombre de résidus d'acides aminés	199	207	209	169
Phosphore (%)	1,1	1,3	0,56	0,2
Glucides (%)	0	0	0	5
Proline (%)	17	10	35	20
Résidu cystéine/mol	0	2	0	2
pHi	4,4	-	4,9	3,7

II.2.1.1. Caséine α_{s1}

La caséine α_{s1} représente environ 40% des caséines, compte 199 résidus d'acide aminés avec un poids moléculaire (PM) de 23600 Da (LEONIL *et al.*, 2001 ; POURGHERON et GOURSAUD, 2001 ; AMIOT *et al.*, 2002). Cette caséine est très sensible au calcium au pH normal du lait =6.7 quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons (POURGHERON et GOURSAUD, 2001).

La localisation des charges et des chaînes latérales hydrophobes est très irrégulière, ce qui confère à la molécule un comportement dipolaire avec un pôle plutôt hydrophobe et un pôle chargé. Trois tronçons hydrophobes sont décelés, compris entre les résidus 1-44, 30-113 et 132-199 et une partie très phosphorylée (résidus 41-80) qui représente presque la totalité de la charge négative (-20,6) à pH 6.6.

II.2.1.2. Caséine α_{S2}

Le lait de vache contient en moyenne 2.6 g/L de caséine α_{S2} sa masse moléculaire oscille entre 25150 et 25400 Da (CAYOT et LORIENT, 1998). Elle est riche en sérine phosphorylée et de lysine (AMIOT *et al.*, 2002). La caséine α_{S2} représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 acides aminés (POUGHEON et GOURSAUD, 2001) grâce aux nombreux de groupements phosphate, la caséine α_{S2} a l'hydrophobie moyenne calculée la plus faible. Cela est du aux nombreux groupements phosphorylés (10 à 13 résidus phosphoryl /mole) et leurs répartition sur trois régions distinctes (entre les résidus d'acides aminés 8-16, 56-61 et 129-133) en présence, également, de résidus glutamyls. Les parties hydrophobes se limitent aux portions 90-120 et 160-207.

Cette fraction présente une charge négative du côté de l'extrémité N-terminale (- 21 pour les 68 résidus N-terminale) et une charge nette positive sur les clinquantes derniers résidus (+ 9,5 au pH du lait) (SWAISGOOD, 1992).

II.2.1.3. Caséine β

La caséine β est présente en très forte proportion dans le lait 9.3g/L en moyenne sur les 26 g/L de caséine total (CAYOT et LORIENT, 1998). Elle représente environ 35% des caséines, sa masse moléculaire est d'environ 24000 Da. Sa structure primaire comporte 209 résidus d'acides aminés et sa forme tertiaire présente certaine zones Hydrophobes (AMIOT *et al.*, 2002). La caséine β est la plus hydrophobe de toutes les caséines bien qu'elle ait un caractère amphipolaire assez marqué. En effet, Les charges négatives de la caséine β contenant les résidus phosphoséryl (résidus 1-40) (-11,5 pour les premier 21 acides aminés à pH 6,6) ce qui rend cette partie fortement hydrophile. Alors que la partie C-terminale (résidus 136-209) est très riche en groupements apolaires (les 21 acides aminés C-terminal ne présentent pas une charge nette). Cette répartition serait à l'origine de la libération de cette fraction de la micelle de caséine à basse température (AOKI *et al.*, 1990).

II.2.1.4. Caséine κ

La caséine κ est la protéine laitière de loin la plus étudiée car elle détient le rôle clef dans la coagulation du lait par la présure (CAYOT et LORIENT, 1998). Elle représente environ 12% des caséines de lait, son poids moléculaire est de 19000 Da et sa structure primaire compte 169 résidus d'acides aminés (AMIOT *et al.*, 2002). Cette protéine est caractérisée par la présence d'une portion glycomacropéptide qui confère à cette protéine son

caractère hydrophile, par contre, le reste de la chaîne protéique est de nature très hydrophobe. Ce qui explique la perte de solubilité des micelles de caséines lors de l'hydrolyse de la liaison 105-106 entre le résidu phénylanyl et le résidu Méthionyle par la chymosine (CAYOT et LORIENT, 1998) (AMIOT *et al.*, 2002).

II.2.2. Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse des caséines

Il existe une variété de peptides antimicrobiens issus des protéines du lait. Jusqu'à présent, ce type de peptides a été identifié dans les caséines et certaines protéines du lactosérum, notamment la β -lactoglobuline (β -Lg), l' α -lactalbumine (α -La) et la lactoferrine (LF) (BENKERROUM, 2010).

II.2.2.1. Peptides issus de la caséine α_s

Les casécidines sont obtenues suite à la digestion de la caséine α_{s1} par la chymosine à pH neutre et font parties du groupe des glycopeptides basiques ayant un poids moléculaire relativement élevé (4-6 kDa). Les casécidines posséderaient une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positif et causeraient des dommages aux bactéries comme *Staphylococcus aureus*, *Sarcina ssp.*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (BENKERROUM, 2010).

Un autre peptide antimicrobien produit par l'hydrolyse de la caséine α_{s1} à l'aide de la chymosine est l'isracidine. Ce peptide cationique de 23 résidus d'acide aminé posséderait un spectre d'activité contre les bactéries Gram positif et Gram négatif. L'isracidine serait active contre des pathogènes alimentaires comme *Escherichia coli*, *Enterobacter sakakii* et *Staphylococcus aureus*, mais seulement à forte concentration (entre 0,1 et 1 mg/mL) (HAQUE et CHAND, 2008).

La caséine- α_{s2} est également reconnue comme une source de peptides antimicrobiens tels la casocidine-I. La casocidine-I est libérée par l'hydrolyse trypsique de la caséine- α_{s2} . Ce peptide, composé de 39 acides aminés, inhiberait la croissance de bactéries d'altération comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*, *E. coli* et *Rhodotorula rubra* (ZUCHT *et al.*, 1995).

II.2.2.2. Peptides issus de la caséine β

Parmi les peptides à activités antimicrobiennes issus de la digestion trypsique des caséines du lait de lapin, le fragment F (64-76) de la caséine β semble le plus actif. Ils ont un

caractère anionique qui exclue leur interaction avec les lipopolysaccharide chargés négativement ce qui explique leur faible activité envers les bactéries à Gram négatif (EXPOSITO et RECIO, 2006).

Des peptides dérivés de la caséine β bovine correspondant au fragment 106-169 qui peut agir comme un peptide de la défense à cause de sa capacité à se lier aux enterotoxines et à inhiber l'adhésion des bactéries et des virus comme par exemple l'adhésion des bactéries cariogènes au niveau des surfaces buccales (MEISEL, 2005).

II.2.2.3. Peptides issus de la caséine K

La caséine K est un précurseur important de peptides antimicrobiens. Lors de la fabrication fromagère, l'hydrolyse de la caséine κ par la chymosine libre le segment f 106-169, nommé caséinomacropeptide (CMP) ou glycomacropeptide (GMP). Ce peptide posséderait une activité antibactérienne contre la majorité des pathogènes oraux (*Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Actinomyces naeslundii*) et contre *E. coli* (DASHPER *et al.*, 2007).

Le CMP est un polypeptide qui possède plusieurs variantes génétiques et un taux variable de groupements glycolyses. La kappacine est la seule forme active de la molécule phosphorylées et non glycolysée du CMP (BENKERROUM, 2010).

III. PROTEASES UTILISEES POUR LA PRODUCTION DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS

Plusieurs protéases de grade alimentaire sont maintenant disponibles commercialement. Elles sont classées en fonction de leur origine (Animale, végétale ou microbienne), de leur mode d'action catalytique (endo ou exopeptidase) ou des acides aminés impliqués dans leur site catalytique (ex: protéase à sérine, à cystéine ou à aspartate...).

Chaque enzyme possède une spécificité d'attaque plus ou moins élargie, lui permettant de briser un ou plusieurs liens peptidiques existant entre les différents acides aminés. Les protéines peuvent donc être décomposées en peptides plus ou moins caractéristiques en exploitant les activités spécifiques d'une ou de plusieurs enzymes. Ainsi, chaque enzyme présente des caractéristiques d'activité qui lui sont propres. Ces caractéristiques influencent fortement la composition peptidique des hydrolysats formés. Il est donc important de maîtriser les quatre paramètres intrinsèques d'une enzyme afin d'optimiser son utilisation, à savoir : sa

température optimale d'utilisation, son pH optimal, le rapport enzyme/substrat (E/S) et son temps d'action : ce dernier étant fortement influencé par les trois premiers et relatif au degré d'hydrolyse souhaité (AMIOT et BRISSON, 1985).

En raison des paramètres cités ci dessus, les enzymes les plus couramment utilisées pour produire des peptides antimicrobiens sont la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine, qui des endopeptidase d'origine animale.

Plusieurs études ont démontré que l'hydrolyse enzymatique des protéines laitières permet d'obtenir des peptides antimicrobiens. Ces peptides peuvent être libérés par l'action de différentes enzymes protéolytiques comme la pepsine, la chymosine, la trypsine et la chymotrypsine. La pepsine est une endoprotéase digestive à acide aspartique trouvée dans l'estomac; elle hydrolyse les liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés aromatiques Phe, Tyr et Trp et des l'acide aminé hydrophobe Leu. L'activité optimale de cette protéase est à pH acide, soit à des valeurs se situant entre 1 et 4 (GODFREY et WEST, 1996). La chymosine possède également une activité optimale à pH acide (3-6), mais la spécificité de cette endoprotéase se caractérise surtout par sa capacité d'hydrolyse de la liaison peptidique Phe-Met de la caséine *k* du lait. Dans le cas de la trypsine et la chymotrypsine, elles sont les deux principales enzymes sécrétées par le pancréas. Ces endoprotéase hydrolysent aussi les liaisons peptidiques du côté C-terminal des acides aminés, mais leur spécificité est très différente. En effet, la trypsine agit uniquement sur les acides aminés basiques, Lys et Arg, alors que la chymotrypsine est spécifique aux acides aminés aromatiques ou ceux dont la chaîne latérale est hydrophobe tels Phe, Tyr, Trp et Leu (GODFREY et WEST, 1996).

Dans ce présent travail, nous allons décrire un aperçu général sur l'utilisation des protéases d'origine végétales dans la production des peptides bioactifs et ce, en raison de notre problématique de recherche qui porte essentiellement sur la possibilité de générer des hydrolysats ayant un effet antimicrobien par hydrolyse des caséines bovines sous l'action des protéases végétales.

III.1. Aperçu général sur l'utilisation des protéases végétales pour la production des peptides actifs

Plusieurs plantes ont été utilisées pour isoler des enzymes protéolytiques. Celles-ci deviennent de plus en plus intéressantes. À cet égard, l'utilisation des protéases extraites des plantes pour générer des peptides bioactifs peuvent répondre à des besoins spécifiques en

raison du régime alimentaire et/ou religieux (HOGAN, ZHANG, LI, WANG, et ZHOU, 2009).

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

L'utilisation des enzymes extraites de végétaux pour obtenir des peptides actifs par hydrolyse des caséines bovines sont intensifiées considérablement ces dernières années.

Des études ont été effectuées par SILVA *et al.* (2006) ont montrées que les fromages préparés à partir du lait cru et stérilisé de brebis par l'extrait enzymatique de *Cynara cardunculus* a pu générer des peptides ayant une activité antioxydante et une capacité d'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA).

De même un peptide ayant un effet antithrombotique correspond à la séquence TVQVTSTAV (161–169) a été identifié après l'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait enzymatique de *Cynara cardunculus* (TAVARES *et al.*, 2011).

ARRUDA *et al.* (2012) ont signalé que des nouveaux peptides antimicrobiens ont été obtenus à partir de l'hydrolyse de la caséine bovine par une nouvelle protéase extraite du latex de *Jacaratia corumbensis*. Les peptides ont été séquencés et évalués pour leur potentiel antimicrobien, contre *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonie* et *Staphylococcus aureus*.

DI PIERRO *et al.* (2014) ont identifié 8 séquences peptidiques ayant des propriétés antioxydantes, ces peptides sont issus de l'hydrolyse de la caséine β bovine par l'extrait brut du latex de *ficus carica*.

Les études menées sur la plupart de ces extraits ont permis de classer les protéases qu'elles contiennent selon leur mécanisme d'action. Plusieurs mécanismes d'action ont été décrits pour les protéases végétales, ce qui permet de les regrouper, en fonction de la nature du ou des acides aminés du site actif impliqués dans la catalyse. On distingue ainsi 6 classes:

les protéases à serine (EC 3.4.21), les protéases à thiol ou à cystéine (EC 3.4.22), les protéases à acide aspartique (EC 3.4.23), les metalloprotéases (EC 3.4.24), les protéases à thréonine et les protéases à acide glutamique. La plupart de protéases végétales ont été classés comme des protéases à serine ou des protéases à acide aspartique (BEKA, 2011).

Les enzymes protéolytiques de source végétale ont suscité une attention particulière à cause de leur propriété d'être active sur une large gamme de température et de pH. La recherche de protéases précieuse avec spécificité distincte est toujours un défi continu pour des applications industrielles variées. Actuellement peu d'informations semblent exister dans le respect d'utilisation des protéases végétales pour la libération de peptides bioactifs (DI PIERRO *et al.*, 2014).

III.2. Cas de la ficine

III.2.1. Généralités sur le figuier

Le figuier dont le nom botanique est *Ficus carica L.* a un qualificatif générique qui signifie verrue pour *Ficus* (le lait de figuier pour soigner la verrue) et *carica* signifie originaire de la Carie, ancienne province d'Asie mineure (Turquie actuellement) (DEHGAN 1998). Il appartient à la famille des Moracées dont la spécificité est celle de contenir du latex. Il comprend environ 1500 espèces classées en 52 genres dont le genre *Ficus* (VIDAUD, 1997 ; LESPINASSE et LETERME, 2005 ; RAMEAU *et al.*, 2008).

III.2.1.1. Position systématique du figuier

Du point de vue systématique, la classification botanique du figuier comme décrite par GAUSSEN *et al.*, (1982) ; JOSEPH et RAJ. (2011) est la suivante :

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

III.2.1.2. Origine et répartition géographique

L'origine du figuier reste un peu confuse. Il serait originaire d'Asie occidentale, d'Afrique du Nord ou des Canaries. Il est vraisemblablement issu de l'hybridation de plusieurs espèces sauvages (VILMORIN, 2003). Selon VIDAUD (1987), le figuier serait originaire du bassin méditerranéen et du moyen orient, plus exactement d'Afghanistan. Son aire de répartition s'étend depuis les îles de Canaries jusqu'en Inde et au Pakistan, sur les côtes de l'Océan Atlantique comme sur toutes celles de la Méditerranée et dans le Moyen-Orient.

II.2.1.3. Caractéristiques botaniques de figuier

Bourgeon terminal : il est constitué de deux stipules correspondant à la dernière feuille mise en place. Dans ce bourgeon se trouve de 9 à 11 ébauches de feuilles avec leurs stipules (VIDAUD, 1997).

Rameaux fructifères : Le rameau est constitué d'un ensemble d'entre nœuds chaque nœud constitue le point d'insertion d'une feuille et des bourgeons axillaires, leur disposition alterné, rarement opposée sur le rameau est une spécificité de la famille des Moracées (VIDAUD, 1997).

Les Feuilles : Les feuilles du figuier sont très polymorphes, caduques grande et à nervation palmée. Elles sont larges (25 cm) et épaisse et fortement lobées (3 à 5 ou 7 lobes profonds selon les variétés). La face supérieure est rugueuse et de couleur vert foncé, quant à la face inférieure elle présente des nervures très saillantes de couleur vert clair (VIDAUD, 1997).

L'inflorescence et la fleur : L'inflorescence du figuier est très particulière. Les fleurs de la figue sont hors de vue, groupés à l'intérieur des fruits verts (VIDAUD, 1997).

Le Fruit : La figue est un faux fruit, ce que l'on considère comme un fruit est en réalité un réceptacle de forme concave où sont fixées un grand nombre de fleurs unisexuées. La figue est une sorte de petit sac charnu contenant un orifice, l'ostiole hermétiquement clos par des bractées imbriquées. Les véritables fruits sont les innombrables petits grains qui parsèment la chair de la figue, ce que l'on appelle « akènes » (VIDAUD, 1997).



Figure 5 : Photo d'un figuier (*Ficus carica L*)

III.2.2. Localisation du système enzymatique dans le végétal

Il est connu depuis bien d'années que le latex de genre *Ficus* contient une activité protéolytique. Le nom ficine a été inventée par ROBBINS (1930) pour la poudre blanche purifiée dotée d'une activité antihelminthique obtenu à partir de latex de genre *Ficus* (SINGLETON *et al.*, 2013). Au fait, c'est en 1992 que l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire a recommandé le nom ficaine pour la « composante majeure protéolytique du latex du figuier ».

Toutes les parties de l'arbre de genre *Ficus* contient le latex, il assure une protection et une autoréparation contre les agressions physiques (LANSKY *et al.*, 2008). Il est constitué d'un fluide cytoplasmique contenant les organites habituels des cellules végétales, telles que les noyaux, les mitochondries, les vacuoles et les ribosomes, et d'autres (KIM, PARK, LEE, CERBO, LEE, et RYU, 2008). Le latex est un suspension aqueuse de couleur blanche, il est largement distribué dans la plante (KIM *et al.*, 2003). Ce matériel contient divers métabolites secondaires comme les composés phénoliques et des protéines à savoir les protéases à cystéine (AGRAWAL et KONNO, 2004). Le latex est constitué de caoutchouc, résine, albumine, sucre et acide malique, enzymes protéolytiques, diastase, estérase, lipase, catalase et peroxydase (JOSEPH et RAJ, 2011).

Par incision du tronc on recueille le latex qui coagule rapidement : filtré puis desséché, il constitue la ficine brute. Elle peut être utilisée par l'industrie agroalimentaire (attendrissement des viandes, coagulation de lait), dans l'industrie de textile, en

pharmacologie, en cosmétologie et en immuno-hématologie pour la recherche d'anticorps irréguliers (BRUNETON, 2009). Traditionnellement, il est utilisé dans le traitement de la goutte, des ulcères et des verrues (LANSKY, 2008 ; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

III.2.3. Caractéristiques de la ficine (ficaine) (EC 3.4.22.3)

La ficine ou ficaine (EC 3.4.22.3) est une endopeptidase à cystéine (LOWE, 1976 ; NASSAR *et al.*, 1987 ; GRZONKA *et al.*, 2007 ; NOUANI *et al.*, 2009 ; PAYNE, 2009 ; DEVARAJ *et al.*, 2008, 2011 ; AZARKAN *et al.*, 2011 ; ZARE *et al.*, 2013 ; SHAH *et al.*, 2014). Les informations disponibles indiquent que la ficine a beaucoup de propriétés communes avec la papaïne (DEVARAJ *et al.*, 2011).

La ficine est une protéine qui compte 210 acides aminés pour un poids moléculaire compris entre 20 et 35 KDa (DEVARAJ *et al.*, 2008, 2011). PAYNE (2009) a estimé que sa masse moléculaire est comprise entre 25 et 26 KDa. LOWE (1976) et KATSAROS *et al.*, (2008) ont évalués son poids moléculaire à 25 KDa. Son site actif est constitué de deux acides aminés qui sont la cystéine (Cys-25) et l'histidine (His-159) (KATSAROS *et al.*, 2008 ; FEIJOO-SIOTA *et al.*, 2011). C'est une endopeptidase activée par les thiols et les réducteurs (cystéine. thiosulfate, glutathion), elle est inactivée par les ions métalliques, les oxydants et les réactifs qui réagissent avec les thiols.

Le fractionnement et la purification par chromatographie échangeuse d'ion a donnée 5 isoformes de ficine (A, B, C, D1 et D2) selon leur ordre de l'éluion (AZARKANE *et al.*, 2011 ; DEVARAJ *et al.*, 2008). L'autolyse de la ficine peut donner des peptides qui ont des poids moléculaires compris entre 14 et 18 KDa (AZARKANE *et al.*, 2011). ZARE *et al.*, (2013) ont signalé la présence de 4 isoformes (A, B, C et D).

La ficine présente une grande stabilité thermique. Sa température d'activité est comprise entre 67 et 77°C (NASSAR *et al.*, 1987). Elle est de 60°C selon FADYLOGLU, (2001). GRZONKA *et al.*, (2007) ont reportés des température de 45 à 55 °C. FEIJOO-SIOTA *et al.*, (2011) et BEKHI *et al.*, (2013) l'ont évaluée à 65°C. Selon PAYNE (2009) et NOUANI *et al.*, (2009) elle est de 82°C, SIAR (2014) l' estimé à 75°C. L'activité maximale de la ficine est obtenue dans une gamme de pH de 5 à 8,5. FADYLOGLU (2001) et SIAR (2014) ont évalué le pH optimal de la coagulation à 5. GRZONKA *et al.*, (2007) ont signalé qu'elle est très active dans la gamme de pH de 5 à 8. Selon DEVARAJ *et al.*, (2011) et FEIJOO-SIOTA *et al.*, (2011) elle est active à des valeurs de pH comprissent entre 6.5 et 8.5

avec une activité optimale à pH 7. Cependant, PAYNE (2009) a obtenu une activité maximale dans la zone de pH 5 à 7. L'inactivation complète de la ficine se produit en dessous de pH 3,0 (DEVARAJ, 2011), ainsi que la dénaturation induite par le pH, conduit à un état partiellement plié à un pH acide.

III.2.4. Mécanisme et spécificité d'action de la ficine

Les protéases à cystéine, sont aussi connu comme des protéases à thiol, le mécanisme catalytique de ces enzymes impliquent un groupe de cystéine dans le site actif (GONZALEZ-RABADE *et al.*, 2011). La ficine est une protéase à cystéine avec une large spécificité d'hydrolyse des liaisons contenant des acides aminés non chargés, aromatiques et / ou hydrophobes (DI PIERO *et al.*, 2014). La ficine intervient sur la protéine au niveau de résidus d'acide aminé Tyrosine, Phénylalanine et Valine (DICTIONARY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, (2009) ; PAYNE, (2009) ; WHITEHURST *et al.*, 2010) .

Le clivage de la liaison Phe105-Met106 de κ -caséine par la ficine est similaire à celui de la chymosine. D'autre part, la ficine manifeste une activité protéolytique excessive due à l'action non spécifique envers les autres caséines (α et β) (WALSTRA *et al.*, 1999). Par conséquent, le temps de coagulation diminue mais elle mène à la formation des peptides amers, à l'affaiblissement de concentration du lait caillé et à la dissociation du caillot ce qui affaibli le rendement du lait caillé (AKAR et FADYLOGLU, 1999 ; PAYNE., 2009).

III.3. Cas de l'extrait des fleurs de cardon

III.3.1. Généralités sur le cardon (*Cynara cardunculus*)

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

III.3.2.1. Position systématique

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

Groupe : *Dicotylédones*

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

III.3.1.1. Origine géographique

Le cardon est de façon générale une plante spontanée typique du pourtour méditerranéen. On le trouve au niveau des plaines basses, montagnes pâturage champs incultes à terrains argileux, coteaux arides de : l'Afrique du nord, l'Espagne, Portugal, la France, la Corse, l'Italie, la Grèce, et la Turquie (JAHANDIER, 1931 ; COSTE ,1983 ; ROSEIRO *et al.*, 2003). Avec cela, le cardon se trouve en Amérique du sud ou les conquistadors espagnols l'ont probablement introduit d'une manière fortuite. Il a été aussi signalé au Chili où il a suscité un grand intérêt qui a eu pour effet de créer un axe de recherche pour sa protéase (CAMPOS *et al.*, 1990).

III.3.3. Caractéristiques botaniques de cardon

Le cardon est une plante vivace, robuste, raide, dressée d'une taille de 80 à 150cm, (QUEZEL *et SANTA*, 1963 ; COSTE, 1983). Elle ne forme la première année qu'une rosette de feuilles stériles, (BAYER *et al.*, 1990). Elle diffère de l'artichaut par ses feuilles profondément divisées en lobes qui se terminent par des épines et par les bractées d'involucres finissant par une pointe dure et aigüe.

Selon QUEZEL *et SANTA* (1963) *et BAYER et al.*, (1990), les caractéristiques de la plante sont comme suit :

- **Feuilles** : Radicales en rosette, elles sont longues de 30 à 60cm. Elles sont blanches tomenteuses en dessous, aranéeuses en dessus, dentées, épineuses comportant des lobes triangulaires ou lancéolés.
- **Hampes** : Bien qu'un peu rameuses dans le haut, elles sont puissantes et ont une taille de 40 à 60cm.
- **Involucre** : Il est sphérique à feuilles très larges de forme ovoïde. Sessiles, il comporte généralement des pointes piquantes.

- **Capitules** : Gros, ils sont de 4-5cm de large. Ils sont isolés, terminaux, ovoïdes à écailles lancéolées. Leur base est étalée, charnue et termine en fortes épines.
- **Akènes** : Non ailées, elles ont une couleur jaunâtre souvent maculée de brun.
- **Fleurs** : De couleur allant du bleu au violet, elles ont toutes la même forme. Elles sont androgynes tubulaires se terminant par 5 pointes.

III.3.4. Localisation du système enzymatique dans le végétal

Très nombreux travaux ont été effectués sur les protéases du cardon. Les premiers sont ceux de CHRISTEN et VIRASORO en 1935. Déjà à cette époque ces deux auteurs affirmaient que l'enzyme se trouve exclusivement dans les fleurs. Bien que les fleurs de cardon ont été la partie du végétal utilisée pour la fabrication fromagère depuis une époque très lointaine (HEIMGARTNER *et al.*, 1990), il a été prouvé que les cardosines sont des enzymes organo-spécifiques, ce qui veut dire qu'elles sont spécifiques aux fleurs.

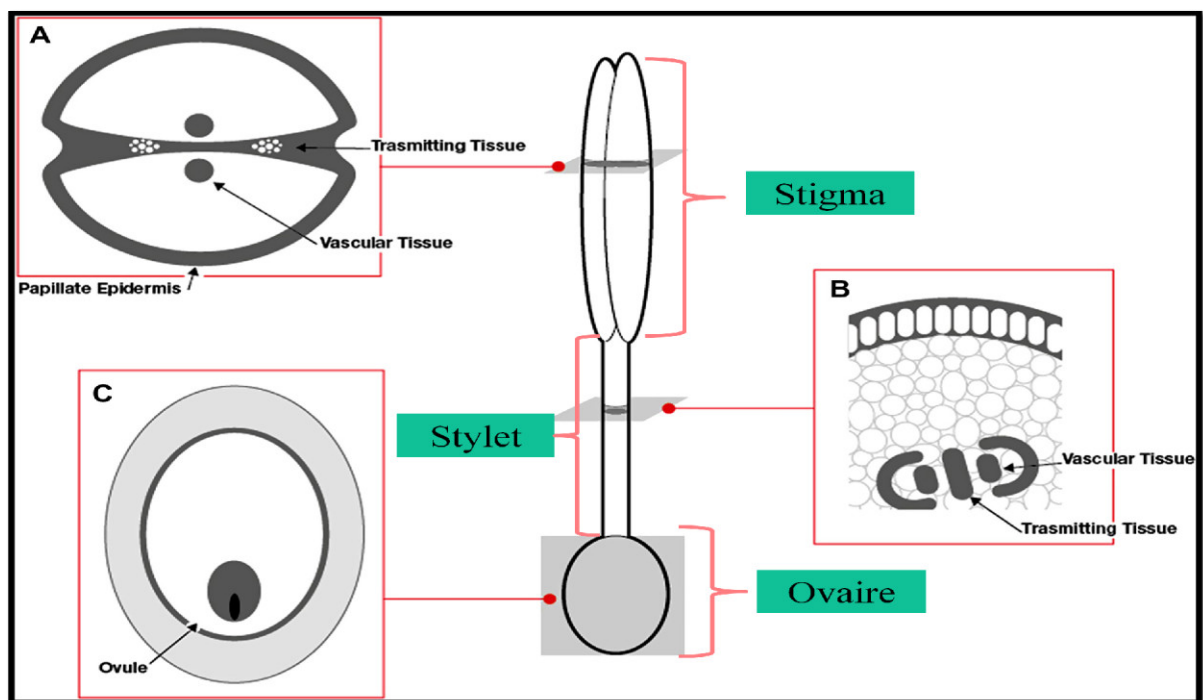


Figure 6 : Diagramme schématique d'une fleur de cardon. (A) Section transversale du stigma ; (B) Section transversale du stylet ; (C) Section longitudinale de l'ovaire. (VAIRO CAVALLI *et al.*, 2013).

Plus que cela, ils ont découvert que ces cardosines se trouvent à concentration élevée dans la partie violette des corolles, et plus les fleurs sont matures, plus la partie violette de leur corolle est grande donc leur concentration en enzyme est élevée (TSOULI, 1974). Ceci dit, la concentration maximale est celle se trouvant au niveau des stylés et de manière exacte,

dans les cellules épidermiques des stylés. Cependant, aucune protéase n'a pu être détectée dans les feuilles aussi bien que dans les graines (CORDEIRO *et al.*, 1994 ; ROSEIRO *et al.*, 2003).

III.3.5. Caractéristiques des cardosines

CORDEIRO *et al.* 1994 ; HEIMGARTNER *et al.* 1990 ont isolé à partir de l'extrait de fleurs sèches de *C. cardunculus*, à pH alcalin (8,3) trois peptidases glycolysées présentant une activité de coagulation du lait et nommées cynarases 1, 2 et 3. Le nom cynarase a été remplacé plus tard par cyprosine (CORDEIRO *et al.*, 1994). En revanche, les cardosines ont été purifiées et caractérisées à partir de l'extrait de fleurs de *C. cardunculus* (VERISSIMO *et al.*, 1995). Et Contrairement à ce qui a été attendu, les cardosines et les cyprosines n'ont jamais été copurifiées (PIMENTEL *et al.*, 2007). Le processus de purification utilisé pour l'extraction des cardosines impliquent des pH acides par contre les cyprosines impliquent des pH alcalins.

D'après les multiples recherches effectuées sur la cardosine, il s'est avéré que l'enzyme extraite du cardon est en réalité composée d'un mélange de deux enzymes : la cardosine A et la cardosine B (MACEDO *et al.*, 1993 ; SILVA *et* MALCATA, 1999 ; FRAZAO *et al.*, 1999 ; VIOQUE *et al.*, 2000). La cardosine A est la plus abondante des cardosines, elle s'accumule dans les vacuoles et dans les cellules du tissu épidermique. La cardosine A est produite initialement en une chaîne unique zymogène, procardosin A, elle est constituée de 504 acides aminés, l'enzyme mature est formée de deux peptides de 31 et 15 kDa et elle a une faible activité protéolytique (ROSEIRO *et al.*, 2003), La conversion vers la forme active de l'enzyme se fait probablement à l'intérieur des vacuoles (CLAVERIE *et* HERNANDEZ, 2007). Contrairement à la cardosine A, la cardosine B est accumulée dans les parois cellulaires et dans la matrice extracellulaire des tissus, son précurseur contient 506 acides aminés quant à l'enzyme mature, elle est formée par deux polypeptides de 34 et 14 kDa (VIEIRA, 2001).

III.3.6. Mécanisme et spécificité d'action du système enzymatique

Comme la majorité des autres protéases coagulants le lait, l'extrait enzymatique de fleurs de *Cynara cardunculus* a une tendance de cliver la liaison Phe105 – Met106 de la caséine κ (LUFRAÑO *et al.*, 2012; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 1996; SAMPAIO *et al.*, 2008). Les cardosines A et B clivent aussi les caséines α et β dans les différents liaisons

peptidiques (Tableau 3). Les cardosines ont une activité protéolytique maximale dans les marges des pH acides, et coupent préférentiellement les liaisons peptidiques entre les résidus des chaînes latérales hydrophobes. (RAMALHO *et al.*, 1995 ; VERISSIMO *et al.*, 1996). Cependant, de légères différences peuvent être trouvées entre les cardosines en ce qui concerne leurs spécificités et propriétés cinétiques. Comme il a été montré par l'action protéolytique de chaque cardosine sur la chaîne B de l'insuline et sur les caséines bovines la cardosine B assure une large spécificité que la cardosine A. Après toutes les recherches menées, il s'est avéré que l'extrait enzymatique de cardon ressemble beaucoup plus à la présure: Comme la chymosine, la cardosine A serait la principale responsable de l'activité coagulante, et au même titre que la pepsine, la cardosine B aurait en majeure partie une activité protéolytique, (VERISSIMO *et al.*, 1996). Les cardosines sont empêchées par le PEPSTATIN A, et d'autres inhibiteurs généraux des protéase aspartiques tels que les dérivés de DIAZOACETYL-DL-NORLEUCINE (VERISSIMO *et al.*, 1996).

Tableau 3: Spécificité d'action des cardosine A et B de *Cynara cardunculus* sur les caséines bovine, caprine et ovine (RAMALHO-SANTOS *et al.* 1996; PIRES 1998a; PIRES 1998b; SILVA et MALCATA 2000b; SILVA et MALCATA 2005a; SILVA et MALCATA 1999).

endopeptidase	Caséines bovines		
	Caséine a_{s1}	Caséine B	Caséine K
Cardosine A	Phe23-Phe24	Leu127-Thr128	Phe105-Met106
	Phe153-Tyr154	Leu165-Ser166	
	Trp164-Tyr165	Leu192-Tyr193	
	Tyr165-Tyr166		
Cardosine B	Phe23-Phe24	Leu165-Ser166	Phe105-Met106
	Phe150-Arg151	Leu192-Tyr193	
	Phe153-Tyr154		
	Trp164-Tyr165		
Caséines caprines			
Cardosine A et B	Caséine a_{s1}	Caséine B	Caséine K
	Phe153-Tyr154	Leu127-Thr128	Lys116-Thr117
		Leu190-Tyr191	
Caséines ovines			
Cardosine B	Caséine a_{s1}	Caséine B	Caséine K
	Leu156-Asp157	Leu127-Thr128	Phe105-Met106
	Trp164-Tyr165	Leu165-Ser166	
		Leu190-Tyr191	

Partie 02 :

*MATERIEL ET
METHODES*

Cette partie expérimentale a pour but d'étudier la possibilité de générer des peptides ayant un effet antimicrobien à partir de l'hydrolyse des caséines bovines par des protéases végétales extraites à partir de fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*) et du latex de figuier (*Ficus carica*).

Ce travail s'articulera autour les points suivants :

- Extraction et caractérisation des systèmes enzymatiques à partir du matériel végétal ;
- Réalisation des cinétiques de l'hydrolyse des caséines bovines par les deux extraits enzymatiques ;
- Caractérisation des protéolysats obtenus ;
- Mise en évidence de l'activité antibactérienne des protéolysats obtenus à différents temps d'hydrolyse.

I. Matériel biologique

I.1. Caséine

La caséine bovine employée est une caséine commerciale à l'état de poudre (C8654, SIGMA), préparée sous forme de caséinate de sodium. Cette poudre est soluble dans l'eau distillée. Une solution à 50mg/mL dans l'eau distillée présente un pH de 6,8.

I.2. Poudre de lait

Le lait utilisé est un lait écrémé en poudre, de qualité moyen chauffage (SOLAREC S.A ; Belgique). Cette poudre est importée par l'ONIL-Algérie (Office National Interprofessionnel du Lait). Elle nous a été fournie par la laiterie SAFAIT LAIT (Wilaya de Constantine).

Le lait est reconstitué par dissolution de 12g de poudre de lait écrémé dans 100 mL d'une solution de chlorure de calcium 0,01M. Il est appelé substrat standard de Berridge (BERRIDGE, 1955 ; LIBOUGA, 2006 ; BENYAHIA-KRID *et al.*, 2010). L'azide de sodium (0,04% p/v) est ajouté pour éviter le développement des microorganismes. Le substrat standard de Berridge est conservé à 4°C pendant 12 h pour permettre l'établissement de l'équilibre physico-chimique.

I.3. Matériel enzymatique

I.3.1. Extrait enzymatique de la Ficine

L'extrait enzymatique de la ficine est préparé à partir du latex du figuier qui est le liquide blanc visqueux qui s'échappe des feuilles et des fruits quand ils sont séparés des tiges ou quand les jeunes tiges sont cassées.

Le latex utilisé dans ce présent travail provient des arbres unifères cultivés dans la région de SFISFA commune d'EMJEZ EDCHICHE (Wilaya de Skikda) et appartient à l'espèce *Ficus carica*.

Le latex frais a été collecté dans le même environnement et les caractéristiques du sol. Tous les échantillons ont été collectés au même stade de maturation durant la fin du mois d'Août 2014, par incision manuelle de pédoncule du fruit vert de la branche principale (figure 1). Le latex collecté a été réparti dans des tubes à essai et conservé à (-20°C).



Figure 1: Collecte du latex

Le latex est décongelé à 4°C, puis centrifugé à 14000g à 4°C pendant 15 min afin d'enlever les gommés et autres débris (DI PIERRO *et al.*, 2014). L'extrait clarifié (surnageant) renfermant le système enzymatique est lyophilisé et conservé à -20°C jusqu'à utilisation. (DI PIERRO *et al.*, 2014 ; ZARE *et al.*, 2013).

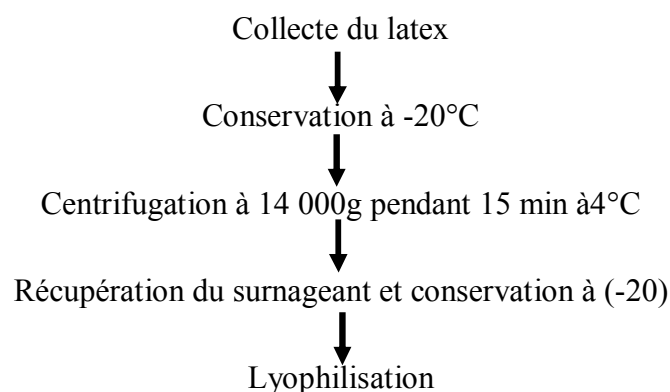


Figure 2 : Diagramme d'extraction de l'extrait brut de la ficine

I.3.2. Extrait enzymatique des fleurs de cardon

I.3.2.1. Récolte et conservation des fleurs

Les fleurs de cardon utilisées dans ce travail appartiennent à l'espèce *Cynara cardunculus*. Les capitules de cardon ont été récoltés en fin du mois de juin et début de juillet dans la région de Guelma près de la montagne Djebel El Ansel dans la commune d'AIN MAKHLOUF.

Traditionnellement, les fleurs sont conservées dans une toile par un séchage à température ambiante et à l'abri des rayons solaires, dans un endroit bien aéré durant 10-20 jours (ROSEIRO *et al.*, 2003 ; AQUILANTI *et al.*, 2011). Cependant, MARTINS *et al.*, (1996), ont montré que cette méthode cause beaucoup de pertes sur les caractéristiques de l'extrait enzymatique. Ils ont précisé que la lyophilisation est la méthode qui conserve le mieux ces caractéristiques. Pour cela nous avons choisi la lyophilisation comme moyen de conservation des fleurs.

Pour ce faire, les fleurs, enlevées de leurs capitules (figure 3), ont été préalablement congelées à (-20°C), puis lyophilisées à une pression de 0,07 bar et à une température de (-55°C) pendant 16 heures. Les fleurs ainsi lyophilisées sont mises dans des sacs étanches à la vapeur d'eau et conservé à (-20°C) (ZIKIOU, 2013).

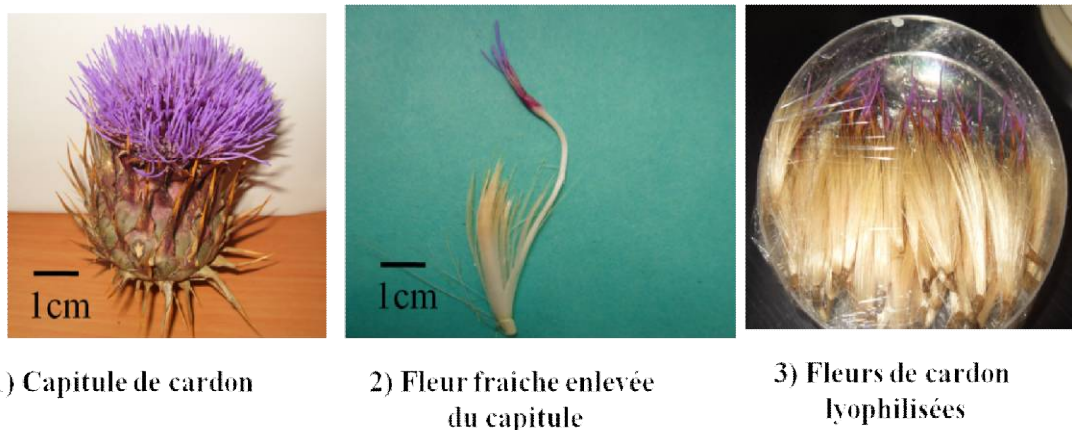


Figure 3: Capitule et fleurs de cardon utilisés.

I.3.2.2. Extraction du système enzymatique

Le protocole adopté dans ce travail, pour extraire le système enzymatique des fleurs sèches de cardon, est celui décrit par FRENI *et al.*, 2001 (figure 4). Il consiste en un broyage et macération pendant 24h à l'obscurité de 10g de fleurs sèches dans 100mL de tampon d'acétate de sodium (0,1M à pH 5,4). Le liquide est ensuite centrifugé à 6000g pendant 5

minutes. Le surnageant qui en résulte constitue l'extrait brut de fleurs de cardon est filtré puis lyophilisé.

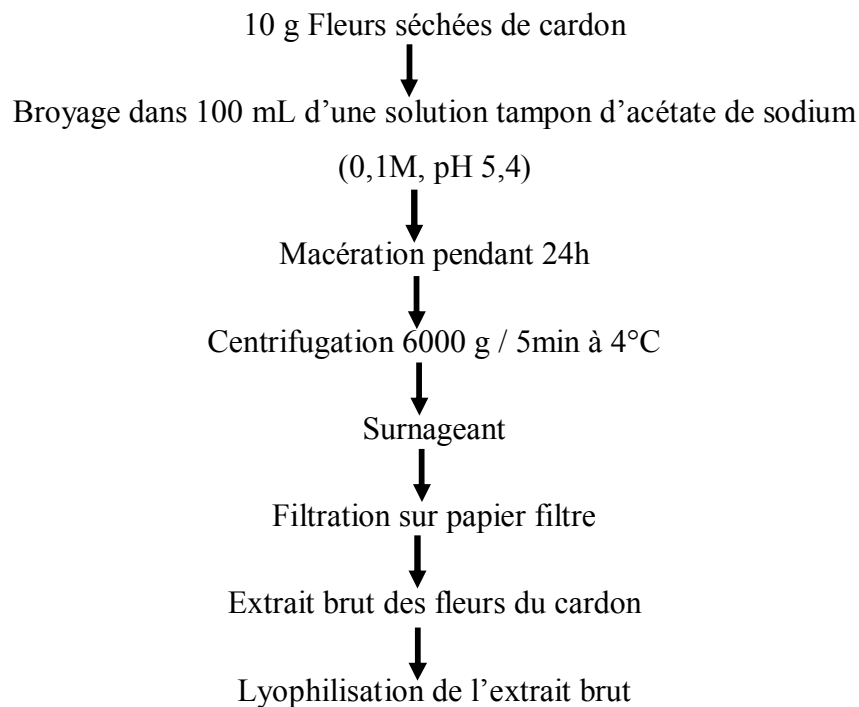


Figure 4: Diagramme d'extraction de l'extrait brut des fleurs du cardon (FREINI *et al.* 2001)

II. METHODES D'ANALYSE

II.1. Caractérisation physico-chimique des extraits enzymatiques obtenus

II.1.1. Mesure de la teneur en matière sèche

Le taux de matière sèche dans les extraits enzymatiques a été déterminé selon la norme AFNOR NF VO4-207 (ANONYME, 1993). Un échantillon de 1mL de chaque extrait enzymatique est placé dans une capsule en verre préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'une masse constante puis, il est refroidi dans un dessiccateur en présence de HCl.

Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation :

$$\text{MS (\%)} = \frac{P}{P_i} \times 100$$

P_i : poids initial en gramme, de la prise d'essai ;

P : poids en gramme, de la prise d'essai séchée après passage dans l'étuve à $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

$H (\%) = 100 - \text{MS} (\%)$ où H : pourcentage en eau (humidité)

II.1.2. Mesure du pH

Le pH est déterminé directement en utilisant un pH-mètre électronique (HANNA instruments, Roumanie) qui affiche la valeur sur son écran après avoir plongé son électrode dans un bécher contenant la solution enzymatique. Cet appareil doit être étalonné avec deux solutions tampons à pH 7 et 4.

II.1.3. Dosage des protéines dans les extraits enzymatiques

Le dosage des protéines totales dans les extraits enzymatiques est déterminé selon la méthode de Bradford, (BRADFORD, 1976).

✓ Principe

La méthode de Bradford est une méthode colorimétrique dont le principe repose sur l'adsorption du bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (avec les acides aminés basiques (Arg, Lys, His). Une fois lié aux protéines sa couleur vire du rouge vers le bleu montrant une absorbance maximale à 595 nm. Le haut coefficient d'extinction permet d'avoir un dosage des protéines même à des concentrations inférieures à 20 µg/mL. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présente dans l'échantillon.

✓ Mode opératoire

Pour 100 µL de chaque extrait enzymatique, 3mL de réactif de Bradford est ajouté, homogénéisé immédiatement avec un vortex. Après 5 minutes de repos à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 595nm. L'essai est répété trois fois pour chaque extrait enzymatique.

✓ Expression des résultats

La concentration en protéines est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée par une série de dilution d'une solution mère contenant 1mg/mL du sérum albumine bovine (SAB) (Annexe 2, Tab.1). L'absorbance de la gamme étalon à la longueur d'onde 595 nm permet de tracer la courbe d'étalonnage (Annexe 2, Figure 1).

En fonction de la densité optique des protéines des extraits enzymatiques, leur concentration est calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.

Teneur en protéines (mg/mL) = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x la dilution de l'extrait enzymatique

II.2. Mesure des activités enzymatiques des extraits obtenus

II.2.1. Evaluation de l'activité coagulante

L'activité coagulante s'exprime par la rapidité avec laquelle l'enzyme coagule le lait ; elle est déterminée selon la méthode de BERRIDGE, (1955) (LIBOUGA *et al.*, 2006). Elle est basée sur l'évaluation visuelle de l'apparition des premiers flocons de la coagulation du substrat de Berridge et qui s'exprime en termes d'unité d'activité coagulante (U.A.C) ou d'unité présure (UP). Cette dernière est définie par la quantité d'enzyme contenue dans 1mL de la solution enzymatique qui peut coaguler 10 mL de substrat standard de Berridge en 100 secondes à 30°C (ALAIS, 1974 ; RAMET, 1997)

Le temps de floculation correspond au temps s'écoulant entre l'addition de l'extrait enzymatique (ficine ou extrait de fleurs de cardon) et l'apparition des premiers flocons de caséines visibles à l'œil nu sur la paroi interne de tube incliné subissant un lent mouvement de rotation (BENYAHIA-KRID, 2013).

L'activité coagulante exprimée en Unité Présure (UP) est calculée selon l'expression suivante :

$$\text{U.A.C} = \frac{100 \times V}{10 \times T \times v}$$

Où :

UP = unité présure ; **V** = volume de lait ; **10** = volume du substrat standard (10 mL) ; **v** = volume de l'extrait d'enzyme; **T** = temps de floculation en secondes ; **100** = temps de coagulation du substrat standard (100 secondes).

L'activité coagulante, donnée en UP/ml, est exprimée par la moyenne de trois essais répétés.

L'activité coagulante est également exprimée par la force coagulante (F). cette dernière, donnée en unité Soxhlet (US), représente le nombre de volumes de lait frais coagulé par un volume d'extrait coagulant, en 40min à 35°C (ALAIS, 1984, MAHAUT *et al.*, 2000 ; BENYAHIA-KRID, 2013).

Elle est calculée selon la formule suivante:

$$\text{F} = \frac{2400 \times V}{T \times v}$$

Où :

V: volume de lait ; v : volume de l'extrait de l'enzyme ; T : temps de coagulation en secondes ; 2400 : 40 x 60 secondes.

II.2.2. Détermination de l'activité protéolytique

Dans la présente étude l'activité protéolytique est dosée selon la méthode d'ANSON, (1938) décrite par LENOIR et AUBERGER (1977) et modifiée par MECHAKRA *et al.*, (1999).

✓ Principe

Le dosage de l'activité protéolytique par la méthode d'ANSON se base sur l'estimation de la quantité 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.

En effet, l'activité protéolytique de nos extraits enzymatiques est déterminée en employant la caséine comme substrat. Ainsi, lorsque la caséine est hydrolysée par une protéase, une quantité de tyrosine est libérée avec d'autres acides aminés. La réaction enzymatique est stoppée par l'addition du TCA, qui fait précipiter les protéines non attaquées par les extraits enzymatiques, puis les éliminer par différents procédés (centrifugation, filtration) (MECHAKRA *et al.*, 1999). La mesure de l'absorbance des peptides et des acides aminés libres restants en solution après coloration au réactif de Folin- Ciocalteu (réaction avec la Tyr et Trp), permet de mesurer l'activité protéolytique par spectrophotométrie à 750nm (SIDIKOU *et al.*, 2005).

✓ Mode opératoire

La manipulation est réalisée en deux étapes :

- 1. Réaction enzymatique :** il s'agit de faire agir l'extrait enzymatique (ficine et extrait de fleurs de cardon) sur le substrat (la caséine).

Le mélange réactionnel est préparé par addition de :

- 1 mL de l'extrait enzymatique décongelé juste avant le dosage ;
- 1,5 mL du tampon adéquat pour chaque extrait enzymatique (tampon acétate 0,1M pH 5,4 pour l'extrait des fleurs du cardon et le tampon phosphate 0,1M-pH 7 pour l'extrait brut de la ficine) ;
- 2,5 mL de substrat (solution de caséine à 1% préparée dans les tampons adéquats pour chaque enzyme).

Après agitation et incubation pendant 1 h au bain-marie à 40°C, la réaction est arrêtée par addition de 5 ml de TCA froid à 4%. Le mélange est laissé reposer 30 min dans un bain de glace (DEVI *et al.*, 2008) ; ce qui entraîne la précipitation des macromolécules, y compris l'enzyme et la caséine non hydrolysées. Il est ensuite centrifugé à 6200g pendant 5min à 4°C.

- 2. Dosage de l'activité :** la quantité de produit formé (la tyrosine) est dosée selon la méthode d'ANSON, (1938) :

0,5 mL du surnageant sont mélangés avec 2,5 ml de Na₂CO₃ à 2% préparé dans le NaOH (0,1N). Après agitation et incubation 15 min à température ambiante, 0,25 mL de réactif de *Folin-Ciocalteu* dilué au 1/4^{ème} sont ajoutés. Les mélanges sont bien agités et laissés reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant au moins 30 min, puis l'absorbance de la coloration bleue développée est lue à 750 nm (SIDIKOU *et al.*, 2005)..

L'absorbance de l'échantillon mesurée est transformée en concentration par référence à une courbe d'étalonnage.

La gamme-étalon est établie à partir d'une solution mère de tyrosine dont les concentrations sont comprises entre 0 et 100 µg /mL selon le même protocole décrit précédemment pour le dosage de l'activité (Annexe 2, Tab.2). Cependant, l'extrait enzymatique est remplacé par la solution de tyrosine. Les lectures au spectrophotomètre à 750 nm des différentes concentrations ont permis de tracer la courbe d'étalonnage (Annexe 2, Fig.2).

Un témoin négatif est préparé de la même manière, sauf que le TCA est rajouté avant le substrat.

✓ **Expression des résultats**

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

Activité protéolytique (µg/h.ml) = concentration déduite de la courbe d'étalonnage x dilutions de l'extrait enzymatique

A partir de l'activité protéolytique, une activité spécifique est calculée. Elle est définie comme étant le rapport entre l'activité enzymatique et la teneur en protéines de l'extrait enzymatique et exprimée en U/mg.

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

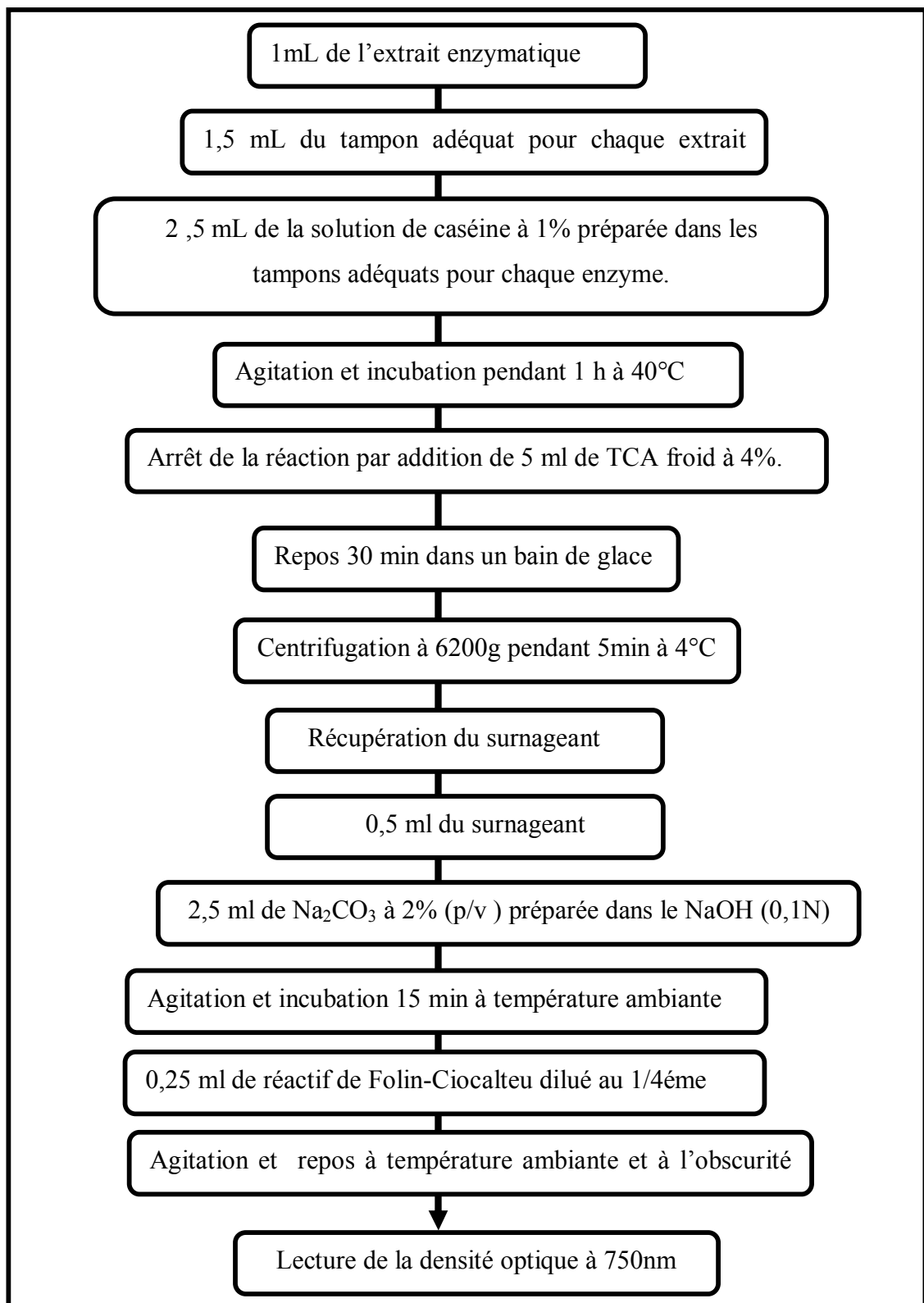


Figure 5: protocole opératoire pour le dosage de l'activité protéolytique.

II.3. Profil électrophorétique des extraits enzymatiques

Afin de déterminer les poids moléculaires des fractions protéiques contenues dans les extraits de fleurs de cardon et de la ficine l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) sur un gel discontinu a été appliquée selon la méthode décrite par LAEMMLI, (1970).

✓ Principe

De la même façon qu'un ion est accéléré dans un champ électrique, les protéines, qui ont une densité de masse moléculaire non nulle à un pH autre qu'à leur point isoélectrique, vont aussi déplacer à une vitesse proportionnelle à leur densité de masse moléculaire. Si on applique un champ électrique à une solution protéique, les protéines vont migrer à des vitesses différentes vers l'une ou l'autre des électrodes tout dépend de leurs taille, forme et charge électrique (HAMES *et al.*, 2006; JANSON, 2011).

Dans les conditions dénaturantes en présence d'un excès en SDS (détergent anionique puissant), ce dernier se fixe sur les protéines et les transforme en poly-anions linéaires due 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. En plus, le β -mercaptoethanol (agent réducteur) en combinaison avec la chaleur coupe les ponts disulfures internes des protéines établis par les résidus Cys (structure quaternaire) (KOOLMAN et ROHM, 2005; VOET *et* VOET, 2005).

✓ Mode opératoire

La préparation des échantillons consiste à dénaturer les protéines dans une solution de dénaturation dont la composition est : Tris/HCl 312,5 mM, EDTA 0,4 mM, SDS 7,5 %, glycérol 25 %, DTT 150 mM et bleu de bromophénol 0,05 %, le tout ajusté à pH 6,8.

La séparation a été réalisée sur un gel de concentration de 7,5% et un gel de séparation de 15% de polyacrylamide (p/v), la composition des gels est donnée au tableau 1.

Les extraits enzymatiques lyophilisés sont dissous à raison de 1mg/mL d'eau distillée. A 100 μ l de chaque échantillons, sont ajoutés 20 μ l de tampon de dénaturation . Les échantillons sont ensuite chauffés dans un bain Marie à une température de 90°C pendant 5 minutes afin d'accélérer la dénaturation.

Les dépôts sont réalisés dans les puits formés dans les gels après polymérisation. Sur chaque gel, une solution contenant des marqueurs de masses moléculaires est déposée dans le premier puits.

Le tampon d'électrophorèse ou tampon de migration (à pH 8,3) est constitué de Tris (25 mM), glycine (192 mM), SDS (0,1 %), et β -mercaptoéthanol 0,05 %. La migration se produit sous une tension de 80 volts pendant 15 à 20 min afin de concentrer les protéines dans le premier gel de concentration «Stacking» (Annexe 3). Ensuite elle se poursuit à 140 volts pendant 2 à 3 heures dans le deuxième gel de séparation «Revolving» (Annexe 3) qui permet de séparer les protéines selon un gradient de taille, par un maillage moléculaire.

A la fin de la migration, le gel est démoulé et mis dans une solution de fixation (30 % éthanol et 5 % acide acétique) pendant 30 minutes. Le gel est ensuite coloré (solution de 30% de l'éthanol, 5 % d'acide acétique et 0,1% de bleu de Coomassie R 250) pendant 2 heures sous agitation. Enfin, une décoloration du gel par des lavages successifs est effectuée sous agitation dans la solution de décoloration, qui a déjà servie pour la fixation. La décoloration se poursuit jusqu'à bonne lisibilité des bandes protéiques.

Tableau 1 : Composition des gels d'électrophorèse (SDS-PAGE)

Produit	Gel de séparation 15%	Gel de concentration 7,5%
Acrylamide-Bis à 30% (29 :1)	6,5 mL	2,5 mL
Tampon resolving (pH 8,8 TRIS-HCl 3M)	1,57 mL	/
Tampon stacking (pH 6,8 TRIS-HCl 0,5M)	/	2,5 mL
H ₂ O	4,725mL	4,89 mL
TEMED	6,25 μ L	10 μ L
APS (0,15g/mL)	70 μ L	100 μ L

✓ **Expression des résultats**

Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire d'une protéine et sa mobilité électrophorétique dans un gel de polyacrylamide. Une courbe étalon est établie afin de déterminer le poids moléculaire de la protéine étudiée avec $\text{Log (PM)} = f(\text{Rf})$ dont le Rf représente le rapport frontal de la protéine considérée. Ainsi nous avons utilisé un

kit de protéines de référence de poids moléculaires : 76 ; 66,4 ; 37 et 15 KDa. La représentation graphique du logarithme du poids moléculaire en fonction de la mobilité relative des protéines donne une droite (Annexe 2, fig. 4).

II.4. Conduite de la protéolyse des caséines par les extraits enzymatiques

La digestion enzymatique des protéines génère à la fois des acides aminés libres ainsi qu'une grande quantité de peptides. L'hydrolyse enzymatique permet de modifier les propriétés fonctionnelles et biologiques des protéines laitières d'origine et de diversifier ainsi ses domaines d'application (CORREDIG et DALGLEISH, 1997).

Dans le but d'obtenir des peptides à activité antimicrobienne par hydrolyse enzymatique des caséines bovine, ces protéines ont été soumises, chacune, à l'action des extraits enzymatiques préparés.

Pour chaque enzyme étudiée, des cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées pour une solution de caséine à 5% (5g de poudre de caséine dans 100ml du tampon adéquat pour chaque enzyme) incubée à 37°C.

L'hydrolyse par la ficine est réalisée à pH 7 (tampon phosphate, 0,1M) alors que l'hydrolyse par l'extrait de cardosines est réalisé à pH 5,4 (tampon acétate, 0,1M).

Les rapports enzyme/substrat appliqués pour chaque extrait enzymatique à été déterminé en effectuant une hydrolyse de 24h à différents rapports (E/S) :1/1000, 1/750, 1/500, 1/100, 1/50 et 1/10 P/P (p/p : poids de l'enzyme en gramme de solide par poids de la caséine en gramme).

Afin de suivre l'évolution de l'hydrolyse des prélèvements de protéolysat ont été effectués à des intervalles de temps suivants : 0, 5, 15, 30 et 45min, puis, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24h. On arrête l'hydrolyse par inactivation des enzymes. Les parties aliquotes prélevées ont été immédiatement chauffées à 90°C pendant 15 min pour arrêter la protéolyse par dénaturation thermique de l'enzyme (DI PIERRO *et al.*, 2014). Après ce traitement thermique, les parties aliquotes sont congelés à (-20°C) jusqu'à analyse et caractérisation.

L'activité antimicrobienne est recherchée dans les différents prélèvements réalisés comme indiqué ci-dessous.

II.5. Caractérisation des hydrolysats obtenus

II.5.1. Evaluation quantitative de l'hydrolyse par la méthode de l'orthophtaldialdéhyde (OPA)

Le degré d'hydrolyse (DH) correspond au nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons. Dans ce travail nous avons utilisé la méthode de l'orthophtaldialdéhyde (OPA).

✓ Principe

La méthode OPA est préconisée pour suivre la cinétique d'hydrolyse des protéines du lait ; elle est basée sur la réaction de l'orthophtaldialdéhyde (OPA), en présence du β -mercaptoethanol, avec les groupements aminés relâchés lors de l'hydrolyse des protéines (figure 6). Le complexe donne un composé détectable à 340 nm (CHURCH *et al.*, 1983; NIELSEN *et al.*, 2001).

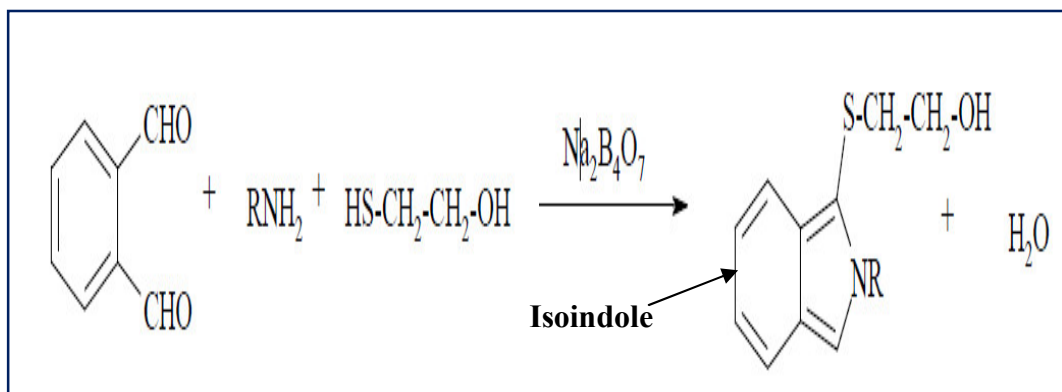


Figure 6: Réaction de l'orthophtaldialdéhyde (OPA) avec les groupements amines

✓ Mode opératoire

La réaction OPA est effectuée selon CHURCH *et al.* (1983). Le réactif OPA est préparé journalièrement en mélangeant dans une fiole de 50 mL : du sodium tetraborate 0,1M (25 mL), du SDS 20% P/V (2,5 mL), de l'OPA (40 mg dissout dans 1mL de méthanol) et du β -mercaptoethanol (100 μ L).

Pour mesurer le DH, 50 μ L d'échantillon sont ajoutés directement à une cuvette contenant 1 mL du réactif OPA. La solution est agitée par inversion et incubée 2 min. à la température ambiante, puis l'absorbance est lue à 340 nm contre un blanc constitué comme indiqué ci-dessus en remplaçant l'échantillon à analyser par 50 μ l du tampon employé pour préparer l'échantillon à tester.

✓ Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage est établie avec la L-Leucine de 0 à 1 mg/mL. Le taux de groupements (NH₂) est ainsi exprimé en mg/mL (Annexe 2, fig. 4). Les valeurs de DH sont les moyennes d'au moins trois répétitions.

Le degré d'hydrolyse (DH) est obtenu par la formule :

$$\text{DH \%} = \frac{(\text{nombre de groupements NH}_2)_{\text{ech}}}{(\text{nombre de groupements NH}_2)_{\text{ht}}} \times 100$$

Où :

- (Nombre de groupements NH₂) échantillon : nombre des liaisons peptidiques dans chaque hydrolysats, déterminé de la courbe d'étalonnage en fonction de l'absorbance à 340nm et exprimé en mg/mL de leucine.
- (Nombre de groupements NH₂) ht : nombre des liaisons peptidiques totale, exprimé en mg/mL de leucine, déterminé en procédant à une hydrolyse poussée par la pepsine utilisé a une concentration de 5% pendant 24 heures (BENKHELIFA *et al.*, 2005).

II.5.2. Evaluation qualitative de l'hydrolyse par électrophorèse

L'analyse électrophorétique sur SDS-PAGE des hydrolysats caséiniques permet d'évaluer la disparition des bandes correspondant aux caséines natives, ainsi de visualiser l'évolution de la population peptidique en fonction du temps d'hydrolyse.

Les hydrolysats de caséines obtenus sous l'action des deux extraits enzymatiques ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivant la méthode de Laemmli (1970) comme indiqué ci-dessus.

Les masses des protéines et des peptides de l'échantillon analysé sont déterminés en comparant leur mobilité avec celle de la caséine native.

III. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DES HYDROLYSATS DES CASEINES BOVINES

Les tests d'activité antibactérienne, ont été réalisés sur les peptides produits par l'hydrolyse enzymatique de 6 heures avec les extraits bruts de ficine et de cardosines.

Souche testes

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées : 5 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Rockville, MD, USA), *Listeria innocua* LMG 11387, *Listeria*

monocytogenes ATCC 3512 (CM/NCTC, UK), *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Enterococcus faecalis* et une souche à Gram-négatif : *Escherichia coli* (DH5).

La détection de la présence de peptides actifs dans les hydrolysats enzymatiques des caséines est réalisée selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Le test de l'activité antibactérienne sur milieu solide repose sur la diffusion de l'agent antimicrobien au sein de ce milieuensemencé avec une souche cible.

La méthode utilisée pour doser l'activité antibactérienne est celle de diffusion par puits sur gélose décrite par BERGHE et VLIETINCK (1991). Le principe de cette méthode est similaire à la technique classique de l'antibiogramme (CHABBERT 1963).

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24h) en phase de croissance exponentielle. Les étapes de la préparation des suspensions des souches pathogènes à partir des stocks sont :

- Enrichissement des souches par repiquage de 200 μ L du stock contenant la souche pathogène dans 10 mL bouillon nutritif. Suivi d'une agitation et incubation à 37°C pendant 18h.

- Un milieu solide Müller Hinton (MH) estensemencé par écouvillonnage en trempant un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne d'enrichissement.

- Après avoir creusé des puits à l'aide de l'extrémité d'une pipette Pasteur stérile sur la surface des boites contenant la gélose MHensemencé par les bactéries tests, on remplit chaque puits par 50 μ L d'hydrolysate.

Les boites de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30 minutes, ensuite mises à l'étuve à la température de 37 °C.

A chaque essai, un témoin négatif et un témoin positif sont également testés, afin de valider l'activité antimicrobienne des échantillons testés. Le témoin négatif, permettant la croissance des souches bactériennes, correspond à la caséine native. Quant au témoin positif, un antibiotique (bactériocine), la nisine, il permet d'inhiber la croissance des souches bactériennes testées.

La lecture peut se faire dès qu'on a un début de croissance des bactéries. Ce début de croissance est observable à partir de 16h d'incubation.

Le teste est considéré positif lorsqu'on obtient un halo translucide autour du puits, identique à la gélose stérile. Selon la taille du diamètre, on peut déterminer la catégorie de la bactérie vis-à-vis de l'agent antimicrobien, à savoir sensible, intermédiaire et résistante et aussi déterminer le degré d'inhibition (Figure 7).

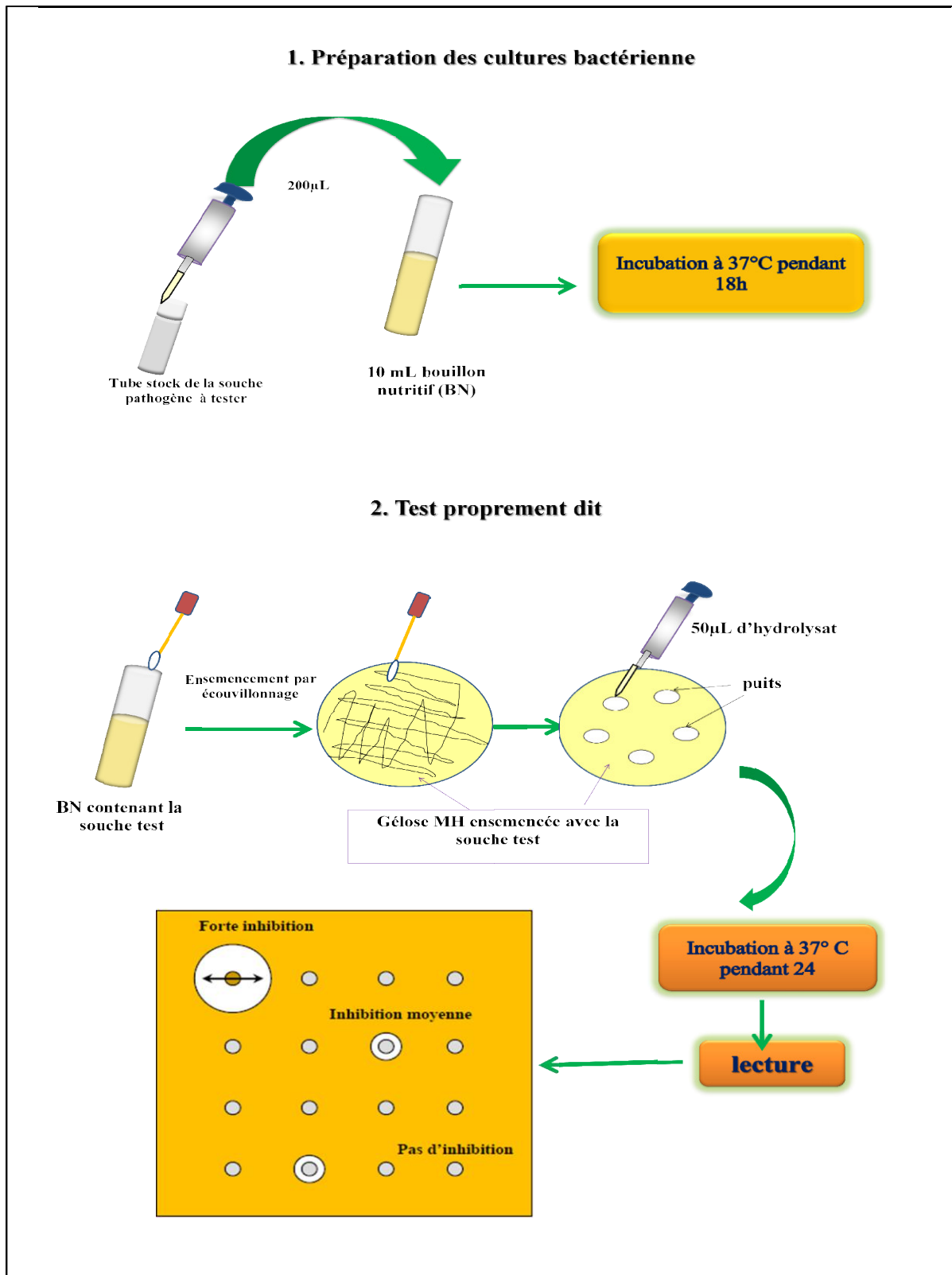


Figure 7: Représentation schématique de protocole de l'activité antibactérienne

Partie 03 :

RESULTATS ET DISCUSSION

I. CARACTERISTIQUES DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

I.1. Caractéristiques de l'extrait brut de la ficine

L'extraction de la ficine brute à partir du latex de *Ficus carica L* est effectuée par centrifugation (14000g pendant 15 min à 4°C). Les caractéristiques de l'extrait de ficine obtenu sont présentées en tableau 1.

Tableau 1: Caractéristiques de l'extrait brut du latex de *Ficus carica*

Caractéristiques	Ficine
Rendement (%)	77,14
Taux de protéine (mg/mL)	113,89 ± 5,5
pH	5,8±0,1
Extrait sec (%)	19±0,01
Couleur	Brune claire
Texture	Visqueux

Le latex de *Ficus carica* utilisé dans ce travail contient approximativement 22,86% (v/v) des gommés. La solution aqueuse (surnageant) (pH 5,8±0,1), de couleur brune claire et de texture visqueuse.

Le surnageant obtenu contient 81% eau (62,48% par rapport au volume du latex frais), et 19% matière sèche (14,65% par rapport au volume total du latex frais) et une teneur en protéines de 113,89 mg/mL. La récupération du système enzymatique, à l'état brut, à partir du latex de figuier est de 77,14% de rendement.

Un travail réalisé par ZARE *et al.*, (2013) a montré que le latex de *F. carica* contient environ 20% gommés, 70 % d'eau, 10,24 % matière sèches dont 10% protéines et environ 90% de ces protéines ont une activité protéolytique.

SIAR (2014) a trouvé une teneur en protéine de 89,31± 0,96 mg/mL avec un rendement de 71,42%. FADYLOGLU (2001) ; WILLIAMS *et al.* (1968) ont évalué un taux en protéines de 116 mg/mL et 156 mg/mL respectivement. Elle est inférieure à celle obtenue par DEVARAJ *et al.* (2008b) pour la ficine extraite de latex de *Ficus racemosa* qui est de 156 mg/mL.

I.2. Caractéristiques de l'extrait brut des fleurs de cardon

La quantité moyenne de fleurs de cardon qui peut être récupérée varie selon les dimensions des capitules. Dans ce travail nous avons utilisé des capitules de petites tailles ayant un poids moyens de 50 g, donc pour un kilogramme (22 capitules), 250 g de fleurs fraîches sont récupérées. Donc le rendement est de 25% en fleurs fraîches. Après séchage, nous n'avons récupéré qu'environ 100,15g, soit un rendement de 10,05% en fleurs sèches (10g de fleurs sèche pour 100g de capitule). Ainsi pour un kilogramme de capitule ZIKIOU (2013) a pu récupérer 200 g de fleurs fraîches et 60g de fleurs sèches, soit un rendement de 6% (6g de fleurs sèche pour 100g de capitule).

L'avantage d'utiliser le cardon pour obtenir des enzymes protéolytiques est la facilité de récupération des fleurs à partir des capitules. Le majeur inconvénient reste dans sa disponibilité qui est limitée pendant la saison d'hiver en Algérie et dans sa faible activité coagulante (NOUANI *et al.*, 2009).

L'extraction a été faite à partir de 10g de fleurs sèches macérés dans 100 mL du tampon acétate de sodium (0,1M et pH=5,4), soit un rapport de 1/10 (1g de fleurs/ 10mL volume tampon d'extraction). De ce fait, nous avons pu récupérer une quantité de 81 mL d'extrait.

Le tableau 2 donne les caractéristiques de l'extrait brut obtenu à partir de 10g des fleurs sèches de cardon.

Tableau 2 : Caractéristiques de l'extrait obtenu à partir de 10g de fleurs sèches de cardon.

Caractéristiques	Extrait de fleurs de cardon
Rendement (%)	81
Taux de protéine (mg/ml)	2,88± 0,169
pH	5,59±0,01
Extrait sec (%)	2±0,05
Couleur	Brunâtre
Texture	Liquide

L'extrait des fleurs de cardon que nous avons obtenu est une solution brunâtre et se caractérise par un pH égal à 5.59, d'un extrait sec total est égal à 2% et d'une teneur en protéines de 2,88mg/mL. Cette concentration en protéines est proche à celle trouvée par MALCATA *et al.* (1998) ; NOUANI *et al.* (2009) qui sont de 4,54 mg/ ml et 5,6 mg/mL

respectivement. Elle est largement inférieure à celle rapporté par ZIKIOU (2013) qui est 26 mg/mL.

Cette concentration en protéine totale de la préparation enzymatique brut est relativement basse comparée à la masse de la matière brute utilisée.

Le rendement est étroitement lié aux différents facteurs et conditions d'extraction qui méritent une optimisation notamment au niveau des rapports de la masse des fleurs à la solution de macération ainsi que la durée, le pH et la température d'extraction.

I.3. Caractéristiques des activités enzymatiques des extraits

Les extraits enzymatiques bruts de la ficine et de la cardosine obtenus sont caractérisés par l'activité coagulante, la force coagulante et l'activité protéolytique (tableau 3).

Tableau 3 : Activités enzymatiques des extraits bruts de la ficine et de fleurs de cardon

Activité enzymatique	Extrait brut de la ficine	Extrait brut de fleurs de cardon (cardosine)
Activité coagulante (UP/mL)	188,89±1,52	1,31±0,22
Force coagulante (F)	45 575,38±377	342,85±48,88
Activité protéolytique ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	24075±0,16	142,5±0,26
Protéines (mg/mL)	113,89± 5,5	2,88± 0,169
Activité protéolytique spécifique ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}/\text{mg}$)	211,38	49,47

Les résultats indiquent que l'extrait brut de la ficine possède une activité coagulante de 188,89 U.P, cette valeur est proche à celle trouvé par SIAR (2014), WILLIAMS *et al.* (1968) qui ont trouvé 121,09 U.P et 320 U.P respectivement. Elle est largement inférieure à ceux rapportés par NOUANI *et al.* (2009) estimée à 1500 U.P.

La force coagulante de la ficine est de 1/45 575. Cette force est légèrement supérieure à celle rapportée par SIAR (2014) et NOUANI *et al.* (2009) qui ont trouvé 1/42 000 et 1/40 000 respectivement. En termes de quantité de lait coagulable, 1mL de cet extrait enzymatique peut coaguler environ 45 litres, donc en termes de rendement d'extraction par rapport au volume initial du latex frais 10 mL de latex peuvent coaguler environ 346,95 litres de lait.

Concernant l'activité coagulante de l'extrait de fleurs de cardon nous avons trouvé une valeur de 1,31UP pour 1mL, donc l'activité coagulante totale rapporté au volume d'extraction et à l'unité de masse de fleurs sèches est de 106,11 unité présure totales et 10,61 UP par 1g de fleurs sèches respectivement, une activité inférieure à celle mentionnée par ZIKIOU (2013), MARTINS *et al.* (1996) qui ont obtenu respectivement un extrait ayant une activité coagulante de 27,78 UP et 47,64 UP/g de fleurs sèches.

En termes de force coagulante, un litre de cet extrait peut coaguler 342,85 litres de lait, donc, 10g de fleurs sèches peuvent coaguler environ 27,77 litres de lait, une force qui semble inférieure à celle trouvée par ZIKIOU (2013) qui a trouvé que 10g de fleurs sèches peut coaguler environ 76,37 litres de lait. Notre valeur est proche à celle donnée par NOUANI *et al.* (2009) qui ont trouvé que 1L de l'extrait de fleurs de *Cynara scolymus* peut coaguler 400 litres de lait.

L'activité coagulante de l'extrait de fleurs de cardon est également inférieure à celles donnée par les caillettes de veau et de proventricules de poulet. En effet, selon ALAIS (1984), 10g de caillette de veau peut coaguler environ 830 litres, et selon BENYAHIA-KRID (2013), 100g de proventricules de poulet peut coaguler jusqu'à 13 142 litres de lait.

L'extrait coagulant brut de la ficine comporte un nombre d'unités présure plus élevé, comparé à celui de la cardosine. De même, la force coagulante (F) de l'extrait brut de la ficine est plus élevée en comparaison avec celle de l'extrait de fleurs de cardon.

L'activité protéolytique des extraits bruts de la ficine et de la cardosine a été étudiée par la méthode de LENOIR et AUBERGER (1977) modifiée par MECHACRA (1999).

Les résultats obtenus (Tableau 3) montrent que l'activité protéolytique, exprimée par le taux de tyrosine libéré, de l'extrait de ficine, est de 24 075 μ g/mL. h et celle de l'extrait de fleurs de cardon est de 142,5 μ g/h. mL.

Ces résultats indiquent que l'activité protéolytique de l'extrait de ficine est très élevée et elle est 169 fois plus élevée que celle de l'extrait de fleurs de cardon.

Quant à l'activité protéolytique spécifique nous avons obtenu une valeur de 211,38U/mg de protéine pour l'extrait de la ficine, elle est 4 fois supérieure à celle de l'extrait de fleurs de cardon qui est estimée à 49,47U/mg de protéines.

L'activité protéolytique excessive de la ficine a été signalée par plusieurs auteurs (LYNN *et* CLEVETTE-RADFORD, 1986 ; ONER *et* AKAR, 1993; FADYLOGLU, 2001; NOUANI *et al.*, 2009 ; FACCIA *et al.*, 2012, SHAH, *et al.*, 2014 *et* SIAR, 2014). L'activité protéolytique de l'extrait de ficine estimée par SIAR (2014) est 469,7 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$; FADY'LOGUE a trouvé une valeur de 320 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{min}$ (19 200 $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$).

Le séchage des fleurs semble affecter l'activité protéolytique de l'extrait de fleurs de cardon. En effet, ESTEVES (1995) a constaté que le processus de séchage diminue l'activité protéolytique de l'extrait brut, en particulier l'activité de la cardosine B ; puisque c'est la plus puissante enzyme protéolytique dans la fleur de cardon, ce qui affectera donc considérablement l'activité protéolytique dans l'ensemble de l'extrait enzymatique (VERISSIMO *et al.*, 1996).

Toutefois, l'activité protéolytique de la cardosine reste grande comparée à celle de la présure. En effet, CORDEIRO *et al.* (1992) ont remarqué que l'extrait des fleurs de cardon a une activité protéolytique trois fois plus importante que celle de la présure. Le même résultat était constaté par MACEDO *et al.* (1996). Quant à ROSEIRO *et al.* (2003) *et* CLAVERIE *et* HERNANDEZ (2007) ont mentionné que l'activité protéolytique des extraits des fleurs du genre *Cynara* est environ le double de celle de la présure.

HEIMGARTNER *et al.* (1990) *et* CORDEIRO *et al.* (1992), ont expliqué cette excessive activité protéolytique de l'extrait de fleurs de *Cynara cardunculus*, comparée à celle de la présure, par l'action non spécifique des protéases végétales vers les autres fractions de la caséine (caséines α_s *et* β).

De même, FOX *et* MCSWEENEY (1998); WALSTRA *et al.* (1999) ont signalé que la ficine manifeste une activité protéolytique excessive due à son action non spécifique envers les autres caséines (α *et* β).

Cette activité protéolytique non spécifique des protéases végétales vers les fractions des caséines α_s *et* β est responsable de l'amertume *et* le faible rendement fromager, ce qui limite leur utilisation dans la fabrication des fromages (AKAR *et* FADYLOGLU, 1999).

I.4. Profil électrophorétique des extraits enzymatiques

Dans le but de localiser *et* de visualiser les bandes protéiques des extraits bruts des fleurs de cardon *et* de la ficine, une électrophorèse SDS-PAGE a été réalisée.

Le profil électrophorétique des deux extraits (extrait brut de la fleur de cardon, extrait brut de la ficine) est présenté dans la figure 1.

Dans l'extrait de fleurs de cardon, nous remarquons, la présence de plusieurs bandes dont celles des poids moléculaires de 31 et 15 kDa. Selon la littérature, elles représentent les deux peptides de la cardosine A, deux autres bandes, moins intenses, ayant des poids d'environ 34 et 14 kDa sont détectées, elles représentent les deux peptides de la cardosine B (VERISSIMO *et al.*, 1995). De même ZIKIOU, 2013 a trouvé le même profil électrophorétique de l'extrait de la fleur complète. Les deux peptides ayant les poids moléculaires proches de 11 et 20 kDa sont également observés et supposés être des impuretés.

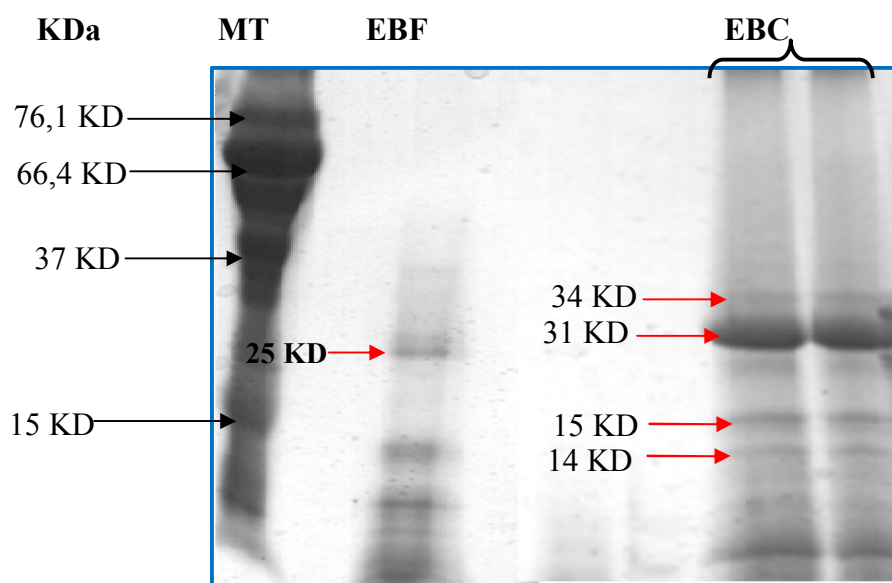


Figure 1: Profil électrophorétique sur SDS-PAGE des extraits enzymatiques (MT : marqueurs de taille, EBF : extrait brut de la ficine et EBC : extrait brut de fleur de cardon)

Concernant le profil électrophorétique de l'extrait de la ficine, nous remarquons la présence de trois bandes très intenses, dont l'une correspond à un poids moléculaire de 25 KDa, qui pourrait être se rapporter à la ficine qui a un poids moléculaire compris entre 23 KDa et 26 KDa, selon la bibliographie (SIAR, 2014 ; DEVARAJ *et al.*, 2011 ; PAYNE, 2009 ; DEVARAJ *et al.*, 2008b ; KATSAROS *et al.*, 2008 ; LAWE, 1976). Les autres bandes sont probablement des impuretés ou sont des peptides issus de l'autolyse de la ficine (AZARKANE *et al.*, 2011).

II. Caractéristiques générales des hydrolysats des caséines bovines obtenus

L'objectif de cette partie d'étude était d'une part le suivi de l'hydrolyse des caséines bovines par les deux extraits enzymatiques préparés, permettant l'obtention d'activité antimicrobienne et d'autre part d'étudier partiellement la population peptidique libérée au cours des cinétiques d'hydrolyse par la mesure du degré d'hydrolyse et par analyse électrophorétique des hydrolysats obtenus à différents temps d'hydrolyse.

II.1. Suivi quantitatif du degré d'hydrolyse par la méthode d'OPA

Le degré d'hydrolyse (DH) se rapporte au pourcentage de liaisons peptidiques coupées durant l'hydrolyse.

La méthode OPA a été utilisée dans la présente étude. La présence de SDS dans la solution d'OPA sert à inactiver l'enzyme et assure une pleine exposition des groupements aminés (WANG *et al.*, 2013).

Le DH a été calculé à partir de la teneur de l'hydrolysate prélevé en composés aminés libérés suite à la protéolyse.

II.1.1. Hydrolyse par la ficine

Afin de déterminer les meilleures conditions permettant d'obtenir des peptides antimicrobiens sous l'action de la ficine sur la caséine, l'hydrolyse a été menée, en appliquant différents rapports E/S : (1/1000, 1/750, 1/500 et 1/100) sur une solution de caséine à 5% (5g de poudre de caséine solubilisée dans 100mL du tampon phosphate 0,1M, pH 7), et maintenue à 37°C. L'évolution de l'hydrolyse a été suivie par la mesure du degré d'hydrolyse (DH) à différentes intervalles de temps suivants : 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min et 24h.

Les cinétiques qui traduisent l'évolution du DH en fonction du temps sont résumées dans la figure (2).

L'allure de quatre courbes montrent clairement 3 phases au cours de l'hydrolyse enzymatique, une phase rapide qui dure 1 heure pour toutes les ratios E/S. Ensuite une phase de latence qui persiste jusqu'à 6 heures pour tous les rapports appliqués; et un plateau qui vient après cette phase. La première phase correspond à la transformation rapide du substrat, résultant du ratio optimal enzyme/substrat, qui optimise la réaction enzymatique. La phase de latence correspond à la diminution de l'activité enzymatique suite à la réduction de la quantité

de substrat. Le plateau qui survient après cette phase résulte ainsi de la conversion complète du substrat.

D'après la figure 2, nous constatons que les cinétiques d'hydrolyses possèdent toutes le même profil. L'hydrolyse démarre dès l'ajout de l'enzyme, avec une vitesse importante durant la première heure pour se stabiliser et atteindre un plateau à partir de la 1^{ère} et 2^{ème} heure et qui va jusqu'à la 6^{ème} heure d'hydrolyse.

A la fin, les valeurs de DH pour les caséines au bout de 24h d'hydrolyse sont de 56,7% avec le rapport 1/100, 40,9% avec le rapport 1/500, 36% pour le rapport 1/750 et 29,68 pour le rapport 1/1000.

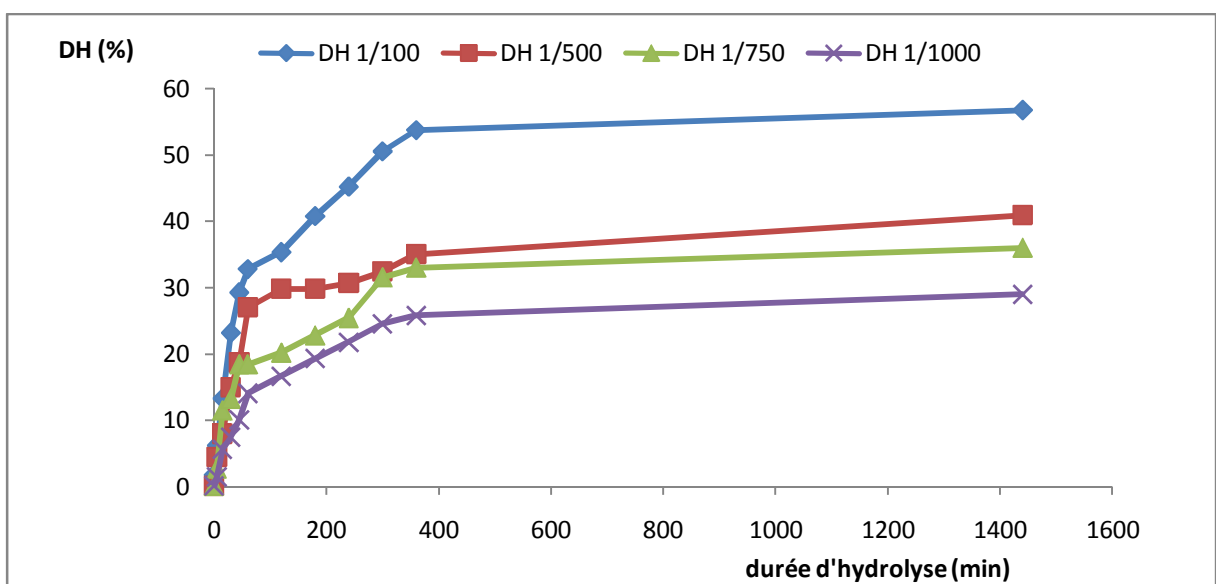


Figure 2: Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de l'extraits enzymatique brut de la ficine (E/S : 1/100, 1/500 et 1/750, 1/1000).

Nous remarquons que la valeur obtenue à 6h d'hydrolyse (54,19%) avec le rapport 1/100 est de même ordre de grandeur que celle obtenue à 24 h d'hydrolyse (56,7%) confirmant ainsi l'inutilité de poursuivre aussi longtemps la protéolyse.

II.1.2. Hydrolyse de la caséine par l'extrait de fleurs de cardon

Nous avons réalisé une hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon à pH 5,4 et à 37°C. L'évolution de l'hydrolyse a été suivie par la mesure du degré d'hydrolyse (DH) à différentes intervalles de temps suivants : 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 300 min, 360 min et 24h.

Vue la faible activité protéolytique de l'extrait de fleurs de cardon nous avons écarté les faibles rapports enzyme/substrat, les rapports qui sont retenus sont 1/100, 1/50 et 1/10.

Les résultats obtenus avec les différents rapports E/S appliqués sont illustrés dans la figure (3).

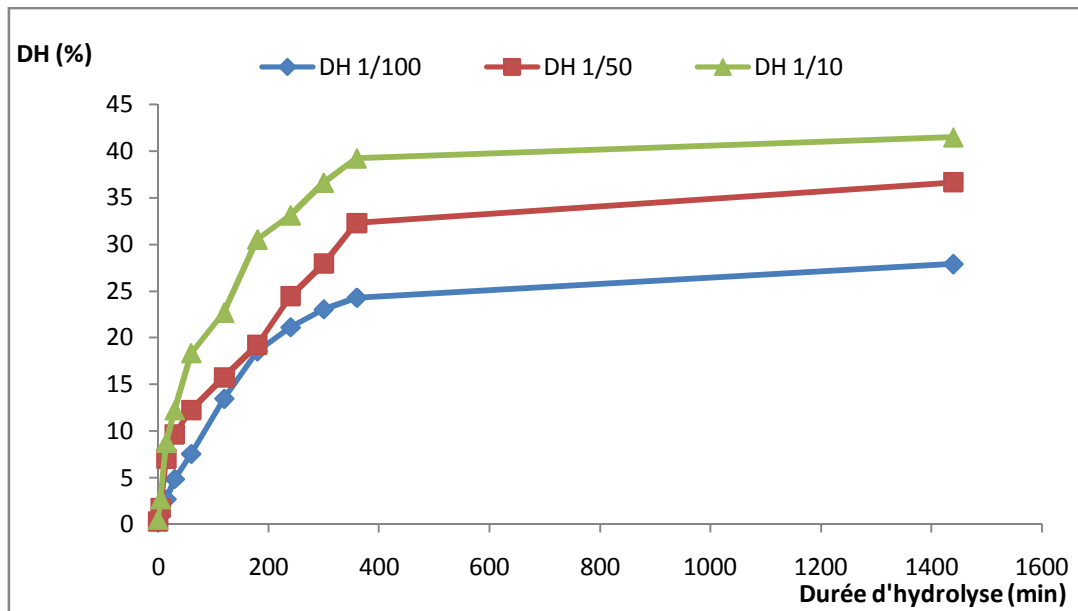


Figure 3: Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon (E/S : 1/100, 1/50 et 1/10).

Comme le montre la Figure 3, le DH augmente rapidement dans les premières temps d'hydrolyse, vue la haute concentration du substrat. Le DH atteint après 24 h d'incubation est de 41,48% pour le rapport 1/10, 36,62% pour le rapport 1/50 et 27,9% pour le rapport 1/100. Nous remarquons qu'au bout de 6h d'incubation l'hydrolyse n'est encore pas achevée.

CAVALLI *et al.* (2008) ont rapporté un degré d'hydrolyse de 32% de la β caséine et 55% de l' α_s caséine après 3h d'hydrolyse par la cardosine.

La comparaison des cinétiques pour le même rapport E/S : 1/100 d'hydrolyse des caséines par les deux extraits enzymatiques, montre une phase d'augmentation rapide du DH, durant les deux premières heures, suivie par une phase de vitesse réduite (figure 4). Le degré d'hydrolyse maximale atteint après 6 h est de 24,9% et 54,19% pour l'extrait de fleurs de cardon et la ficine respectivement.

Les résultats obtenus indiquent que le degré d'hydrolyse des caséines par la ficine est nettement plus important que celui obtenu avec l'extrait de fleurs de cardon.

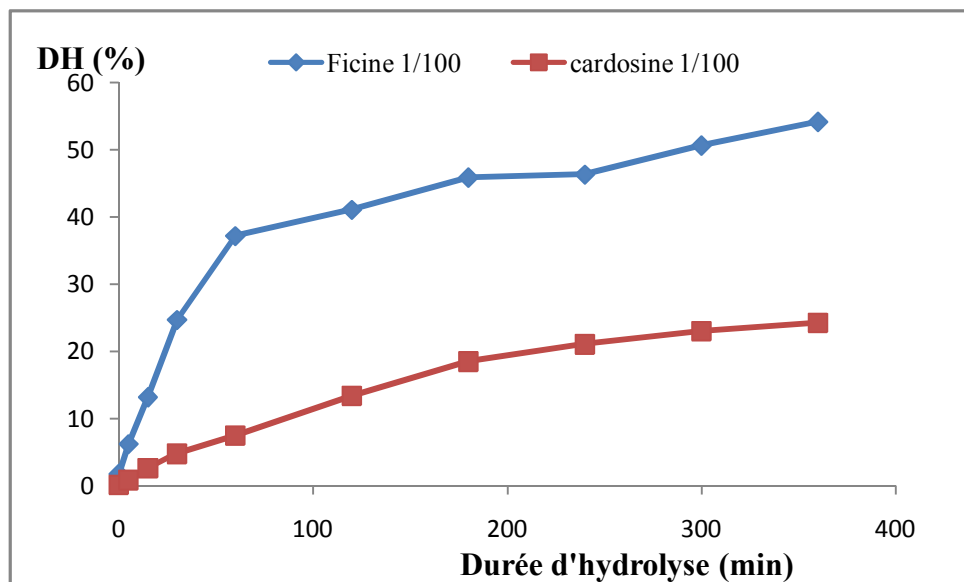


Figure 4: Comparaison des cinétiques de l'hydrolyse avec la ficine et la cardosine à un ratio 1/100

II.2. Profils moléculaires électrophorétiques des peptides obtenus

Dans le but de suivre l'évolution qualitative de l'hydrolyse et d'étudier l'action de l'extrait de la ficine et de fleurs de cardon sur les caséines bovines en fonction de la concentration E/S, nous avons analysé par SDS-PAGE en conditions dénaturantes les rapports 1/1000 et 1/100 pour les hydrolysats de la ficine et les rapports 1/10, 1/50 et 1/100 pour les hydrolysats obtenus sous l'action de l'extrait de fleurs de cardon. Les profils de dégradation des caséines pendant les différents temps d'hydrolyse sont montrés par les électrophorégrammes en figures 5, 6, 7, 8 et 9.

Ainsi, pour le rapport E/S : 1/100 l'examen de profil de dégradation des caséines par la ficine indique la disparition totale des bandes correspondantes aux différentes fractions des caséines (CN- α s, CN- β et CN- k), dès le début de l'hydrolyse (5min) (Figure 5). Nous observons également l'apparition de peptides de faible poids moléculaire dans les 5 et 15 min d'hydrolyse puis la disparition de celles-ci après 30min d'incubation. Cela laisse supposer que l'augmentation notée du taux de fonction α amine libre, exprimé par le DH, est due à l'hydrolyse secondaire des peptides issus de l'hydrolyse primaire des caséines.

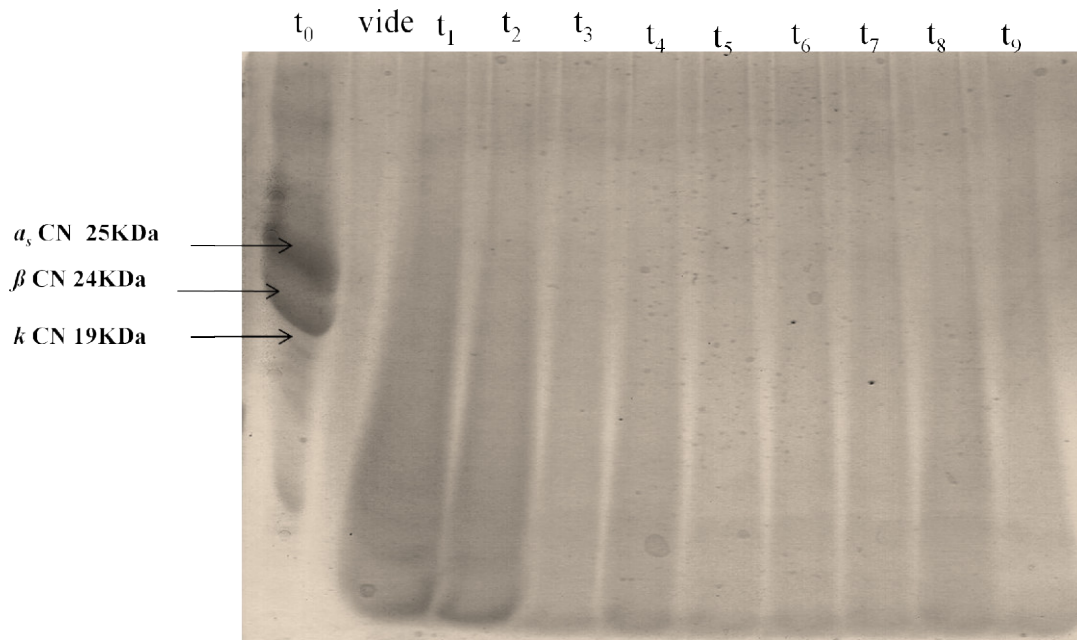


Figure 5 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la ficine (E/S : 1/100) (t_0 : Caséine ; t_1 : 5min ; t_2 : 15min; t_3 : 30min ; t_4 : 1h ; t_5 : 2h ; t_6 : 3h ; t_7 : 4h ; t_8 : 5h; t_9 : 24h).

Pour une quantité E/S (1/1000) plus faible la disparition totale du substrat n'était qu'au de 45min d'hydrolyse. Cependant, la caséine α_s était totalement dégradée par la ficine après 5 min d'hydrolyse (Figure 6), de même l'hydrolyse de la β -CN par la ficine est également complète après 5 min d'hydrolyse. Par contre la digestion de la caséine kappa est achevée au bout de 45min d'incubation.

Les profils électrophorétiques montre que l'extension de l'hydrolyse est plus poussée pour l'hydrolyse à un rapport E/S : 1/100 que celle à 1/1000. Des bandes correspondants aux peptides de faibles poids moléculaires ont persisté jusqu'à 24h d'hydrolyse à 1/1000 (figure 6) alors que toutes les fractions peptidique ont disparait pour le ratio 1/100 après 5 min d'hydrolyse.

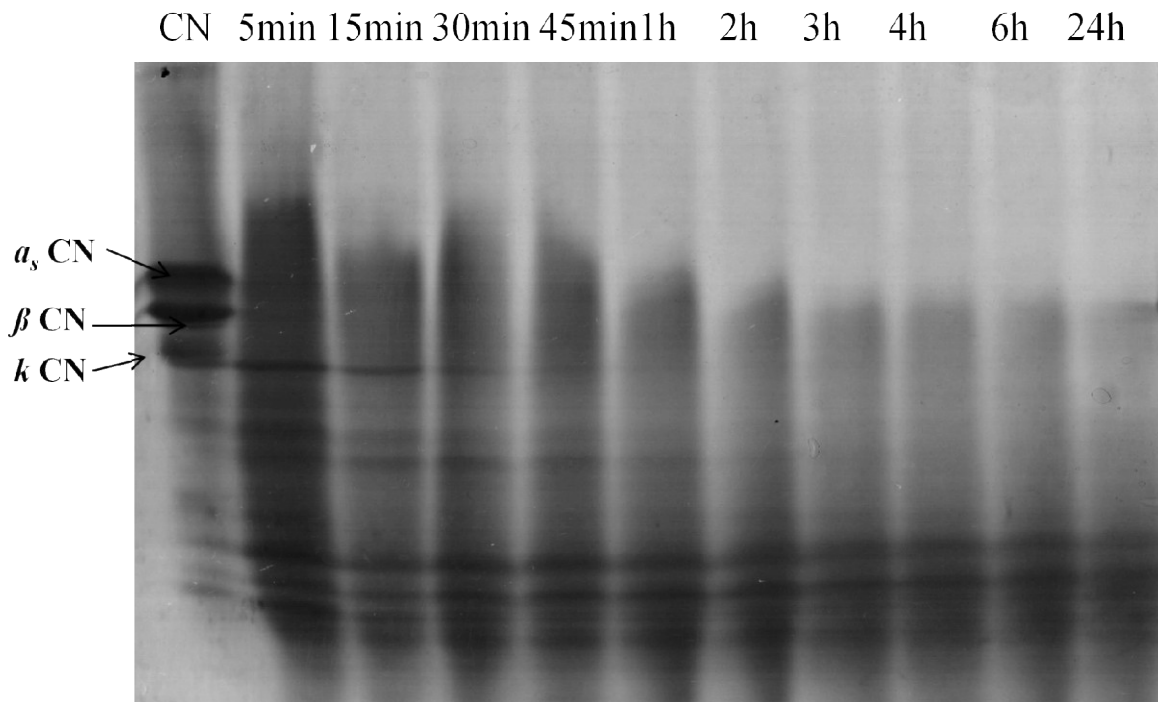


Figure 6: Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par la ficine (E/S : 1/1000) (t_0 : Caséine native).

L'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon est réalisée dans les mêmes conditions indiquées pour la ficine. L'action de l'extrait de fleurs de cardon sur la caséine bovine est suivie dans les différents ratios E/S. Les figures 7, 8 et 9 montrent les profils électrophorétiques des protéolysats de la caséine bovine obtenus à différents rapports E/S.

D'après les profils électrophorétiques des trois rapports E/S appliqués, l'action de l'extrait de fleurs de cardon sur les caséines bovines se traduit par une dégradation progressive des fractions caséiniques en peptides intermédiaires qui donnent à leur tour des peptides finaux. Ces peptides apparaissent durant les premiers temps d'hydrolyse (de 5 min à 30 min d'hydrolyse). Mais leurs concentrations diminuent au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse.

L'hydrolyse des caséines par l'extrait de fleurs de cardon à un rapport E/S : 1/10 laisse apparaître plusieurs bandes et qui persiste jusqu'à 6h d'incubation, leur disparition totale est observé au bout de 24 d'hydrolyse (figure 9).

Les différentes fractions de la caséine ont disparait au bout de 2h d'incubation pour le E/S 1/10 alors que pour les autres rapports E/S (1/100 et 1/50) il persiste jusqu'à 6h d'incubation (figure 7, 8).

D'après les trois profils électrophorétiques correspondants aux différents rapports E/S nous observons que la caséine α_s était moins sensible à l'hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon, elle reste intacte jusqu'à 2h à 1/10 alors qu'elle persiste jusqu'à 6h pour les ratios 1/50 et 1/100.

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par LLORENTE *et al.* (2014) où ils ont trouvé que la caséine α_s est moins sensible à l'action de la cardosine extraite à partir des fleurs de *Cynara scolymus* et après 60 min d'hydrolyse la dégradation n'était qu'à partielle.

L'apparition de peptides intermédiaires au début de l'hydrolyse, en parallèle à la dégradation du substrat peut être expliqué, pour la caséine, par sa structure native non globulaire et ouverte due principalement à la présence de plusieurs résidus prolines qui interrompent la structure secondaire et entraîne ainsi la formation d'une structure tertiaire ouverte avec une flexibilité conformationnelle plus grande que celle des protéines globulaires (GUO *et al.*, 1995). Cela offre une abondance des liaisons accessibles pour les deux extraits enzymatiques.

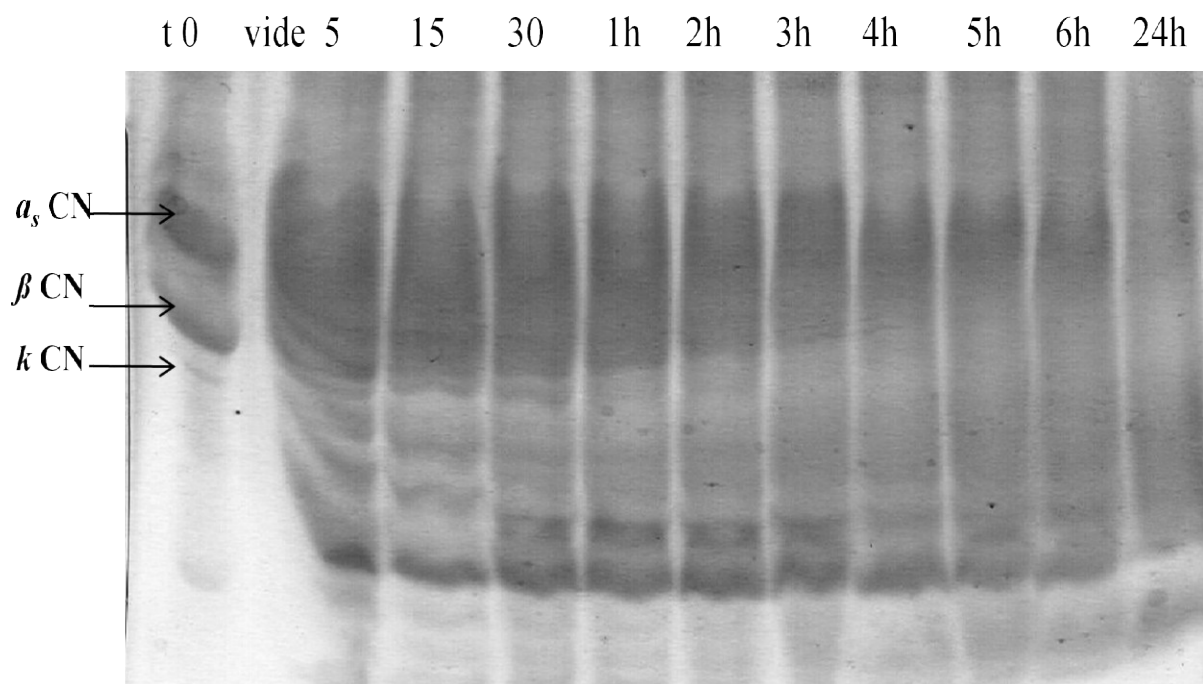


Figure 7: Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de cardon (E/S : 1/100) (t_0 : Caséine native).

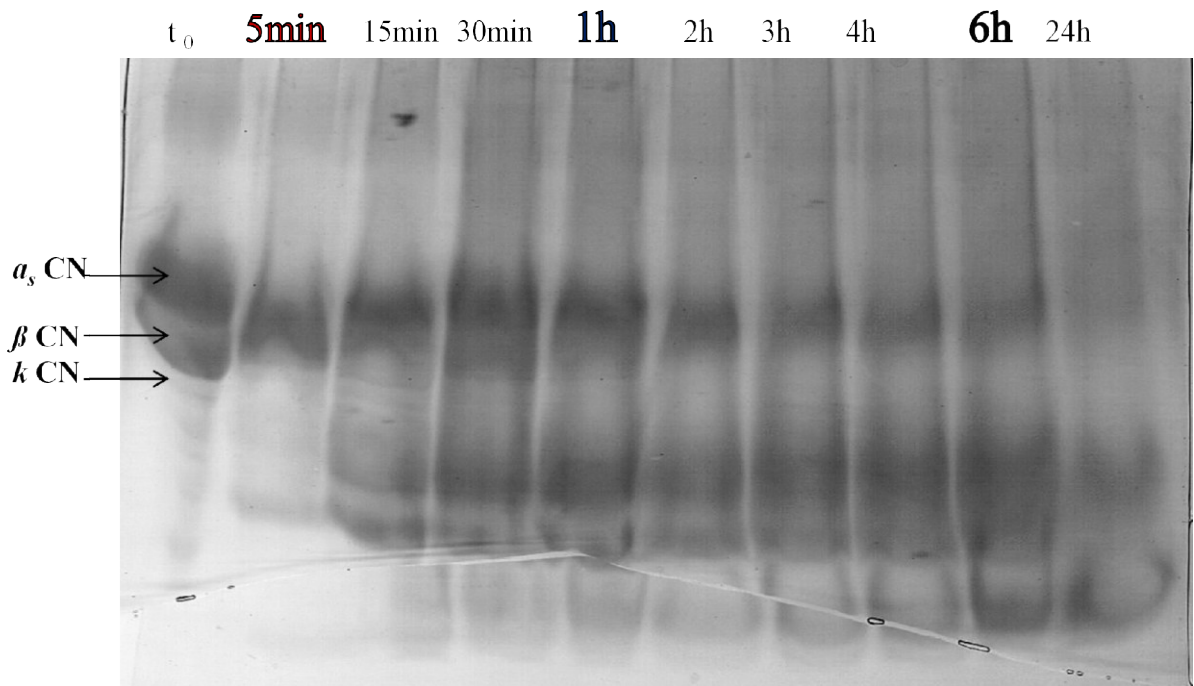


Figure 8 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de carbon (E/S : 1/50) (t_0 : Caséine native)

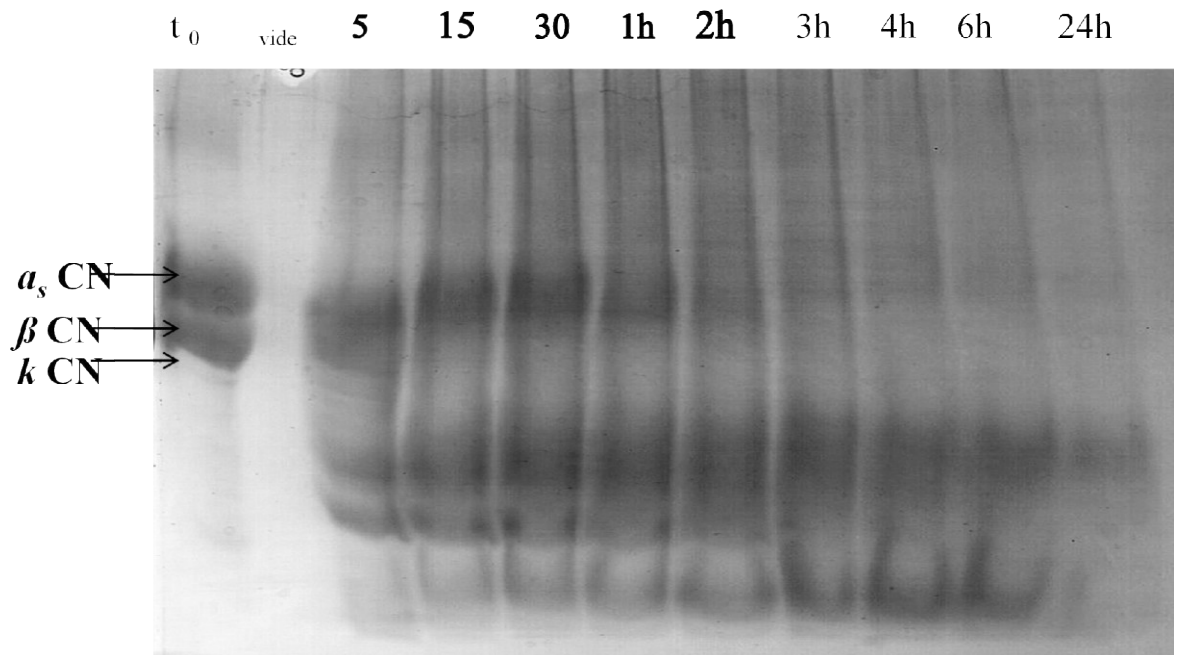


Figure 9 : Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse de la caséine bovine par l'extrait de fleurs de carbon (E/S : 1/10) (t_0 : Caséine native).

II. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des hydrolysats des caséines bovines

Il est de plus en plus montré que l'hydrolyse enzymatique des caséines (essentiellement par des enzymes digestives ou microbiennes) génère des peptides à activité biologique (CLARE et SWAISGOOD, 2000 ; KORHONEN et PIHLANTO, 2003; YAMAMOTO, EJIRI et MIZUNO, 2003 ; ADOUI, 2014). La recherche de nouveaux peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse de caséine par des nouvelles protéases semble donc intéressante.

L'objectif de cette partie de l'étude est la mise en évidence de peptides ayant une activité antimicrobienne issus de l'hydrolyse des caséines bovines par les protéases végétales extraite à partir du latex de figuier (ficine) et de fleurs de cardon (cardosine).

L'activité antibactérienne est recherchée dans les hydrolysats des caséines bovines, issus des différents rapports enzymes/substrats appliqués pour les deux extraits enzymatiques (1/1000, 1/750, 1/500, 1/100, 1/50 à 1/10, p/p). L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion en puits décrite par BERGHE et VLIETINCK (1991). Les hydrolysats sont testés contre 5 souches à Gram positif ; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria innocua* LMG 11387, *Listeria monocytogenes* ATCC 3512, *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *Enterococcus faecalis* et une souche à Gram-négatif : *Escherichia coli* (DH5).

L'activité antibactérienne est détectée par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après 24 heures d'incubation à 37°C de la souche bactérienne avec l'hydrolysats à tester.

Les hydrolysats bruts ont été testés sur l'ensemble des souches bactériennes. Lors de chaque test, un témoin négatif et un témoin positif ont été réalisés. Le témoin négatif correspond à la caséine native et le témoin positif à la nisine.

Sous les conditions d'hydrolyses appliquées seuls, le ratio E/S de 1:100 pour l'hydrolyse par la ficine et les ratios 1/10, 1/50 et 1/100 pour l'hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon ont donné des activités inhibitrices (Figures 10 et 11). Bien que, l'activité a été recherchée dans les hydrolysats obtenus à différents intervalles de temps d'hydrolyse et à différents rapports E/S pour les deux extraits enzymatiques employés.

Les résultats obtenus, de l'activité antimicrobienne des hydrolysats, effectués sur les différentes souches microbiennes sont résumés dans les Tableaux 4, 5, 6 et 7.

Les tableaux (4, 5, 6 et 7) montrent que la caséine native (t_0), ne présente pas d'activité antimicrobienne vis-à-vis les souches testées, tandis que plusieurs hydrolysats de caséine produits sous l'action des deux protéases inhibent la croissance de quatre souches bactériennes (*Listeria innocua* LMG 11387, *Listeria monocytogenes* ATCC 3512, *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (DH5). Aucun des hydrolysats n'étant actif vis-à-vis les souches *S. aureus* et *B.subtilis*.

Sur l'ensemble des hydrolysats testés et qui ont montré une activité inhibitrice, seuls les hydrolysats de la première heure d'hydrolyse ont donné une activité inhibitrice pour les deux extraits enzymatiques. Ce sont les hydrolysats obtenus à 5 minutes, 15min, 30 minutes, 45min et 1h, qui présentent une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches bactériennes sensibles.

Sachant que la nisine est une bactériocine (peptide antimicrobien) produit par certaines bactéries lactiques du genre *Lactococcus lactis* et qui est active que sur les bactéries Gram positive (MOTA-MEIRA *et al.*, 2000). Nous avons noté une activité inhibitrice de certains hydrolysats de caséines issus de l'action des deux extraits enzymatiques sur (*E. coli*) avec des zones d'inhibition très claires.

Tableau 4: Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par la ficine 1/100

Protéolysats	Souches cibles					
	<i>L.innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
Ficine 1/100						
T0	-	-	-	-	-	-
5 min	-	-	-	-	+	-
15 min	-	-	+	-	+	+
30 min	+	-	+	-	+	+
45 min	+	-	+	-	+	+
1 h	-	-	+	-	+	+
2 h	-	-	-	-	-	-
3 h	-	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-	-
5 h	-	-	-	-	-	-
6 h	-	-	-	-	-	-

Note : + : présence de zone d'inhibition, - : absence de zone d'inhibition.

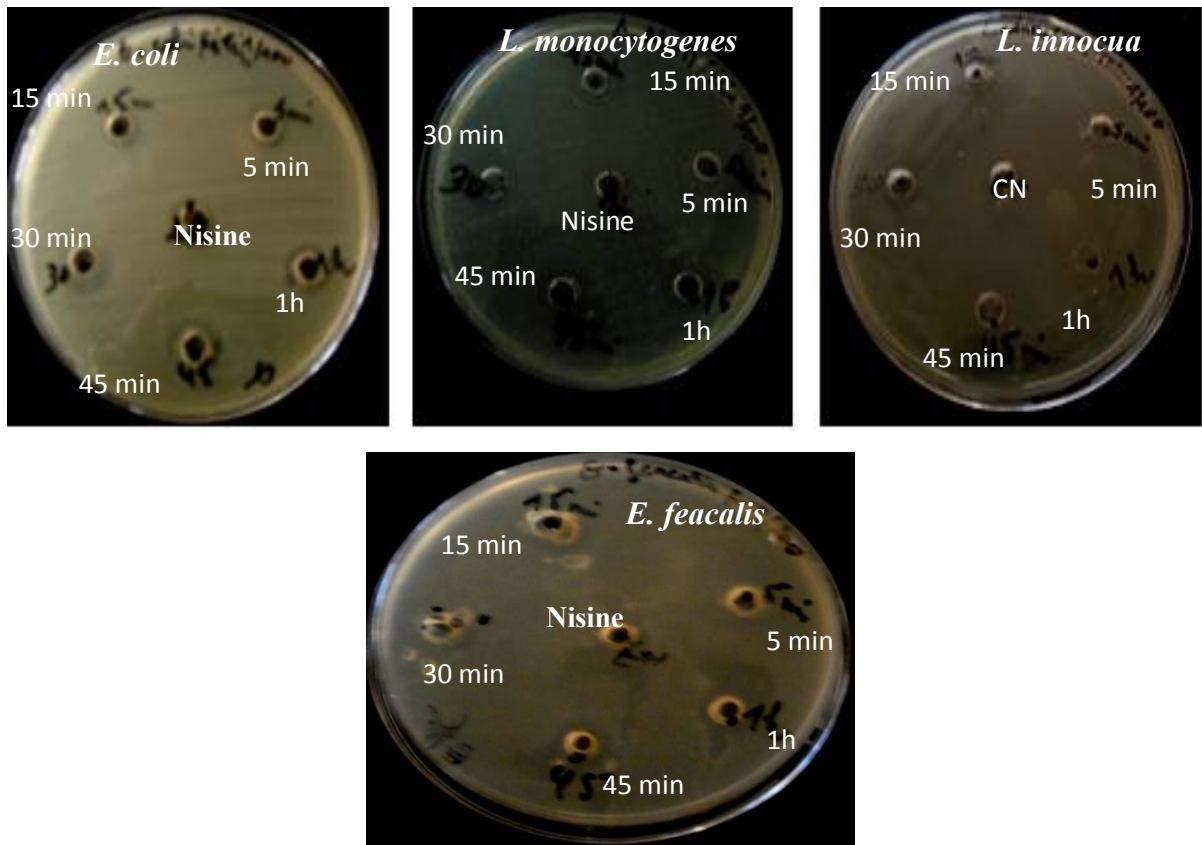


Figure 10 : Photos des résultats de l'activité antibactérienne des hydrolysats de la ficine.

Tableau 5: Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ratio E/S : 1/10

Protéolysats	Souches cibles					
	<i>L.innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. feacalis</i>
Cardosines 1/10						
T0	-	-	-	-	-	-
5 min	+	-	+	-	-	+
15 min	+	-	+	-	+	+
30 min	-	-	+	-	+	+
45 min	-	-	+	-	+	+
1 h	-	-	+	-	+	+
2 h	-	-	-	-	-	-
3 h	-	-	-	-	-	-
4 h	-	-	-	-	-	-
5 h	-	-	-	-	-	-
6 h	-	-	-	-	-	-

Note : + : présence de zone d'inhibition, - : absence de zone d'inhibition.

Tableau 6 : Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ratio E/S : 1/50

Protéolysats	Souches cibles					
	<i>L.innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.feacalis</i>
Cardosines 1/50						
T0	—	—	—	—	—	—
5 min	+	—	+	—	—	—
15 min	+	—	+	—	+	+
30 min	+	—	+	—	+	+
45 min	+	—	+	—	+	+
1 h	+	—	+	—	+	+
2 h	—	—	—	—	—	—
3 h	—	—	—	—	—	—
4 h	—	—	—	—	—	—
5 h	—	—	—	—	—	—
6 h	—	—	—	—	—	—

Note : + : présence de zone d'inhibition, - : absence de zone d'inhibition.

Tableau 7 : Résultats de l'activité antimicrobienne des hydrolysats produits par l'extrait de fleurs de cardon ratio E/S : 1/100

Protéolysats	Souches cibles					
	<i>L.innocua</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.feacalis</i>
Cardosines 1/100						
T0	—	—	—	—	—	—
5 min	—	—	—	—	—	—
15 min	—	—	—	—	—	—
30 min	—	—	+	—	—	—
45 min	—	—	+	—	—	—
1 h	—	—	+	—	—	—
2 h	—	—	—	—	—	—
3 h	—	—	—	—	—	—
4 h	—	—	—	—	—	—
5 h	—	—	—	—	—	—
6 h	—	—	—	—	—	—

Note : + : présence de zone d'inhibition, - : absence de zone d'inhibition.

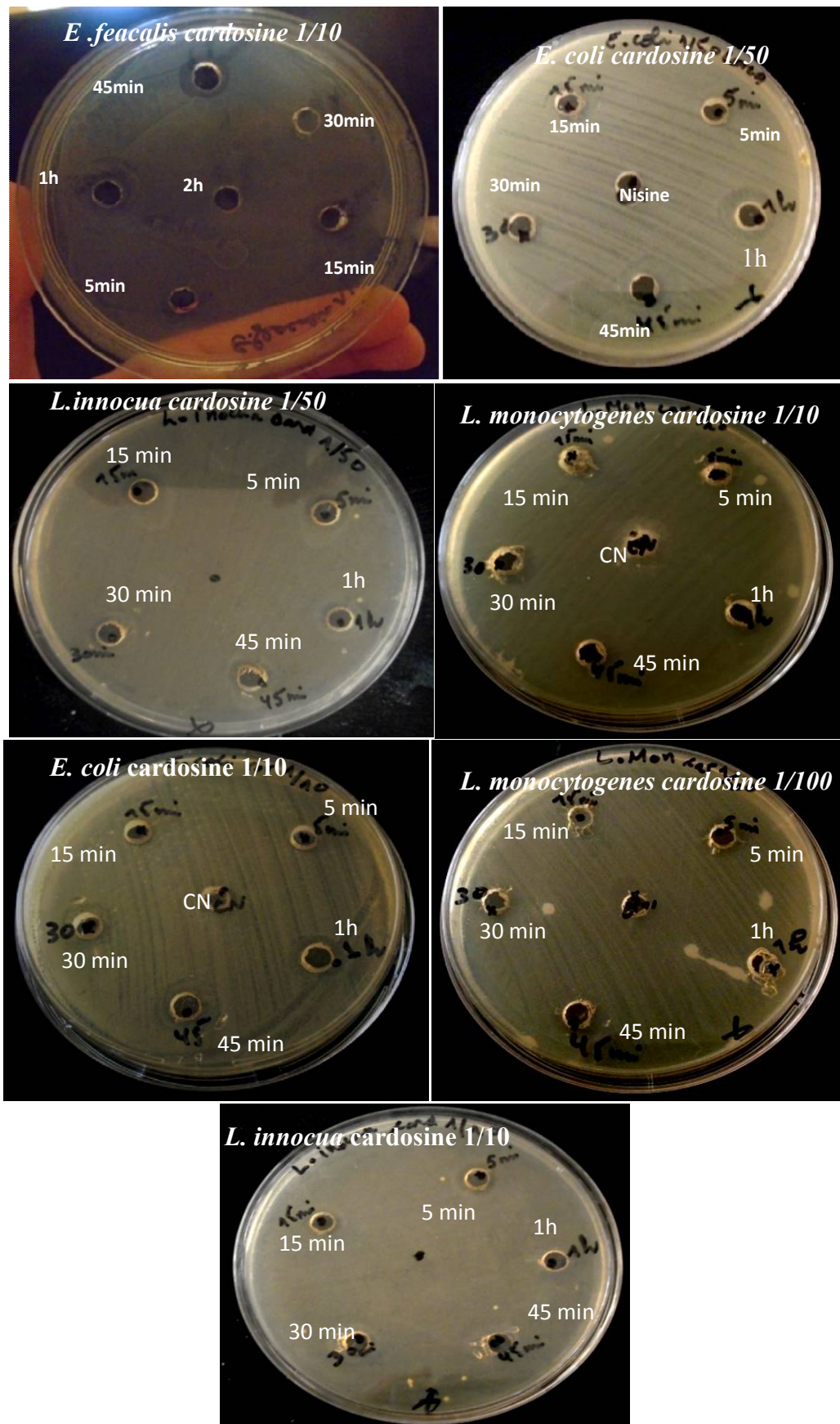


Figure 11 : Photos des résultats de l'activité antibactérienne des hydrolysats de la cardosine.

Les travaux réalisés dans cette étude ont permis de mettre en évidence la présence des peptides présentant une activité antimicrobienne dans les hydrolysats bruts des caséines bovines générés sous l'action des extraits enzymatiques végétales extraites à partir du latex de *Ficus carica* et de fleurs de *Cynara cardunculus*. Ainsi, nous avons constaté que les hydrolysats bruts obtenus avaient une activité antimicrobienne contre les souches (*E. coli*, *L.innocua*, *L.monocytogenes* et *E.feacalis*). Ces bactéries sont parmi les principaux agents pathogènes incriminés dans les infections et les intoxications alimentaires.

L'activité antimicrobienne de ces hydrolysats peut être attribuée à l'action synergétique des différentes séquences peptidiques et/ou à la présence de peptides actifs qui se sont libérés durant l'hydrolyse. Toutefois ; il semble que ces peptides sont libérés dans le milieu réactionnel à différents degrés d'hydrolyse (DH).

En effet, sous l'action de la ficine les peptides antimicrobiens sont obtenus à des taux d'hydrolyses correspondent aux degrés d'hydrolyse 6,24%, 13,25%, 24,75, 30,67% et 37,21%. Selon le profil moléculaire électrophorétique il s'agit probablement des peptides intermédiaires de faible poids moléculaire.

L'action de la cardosine libère également des peptides actifs à des degrés d'hydrolyse plus faible et l'activité antimicrobienne a été obtenue pour les trois rapports E/S entre 5min et 1h d'hydrolyse correspondant des degrés d'hydrolyse entre 1,7% et 18,32%.

Toutefois aucune activité antimicrobienne n'a pu être détectée dans les hydrolysats obtenus sous l'action de ces protéases avec les taux d'hydrolyse plus poussés ce qui suggère la disparition des peptides responsable de l'activité, cela est confirmé dans les gels d'électrophorèse.

Plusieurs études indiquent la possibilité de générer des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de caséines bovines (RECIO et VISSER, 1999 ; MC CANN *et al.*, 2006). De même ADOUI (2014) a trouvé des zones d'inhibition nettes observées pour les hydrolysats pepsique obtenus à partir de 15 min jusqu' à 24h d'hydrolyses contre *E. coli* CIP 54127, *E. coli* JM109, *E. coli* DH5 *L. innocua* LMG, *B. subtilis* ATCC, *L.monocytogenes* ATCC.

Nous pouvons expliquer nos résultats par la spécificité d'action des enzymes utilisées qui a influencé la cinétique d'hydrolyse de la caséine de même que la génération des hydrolysats avec ou sans effet antimicrobien.

Etant donnée, que la ficine est une endopeptidase à cystéine avec une large spécificité d'hydrolyse des liaisons contenant des acides aminés non chargés, aromatiques et / ou hydrophobes (Gln, Val, Leu, Ala, Arg, His, Ser et Asn) (Di PIERO *et al.*, 2014).

En raison de ce clivage préférentiel, la ficine tend à produire des hydrolysats riches en résidus His, Leu, Pro et d'autres acides aminés cationiques et hydrophobes (Lys, Arg, Ala, Gly, Phe, Ile et Val). Plusieurs études ont établie que la présence de ces acides aminés dans les séquences peptidiques est associée à la présence d'activité antibactérienne (MARSHALL et ARENAS, 2003 ; WANG et WANG, 2004 ; HANCOCK *et al.*, 2006).

En effet, (CATIAU *et al.*, 2011a et 2011b) indiquent que la présence de la tyrosine (Y), arginine (R) et d'un acide aminé basique tel que la lysine (K) ou l'histidine (H) est requise pour l'activité antimicrobienne de ces peptides. En outre, plusieurs études ont indiqué que la présence des régions cationiques et hydrophobes, dans la séquence peptidique, influence considérablement l'activité antimicrobienne (CLARE, 2003 et AKALIN, 2014).

L'activité antimicrobienne donnée par les hydrolysats obtenus sous l'action de l'extrait de fleurs du cardon peut être également expliquée par la spécificité d'action de la cardosine qui est une endopeptidase aspartique, sa spécificité se situe de préférence au niveau des acides aminés hydrophobes et aromatique tels que la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (RAWLINGS *et al.*, 2012), et qui peuvent générer des peptides ayant une activité antibactérienne (MARSHALL et ARENAS, 2003 ; WANG et WANG, 2004 ; HANCOCK et al., 2006).

La caséine bovine par sa richesse en acides aminés hydrophobes et aromatiques semble un substrat approprié pour l'action des deux extraits enzymatiques pour générer le maximum de peptides présentant un effet antimicrobien.

La plupart des peptides antimicrobiens possèdent environ 50% de résidus hydrophobes (HANCOCK et SAHL, 2006). La β -CN bovine est significativement plus hydrophobe que les autres caséines à cause de son grand hydrophobicité du côté C-terminale, par conséquent, sa digestion par la ficine et/ ou les cardosines peut libérer des fragments très hydrophobes. En effet, une relation structure-fonction entre la séquence d'acides aminés et le pouvoir antimicrobien peut être postulée.

DZIUBA et DZIUBA (2014) ont prédit *in silico* une séquence peptidique (EMPFPK) de poids moléculaire de 747.91Da, ayant un effet antimicrobien dans l'hydrolysate de β -CN produit sous l'action de la ficine.

Les résultats obtenus suggèrent que la spécificité de l'enzyme utilisée pour la production de l'hydrolysate ainsi que le degré d'hydrolyse obtenue sont importants, car la taille des peptides générés par un type d'enzyme ne sont pas nécessairement appropriées à la production des peptides antimicrobiens.

En conclusion, L'hydrolyse enzymatique est une des méthodes les plus répandues pour la production des peptides bioactifs. La variété des peptides libérés, aussi bien quantitative que qualitative, dépend fortement des conditions opératoires de protéolyse, c'est-à-dire de la nature de la protéase (spécificité de coupure), le rapport enzyme/substrat, de la durée de la réaction mais aussi du pH et de la température (T) (ARNOLDS *et al.*, 1998).

Le travail effectué jusqu'ici ne nous a pas permis d'aller plus loin dans l'identification des peptides responsables de l'activité inhibitrice et leur mécanisme d'action. Ainsi, il serait intéressant de continuer ce travail dans la perspective de séparer et de caractériser davantage la population peptidique contenue dans l'ensemble des hydrolysats bruts.

CONCLUSION

Cette étude entre dans le cadre des travaux menés par l'équipe T.E.P.A. portant sur la recherche des peptides bioactifs par hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires. À travers cette étude, nous avons tenté d'apporter une contribution à la recherche des nouvelles sources d'enzymes hydrolysant les caséines bovines, à partir des plantes locales en vue de leur utilisation dans la préparation des peptides ayant un effet antimicrobien. Les extraits enzymatiques en questions sont extraits à partir du latex de figuier (*Ficus carica*) et des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*), et qui sont anciennement employés dans la fabrication des fromages traditionnels Algériens.

Les diagrammes d'extraction que nous avons appliquée nous ont permis d'avoir des extraits enzymatiques ayant les caractéristiques suivantes :

- Pour la ficine une activité coagulante de 188,89 U.P., une force coagulante de 1/45 575,38, une teneur en protéine de 113 mg/mL. Le rendement d'extraction est estimé à 77%. Son activité protéolytique est de 24075µg d'équivalent tyrosine/mL d'extrait enzymatique et par heurs d'hydrolyse.
- Pour l'extrait de fleurs de cardon une activité coagulante de 1,31 U.P, une force coagulante de 1/342,85 un taux en protéine de 2,88 mg/mL avec un rendement d'extraction de 81%. Son activité protéolytique est estimée à 142,5 µg/mL d'extrait enzymatique et par heurs d'hydrolyse.
- Le profil électrophorétique des deux extraits enzymatiques montre que l'extrait de fleurs de cardon contient les deux cardosines A et B, et la ficine présente un poids moléculaire de 25KDa.

Le suivi de l'hydrolyse jusqu'à 24h d'incubation par la méthode d'OPA montre que l'augmentation de la concentration en enzyme conduit à l'augmentation du degré d'hydrolyse et qui se traduit par une libération plus importantes des groupements a-aminés libres

L'analyse électrophorétiques des hydrolysats générés montre que l'extension de l'hydrolyse est plus poussée au fur et à mesure que le rapport E/S augmente. Ainsi, sous l'action de la ficine à un ratio E/S : 1/100 l'intensité de l'hydrolyse est largement grande que celle à 1/1000. Sous l'action de l'extrait de fleurs de cardon les différentes fractions de la caséine ont disparait au bout de 2h d'incubation pour le E/S 1/10 alors que pour les autres rapports E/S (1/100 et 1/50) il persiste jusqu'à 6h d'incubation.

Les conditions d'hydrolyse mises au point dans cette étude, ont permis l'obtention de plusieurs hydrolysats présentant une activité antimicrobienne. Ainsi, les rapports E/S : 1/10, 1/50 et 1/100 pour l'hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon et le rapport 1/100 pour l'hydrolyse par la ficine semblaient les meilleurs ratios qui ont donnés des activités inhibitrices contre trois souche Gram + : *Listeria innocua* LMG 11387, *Listeria monocytogenes* ATCC 3512, *Enterococcus faecalis* et une souche à Gram-négatif : *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus ont démontré une activité significative pour certains hydrolysats obtenus avec la ficine et la cardosine et qui dépend du temps d'hydrolyse. Cette étude établit clairement le lien entre l'enzyme utilisée et le potentiel des hydrolysats comme source d'agents antimicrobiens, ce qui laisse la possibilité de réaliser d'autres hydrolysats avec des enzymes végétales pour obtenir des peptides antimicrobiens. Toutefois, l'utilisation d'enzymes avec des seuils de coupure connus semble présenter plus d'intérêt, principalement pour faciliter l'identification des peptides intéressants.

A partir de ces premiers résultats encourageants, plusieurs orientations méritent d'être recommandées en vue d'offrir plus de possibilités de générer des peptides d'intérêt et d'optimiser leur utilisation ; les propositions suivantes en sont des exemples.

- L'identification et la purification de la molécule antimicrobienne active générée lors de l'hydrolyse par la ficine et les cardosine de caséine bovine ;
- L'application de techniques de séparation et de fractionnement sur les hydrolysats actifs obtenus afin de préparer des extraits enrichis en peptides antimicrobiens permettant leur emploi dans le milieu alimentaire ;
- Poursuivre la purification des peptides en vue d'une meilleure identification et caractérisation ;
- La concentration minimale d'inhibition (CMI) et la nature, bactériostatique ou bactéricide, de l'activité des fragments peptidiques actifs sont également un 'objet d'appréciation ;
- L'exploitation d'autres activités biologiques, vu que les hydrolysats obtenus au cours de cette étude possèdent des peptides de petite taille, potentielle source d'activités biologiques ;
- Etudier l'activité antimicrobienne des peptides obtenus sur des autres germes connus pathogènes et/ou d'altération des aliments ;
- Etudier et optimiser la possibilité d'emploi de ces peptides actifs dans la conservation des aliments;

- Evaluer de la présence de peptides bioactifs dans les fromages fabriqués par ces extraits enzymatiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

A

ADLER-NISSEN J. (1977)

Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry*, 12, 18-19.

ADLER-NISSEN J. (1979)

Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 27, 12.

ADLER-NISSEN J. (1986)

Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, N.Y., U.S.A.

ADOUI F. (2014)

Peptides antimicrobiens préparation à partir de protéines laitières. Thèse de doctorat en science alimentaire présentée à l'université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires. 183 P.

AGRAWAL A. A & KONNO K. (2009)

Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 40, 311–331.

AKALIN A.S. (2014)

Dairy-derived antimicrobial peptides: Action mechanisms, pharmaceutical uses and production proposals. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 36, 79–95.

ALAIS C. (1974)

Principes des techniques laitières : science du lait. Ed : Publicité, Paris. 513 p.

ALAIS C. (1984)

Science du lait. Principes des techniques laitières. Ed. SEPAIC, 4ème édition, 814p.

AKAR B., ET FADYLOGLU S. (1999)

Teleme production by purified ficin. *Journal of Food Quality*, 22, 671-680.

AMIOT J. and G.J. BRISSON. (1985)

L'utilisation des actions enzymatiques pour modifier la valeur nutritionnelle et propriétés fonctionnelles des matières protéiques végétales. livre: *Protéines Végétales*,: p. 551-578.

ANDRES E et DIMARCQ J.L. (2007)

Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments : mise à jour. *Revue générale : Médecine et maladies infectieuses* 37 (2007) 194-199.

ANONYME (1993)

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

ANSON M.L. (1938)

The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.*, **22**; 79–89.

AOKI T., YAMADA N et KAKO Y. (1990)

Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of β -casein from bovine casein micelles on cooling. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2287-2292.

AQUILANTI L., BABINI V., SANTARELLI S., OSIMANI A., PETRUZZELLI A., CLEMENTI F. (2011)

Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology*, 52, 651–659.

ARNOLDS F.H., WINTRODE P.L., MIYAZAKI K. (1998)

How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends Biochem. Sci.* 26:100-106.

ARRUDA M. S., SILVA F. O., EGITO A. S., SILVA T. M. S., LIMA J. L., PORTO A. L. F.(2012)

New peptides obtained by hydrolysis of caseins from bovine milk by protease extracted from the latex *Jacaratia corumbensi*.. *LWT-Food Science and Technology*, 49,73-79.

AZARKAN M., MATAGN A., WATTIEZ R., BOLLE L., VANDENAMEELE J., BAEYENS-Volant D. (2011)

Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification, and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex. *Phytochemistry* 72, 1718–1731.

B

BARBOSA M., CORRADINI C., BATTISTOTTI B. (1986)

Cheese making experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardoon (*Cynara cardunculus* L.). *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia*, 32, 203–221.

BARROS R. M., FERREIRA C. A., SILVA S. V., MALEATA F. X. (2001)

Quantitative studies on the enzymatic hydrolysis of milk proteins brought about by cardosins precipitated by ammonium sulfate. *Enzyme and Microbial Technology*. 29. 541-547.

BAYER E., BUTTLER K.P., FINKINZELLER X. (1990)

Guide de la flore méditerranéenne. Caractéristiques, habitat, distribution et particularités de 536 espèces. *Ed. Neufchatel, Suisse*, 287p.

BEKA R. G. (2011)

Une alternative végétale en fromagerie: Préparation d'un extrait coagulant à partir des fruits de *Balanites aegyptiaca*; Etude biochimique et application technologique. Thèse de doctorat en Sciences Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Université de Lille I. 167p

BEKHIT A. EL-D. A., HOPKINS D. L., GEESINK G., BEKHIT A. A., PHILIP F. (2013)
Exogenous proteases for meat tenderization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 89p.

BELLAMY W., TAKASE M., YAMAUCHI K., WAKABAYASHI H., KAWASE K. ET TOMITA M. (1992)
Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta.*; 121: 130-136.

BENKERROUM N. (2010)
Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review. *J. Dairy Technol.* 63:320-338.

BENKHLIFA H., BENGOGA C., LARRE C., GUIBAL E., POPINEAU Y., LEGRAND J. (2005)
Casein hydrolysis by immobilized enzymes in a tours reactor *Process Biochemistry* Pp40: 461-467.

BENYAHIA-KRID F.A., ATTIA H., ZIDOUNE M.N., (2010)
Comparative study of milk coagulation with chicken pepsin or rennet: Interactions and microstructure. *Journal of Agriculture, Biotechnology and Ecology*, vol.3, pp: 75-86.

BERGHE V.A., VLIETINCK A. J. (1991)
Screening Methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Met. for Plant Biochem.* 6: 47-68.

BERRIDGE N.J. (1955)
Purification and assay of rennin. *Methods in enzymology.* Ed. Perlmann G.E. and Loran Acad. Press Inc., New York. Vol. 2. 69-77

BOMAN H. G. (1995)
"Peptide antibiotics and their role in innate immunity" *Annu Rev Immunol* 13:(1): p. 61-92.

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

BOURDIER J.F., LUQUET F.M. (1981)
Dictionnaire laitier. Paris : Tec & Doc-Lavoisier.

BRADFORD M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72. 248-254.

BROGDEN K.A., ACKERMAN M., McCray P.B., TACK J.R. (2003)
Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of Antimicrobial Agents*, 22, 465-478.

BROGDEN K.A. (2005)

Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3(3): 238-50.

BRUNETON J. (2009)

Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales. Éd Lavoisier, France. 1292 pages.

BÜETIKOFER U., MEYER J., SIEBER R., WECHSLER D. (2007)

Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses. *International Dairy Journal*, vol. 17, p. 968-975.

BULET P., STOCKLIN R. et MENIN L. (2004)

Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews* 198, 169-184.

C

CAMPOS R. (1990)

Chemical characterization of proteinase extracted from wild thistle *Cynara cardunculus L.* *Food Chemistry*, 35, 89-97.

CAVALLI S.V., SILVA C., CIMINO F.X., MALCATA N., PRIOLO. (2008)

Hydrolysis of caprin and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemistry*, 106. pp 997-1003.

CATIAU L., TRAISNEL J., CHIHIB N.E., LE FLEM G., BLANPAIN A., MELNYK O., GUILLOCHON D. et NEDJAR-ARROUME N. (2011a)

RYH: A minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity. *Peptides*, 32 : 1463–1468.

CATIAU L., TRAISNEL J., DELVAL-DUBOIS V., CHIHIB N.E, GUILLOCHON D. et NEDJAR-ARROUME N. (2011b)

Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR. *Peptides*, 32, 633-638.

CAYOT P., LORIENT D. (1998)

Structure et techno fonction des protéines du lait. Technique et documentation. Lavoisier. Paris. 363p.

CHABBERT Y.A. (1963)

L'antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques. De La Tourelle (eds.). Collection techniques de base.

CHURCH F.C., SWAISGOOD H.E., PORTER D.H. et CATIGNANI G.L. (1983)

Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66:1219.

CHRISTEN C., VIRASORO E. (1935)

Présures végétales. Extraction et propriétés. *Le lait*, 144-145, 354-363.

CLARE D.A., CATIGNANI G.L., SWAISGOOD H.E. (2003)

Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr. Pharm. Des.* **2003**, *9*, 1239–1255.

CLAVERIE-MARTÍN F., HERNÁNDEZ M. C. (2007)

Aspartic proteases used in cheese Making in POLAINA J. et MACCABE A.P., industrial enzymes, pp: 207-219.

CONDÉ R., ARG ELLO M., IZQUIERDO J., NOGUEZ R. MORENO M. ET LANZ H. (2012)

Natural Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology “Antimicrobial Agents”*. Ed. Varaprasad Bobbarala.

CORDEIRO M.C., PAIS M.S., BRODELIUS P.E. (1994)

Tissue-specific expression of multiple forms of cyprosin (aspartic proteinase) in flowers of *Cynara cardunculus*. *Physiologia plantarum*, *92*, 645-653.

CORREDIG M., DALGLEISH DG. (1997)

Studies on the susceptibility of membranederived proteins to proteolysis as related to changes in their emulsifying properties. *Food Res Int* 1997, *30(9)*:689–697.

COSTE H. (1983)

Flore descriptive et illustrée de la France, la Corse et des contrées limitrophes. Librairie scientifique et technique A. Blanchard, Paris, 627p.

COWLAND J. B., JOHNSEN A. H., BORREGAARD N. (1995)

CAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters* *368* 173-176.

D

DASHPER S.G., LIU S.W., REYNOLDS E.C. (2007)

Antimicrobial peptides and their potential as oral therapeutic agents. *Int. J. Peptides Res. Therap.* *13*:505-516.

DEFER D. (2009)

Recherche d'activités antimicrobiennes chez les mollusques marins. Purification et caractérisation partielle de peptides antimicrobiens isolés à partir d'hémolymphe de *Cassostrea gigas* et de bactéries associés. Ecole doctorale SICMA. Université de Bretagne Sud, pp 245.

DEHGAN B. (1998)

Landscape Plants for Subtropical Climates. University Press of Florida, Gainesville, FL. 638p.

DEVARAJ K.B., KUMAR P.R. et PRAKASH V. (2008a)

Purification, characterization and solvent induced thermal stabilization of ficin from *Ficus carica*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11417–11423,

DEVARAJ K.B., GOWDA LALITHA R. et PRAKASH V. (2008b)

An unusual thermostable aspartic protease from the latex of *Ficus racemosa* (L.) *Phytochemistry* 69: 647–655.

DEVARAJ K.B., PARIGI RAMESH KUMAR, PRAKASH V. (2011)

Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride. *Process Biochemistry* 46. 458–464.

DEVI M.K., BANU A.R., GNANAPRABHAL G.R., PRADEEP B.V., PALANISWAMY M. (2008)

Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J. Sci. Technol.*, 1(7); 1–6.

DEVINE D. A. (2003)

Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts. *Mol Immunol*, 2003, vol. 40, p. 431-443.

DIAMOND G., BECKLOFF N *et al.* (2009)

The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 15(21): 2377-92.

DICTIONARY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY. (2009)

Second Edition Compiled and edited by the International Food Information Service. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication. 447 P.

DI PIERRO G., O'KEEFFE M.B., POYARKOV A., LOMOLINO G., FITZGERALD R.J. (2014)

Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by *Ficus carica L.* derived proteinase. *Food Chemistry. Journal home page.* 7 P.

DUBOIS-DELVAL V. (2006)

Préparation des peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse enzymatique de deux protéines : l'hémoglobine bovine et l' α -lactalbumine bovine. Thèse de doctorat présentée à l'université des sciences et technologies de Lille. 242 P.

DURAND P. (1982)

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

DZIUBA B., DZIUBA M. (2014)

New Milk Protein-Derived Peptides with Potential Antimicrobial Activity: An Approach Based on Bioinformatic Studies. *International Journal of Molecular Sciences. Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 14531-14545.

E

ESTEVES C.L. (1995)

Comparative study of biochemical characteristics of the rennets from *Cynara cardunculus L.*, *Cynara scolymus L.* and *Cynara humilis L.* M.Sc. thesis, University of Coimbra, Portugal.

EXPÓSITO LL., RECIO I. (2006)

Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16:1294-1305.

F

FACCIA M., PICARIELLO G., TRANI A., LOIZZO P., GAMBACORTA G., LAMACCHIA C., Di LUCCIA A. (2012)

Proteolysis of Caciocotta cheese made from goat milk coagulated with caprifig (*Ficus carica sylvestris*) or calf rennet. *Eur Food Res Technol* 234:527–533.

FADYLOGLU S. (2001)

Immobilization and characterization of ficin. *Nahrung/Food* 45 No. 2, pp. 143– 146.

FARO, C.J., VERÍSSIMO, P., LIN, Y., TANG, J., PIRES, E. (1995)

Cardosin A and B aspartic proteases from the flowers of cardoon. *Adv. Exp. Med. Biol.* 362, 373–377.

FAZIO, OLIVEIRA V. J., BULET P., MURANDA M.T., DAFFRE S. et MIRANDA A. (2006)

Structure-activity relationship studies of gomesin : importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers*; 84 (2): 205-218.

FEIJOO-SIOTA L. et VILLA T. G. (2011)

Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol* 4: 1066–1088.

FIGUEIREDO R., DUARTE P., PEREIRA S., PISSARRA J. (2006)

The embryo sac of *Cynara cardunculus*: ultrastructure of the development and localisation of the aspartic proteinase cardosin B. *Sex Plant Reprod*, 19: 93–101

FOX P.F. (1989)

Development in Dairy Chemistry-4-Functional milk proteins, Applied Science Publishers, London, 3 83 pages.

FOX P.F. and MCSWEENEY P.L.H. (1998)

Dairy Chemistry and Biochemistry. UK: Blackie Académie and Professions!

FRAZAO C., BENTO I., COSTA J., SOARES C.M., VERÍSSIMO P., FARO C., PIRES E., COOPER J., LARRONDO M.A. (1999)

Crystal structure of cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. J. Biol. Chem. 274, 27694–27701.

G

GODFREY T., WEST S. (1996)

Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T., West S. (Eds), *Industrial Enzymology*, second Ed., Stockholm Press, New York, USA.

GONZALEZ-RABADE N, BADILLO-CORONA JA, ARANDA-BARRADAS JS, OLIVER-SALVADOR MC (2011)

Production of plant proteases in vivo and *in vitro* - a review. *Biotechnol Adv* 29:983–996

GOUSSEN H., LEROY JF. and OZENDA P. (1982)

Précis de botanique, tome II : végétaux supérieure. Masson : pp 558-560.

GRISVARD P., CHAUDUN V. (1964).

Le bon jardinier 2, encyclopédie horticole, la maison rustique, Paris, 1667p.

GRZONKA Z., KASPRZYKOWSKI F et WICZK W. (2007)

Cysteine proteases. CHAPTER 11. *J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), Industrial Enzymes*, 181–195.

H

HAGEL J. M., YEUNG E. C., et FACCHINI P. J. (2008)

Got milk? The secret life of laticifers. *Trends in Plant Science*, 13, 631–639.

HAILESELASSIE S. S., LEE B. H. et GIBBS B. F. (1999)

Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *Journal of Dairy science* vol. 82, No. 8, 1999.

HAMES B. D., HOOPER N. M. et HOUGHTON J. D. (2006)

L'essentiel en biochimie. Ed BERTI Editions, Paris, P.413.

HANCOCK R. E. W et CHAPPLE D. S. (1999)

Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (6):1317-1323.

HANCOCK R. E.W et SAHL H. G. (2006)

Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* 24, 1551-1557.

HAQUE E., CHAND R. (2008)

Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *Eur. Food Res. Technol.* 227:7-15.

HEIMGARTNER U., PIETRZAK M., GEERSTSEN R., BRODELIUS P., DA SILVA FUGUEIREDO A.C., PAIS M.S.S. (1990)

Purification and partial characterization of milk clotting proteases from flowers of *Cynara cardunculus*. *Phytochemistry*, 29, 1405–1405.

HILL R. D., LAHOV E. et GIVOL D., (1974)

A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research*; 41: 147-153.

HOGAN S., ZHANG L., LI J., WANG H., et ZHOU K. (2009)

Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteinases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. *Food Chemistry*, 117, 438–443.

HUANG H. W. (2000)

"Action of antimicrobial peptides: two-state model." *Biochemistry* 39(29): 8347-52.

I

IBRAHIM H.R., THOMAS U., and PELLEGRINI A. (2001)

A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J Biol Chem.* 276(47): p. 43767-74.

IZADPANAHA A., et GALLO R. L. (2005)

Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad Dermatol*, 2005, vol. 52, p. 381-390.

J

JAHANDIER E. (1931)

Catalogue des plantes du Maroc. Imp. Minevera, Alger, 1181p.

JANSON J. C. (2011).

Protein purification: principals, high resolution methods and applications. 3ème Ed John Wiley and Sons, P. 548

JENSSEN H., P. HAMILL *et al.* (2006)

"Peptide antimicrobial agents." *Clin Microbiol Rev* 19(3): 491-511.

JORGE P., LOURENÇO A et PEREIRA M.O. (2012)

New trends in peptide-based antibiofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatics approaches. *Biofouling*. 28:1033-1061.

JOSEPH J. et RAJ S. J. (2011)

Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficus carica* Linn—An overview. *International Journal of Pharm-Tech Research*. 3: pp 08-12.

K

KATSAROS G.I., KATAPODIS P., TAOUKIS P.S. (2009)

High hydrostatic pressure inactivation kinetics of the plant proteases ficin and papain. *Journal of Food Engineering* 91: 42–48.

- KIM Y. S., PARK S. J., LEE E. J., CERBO R. M., LEE S. M., and RYU C. H. (2008)**
Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of β-carotene.
Journal of Food Science, 73, 540–545.
- KITTS D.D ET WEILER K. (2003)**
Bioactive proteins and peptides from food sources. Application of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9, 1309-1323.
- KOOLMAN J. and ROHM K.H. (2005)**
Color of Biochemistry. 2^{ème} Ed Thieme Verlag, New York. P. 304.
- KORHONEN H. ET PIHLANTO A. (2003)**
Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- KORHONEN H., PIHLANTO A. (2006)**
Bioactive peptides: Production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945-960.
- KUMARI, M., SHARMA, A., & JAGANNADHAM, M. V. (2012)**
Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*, 131, 1295–1303.

L

- LAI Y et GALLO R. L. (2009)**
AMP Ed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* Vol.30 No.3 : 131-41.
- LAHOV E., EDELSTEIN D., SODE-MOGENSEN M.T. ET SOFER E. (1971)**
Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, 26:489-495.
- LAHOV E., REGELSON W. (1996).**
Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 1996, 34, 131–145.
- LANSKY E. P., PAAVILAINEN H. M., PAWLUS A. D., et NEWMAN R. A. (2008)**
Ficus spp. (fig): Ethno botany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 195–213.
- LAEMMLI U.K. (1970)**
Clivage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophages T4. *Nature* ; 227, 680-686.
- LENOIR J., AUBERGER B. (1977)**
Les caractères du système protéolytique de *Penicillium caseicolum* - Caractérisation d'une protéase neutre. *Le lait*, 57; 471-489.
- LESPINASSE JM ; LETERME E. (2000)**

De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Ed. Rouergue-Parc Saint-Joseph, 104p.

LEVY O. (2004)

Antimicrobial proteins and peptides : anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, vol. 76, p. 909-925.

LIBOUGA D.G., VERCAIGNE-MARKO D., DJANGAL S. L., I. CHOUKAMBOU, EBANGI A.L., M. OMBIONYO, BEKA R.G., ABOUBAKAR T.M. et GUILLOCHON D. (2006)

Mise en évidence d'un agent coagulant utilisable en fromagerie dans les fruits de *Balanites aegyptiaca*. *Tropicultura*, 24, pp : 229-238.

LIENER I. E., FRIEDENSON B. (1970)

Ficin. In G. E. Perlmann & L. Lazlo (Eds.), *Methods in Enzymology. Proteolytic Enzymes* (19, pp. 261–273). Cornell University.

LLORENTE B. E., OBREGON W.D., AVILES F.X., CAFFINI N.O., VAIRO-CAVALLI S. (2014)

Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry* 159 (2014) 55–63

LOWE G. (1976)

The cysteine proteinases. *Tetrahedron*.vol. 32: 291 – 302.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LUFRAÑO D., FARO R., CASTANHEIRA P., PARISI G., VERISSIMO P., VAIRO-CAVALLI S., SIMÕES I., FARO C. (2012)

Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry* 81, 7–18.

LYNN K. R. et CLEVETTE-RADFORD N. A. (1986)

Ficin a serine-centred protease from *Ficus Elastica*; *J'hyfocht&rry.* 25: 1559-1561.

M

MACEDO A., MALCATA F.X., OLIVEIRA J.C. (1993)

The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal of Dairy Science*, 76, 1725-1739.

MAHAUT M., JEANTET R., SCHUCK P and BRULE G. (2000)

Les produits industriels laitiers Ed Tec et Doc. – Lavoisier : pp. 26-40.

MALKOSKI M., DASHPER S.G., O'BRIEN-SIMPSON N.M., MACRIS M., CROSS K.J., REYNOLDS E.C. (2001)

Kappacin, a novel antimicrobial peptide from bovine milk. *Antimicrob. Agents Chem.* 45:2309-2315.

MARSHALL S.H., ARENAS G. (2003)

Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron. J. Biotechnol.* 6: 271-284.

MATSUZAKI K., K. SUGISHITA *et al.* (1995)

"Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2" *Biochemistry* 34 (10): 3423-9.

Mc CANN K. B., SHIELL B. J., MICHALSKI W. P., LEE A., WAN, J., ROGINSKI H., *et al.* (2006)

Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α_{s1} -casein. *International Dairy Journal*, 16, 316e323.

MEISEL H. (2005)

Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 1905-1919.

MECHAKRA A., AUBERGER B., REMEUF F., LENOIR J., (1999)

Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments*, 19; 663–675.

MINERVINI F., ALGARON F., RIZZELLO C.G., FOX P.F., MONNET V. et GOBETTI M. (2003)

Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinase hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:297-5305.

MÖLLER N. P., SCHOLZ-AHRENS K. E., ROOS N., et SCHREZENMEIR J. (2008)

Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47, 171–182.

MOTA-MEIRA M., LAPOINTE G., LACROIX C. ET LAVOIE M.C. (2000)

MICs of mutacin BNY266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterid pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1, 24-29.

MULTON J. L. (2002)

Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. 3^{ème} ed. *Technique et Documentation*, Lavoisier, Paris, 746p.

N

NASSAR A. H. et NEWBURY H. J. (1987)

Ficin Production by Callus Cultures of *Ficus carica*. *J. Plant Physiol.* 131: 171-179.

NEDJAR-ARROUME N, DUBOIS-DELVAL V, MILOUDI K, DAOUD R, KRIER, F, KOUACH M, BRIAND G, GUILLOCHON D. (2006)

Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27:2082–2089.

NEDJAR-ARROUME N, DUBOIS-DELVAL V, ADJE EY, KRIER F, MARY P, KOUACH M, ET GUILLOCHON D. (2008)

Bovine hemoglobin; an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 29:969–77.

NOUANI A., DAKO E., MORSLI A., BELHAMICHE N., BELBRAOUE T S., BELLAL M.M. et DADIE A. (2009)

Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree latex (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria. *J. Food Technol.*, 7: 20-29.

NIELSEN P.M., PETERSEN D & DAMBMANN C. (2001)

Improved method for determining food protein degree of hydrolysis journal of food science volume 66, Issue 5, pages 642-646, June 2001.

O

OLIVEIRA A. P., SILVA L. R., DE PINHO P. G., GIL-IZQUIERDO A., VALENTÃO P., SILVA B. M., et al. (2010)

Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC–ITMS. *Food Chemistry*, 123, 548–557.

OLIVEIRA A. P., SILVA L. R., FERRERES F., DE PINHO P. G., VALENTÃO P., SILVA B. M., et al. (2010)

Chemical assessment and in vitro antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 3393–3398.

ONER M. D et AKAR B. (1993)

Separation of the proteolytic enzymes from fig tree latex and its utilization in Gaziantep cheese production. *Lebensm. - Wiss. U. Technol.*, 26: 318-321

P

PARISIEN, A., ALLAIN B., ZHANG J., MANDEVILLE R., AND LAN CQ. (2008)

Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology*, 2008.104(1): p. 1-13.

PAYNE T. C. (2009)

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

POWERS, J. P., R. E. HANCOCK. (2003)

The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**(11):1681-91.

PELLEGRENI A., THOMAS U., BRAMAZ N., HUNZIKER P. et VON FELLEBERG R. (1999)

Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1426: 439-448.

PELLEGRENI A. (2003)

Antimicrobial peptides from food proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 9,1225-1238.

PIHLANTO-LEPPALA A., MARNILA P., HUBERT L., ROKKA T., KORHONEN H. J. T., et KARP M. (1999)

The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *E. coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 540e545.

PIHLANTO A. (2006)

Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.

PIMENTEL C., VAN DER STRAETEN D., PIRES E., FARO C., RODRIGUES-POUSADA C. (2007)

Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS J.* 274, 2523-2539.

Q

QUEZEL P., SANTA S. (1963)

Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales, tome II. *Ed. centre national de la recherche scientifique*, Paris, 1170p.

R

RAMALHO-SANTOS, M., PISSARRA, J., VERISSIMO, P., PEREIRA, S., SALEMA, R., PIRES, E., FARO, C.J. (1997)

Cardosin A, an abundant aspartic proteinase, accumulates in protein storage vacuoles in the stigmatic papillae of *Cynara cardunculus* L. *Planta* 203, 204-212.

RAMALHO-SANTOS M., VERÍSSIMO P., CORTES L., SAMYN B., VAN BEEUMEN, J., PIRES E., FARO C. (1998)

Identification and proteolytic processing of procardosin A. *FEBS J.* 255, 133-138.

RAMALHO-SANTOS M., VERISSIMO P., FARO C.J., PIRES E. (1996)

Action on bovine α s1-casein of cardosins A and B, aspartic proteinases from the flowers of the cardoon *Cynara cardunculus* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1297, 83-89.

RAMEAU J. C., MANSION D., DUME G, et GAUBERVILLE C. (2008)

Flore forestière de France : Région méditerranéenne. Ed. France. Institut pour le développement forestier. 631p.

RAMET J.P. (1997)

Les agents de transformation du lait *in* Le fromage, 3eme édition, Tech. & Doc. Paris, pp: 165-172.

RAWLINGS N.D., BATEMAN A., BARRETT A.J. (2012)

MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40, D343–D350.

RECIO I., et VISSER S. (1999)

Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α_{s2} -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 314e326.

RICHTER G., SCHWARZ H. P., DORNER F., et TURECEK P. L. (2002)

Activation and inactivation of human factor X by proteases derived from *Ficus carica*. *British Journal of Haematology*, 119, 1042–1051.

RIZZELLO C. G., LOSITO I., GOBBETTI M., CARBONARA T., DE BARI M. D., ZAMBRONIN P. G. (2005)

Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, vol. 88, p. 2348-2360.

ROBBINS B.H. (1930)

A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of leche de higueron. *J. Biol. Chem.* 87: 251_257.

ROSEIRO L.B., BARBOSA M., M AMES J., WILBEY R.A. (2003)

Cheese making with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology*, 56, 76-85.

S

SAITO T., NAKAMURA T., KITAZAWA H., KAWAI Y., ITOH T. (2000)

Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, vol. 83, p. 1434-1440.

SARMENTO A.C., LOPES H., OLIVEIRA C.S., SAMYN R.V.B., SERGEANT K., DEBYSER G., VAN BEEUMEN J., DOMINGUES P., AMADO F., PIRES E., DOMINGUES M.R.M., BARROS M.T. (2009)

Multiplicity of aspartic proteinase from *Cynara cardunculus L.* *Planta*, 230, 429-439.

SCHRÖDER J-M.L. et HARDER J. (2006)

Peptides antimicrobiens naturels cutanés. *MEDECINE/SCIENCES*; 22 : 153-7.

SHAH MANZOOR A., SHABIR A. M. et ARAY M. A. P. (2014).

Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. *Dairy Sci. & Technol.* 94: 5–16.

SHAMMET K.M., BRWN R.J. and MCMAHON D.J. (1992)

Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on k casein. *J. Dairy Science*, 75: 1373-1379.

SIAR H. (2014)

Utilisation de la pepsine de poulet et de la ficine du figuier comme agents coagulants du lait. Mémoire de magister, université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires. 105p.

SIDIKOU I. D., REMY B., HORNICK J. L., LOSSON B., YENIKOYE A. and BECKERS J. F. (2005)

Le pepsinogène et la prochymosine des bovins : connaissances actuelles, applications et perspectives dans la stratégie de lutte contre les verminoses gastro-intestinales. *Ann. Méd. Vét.*, 149 : 213-228.

SINGH H., BENNETT R.J. (2002)

Milk and Milk Processing In: Robinson R. *Dairy Microbiology Handbook The Microbiology of Milk and Milk Products*. New York: John Wiley Sons, Inc. p 1-38.

SILVA S.V., MALCATA F.X. (1999)

On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase, on ovine caseins. *Food Chemistry*, 67, 373–378.

SILVA A., NEDJAR-ARROUME N., HEDHILI K., CHATAIGNÉ G., R.BALTI, NASRI M., DHULSTER P., BOUGATEF A. (2013)

Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 183-188.

SILVA N.C., SARMENTO B. et PINTADO M. (2013)

The importance of antimicrobial peptides and their potential for therapeutic use in ophthalmology. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 41: 5-10.

SINGLETON A. and BUTTLE D. J. (2013)

Ficain. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2: 1141-1143.

SONG R., WEI R-B., LUO H-Y and WANG D.F (2011)

Isolation and characterisation of antimicrobial peptide fraction from the pepsin hydrolysate of Half-Fin Anchovy (*setipinna taty*). *Molecules*, 17, 2980-2991.

SWAISGOOD H. E. (1992)

Chemistry of the caseins. In : *Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins*. P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY. P. 63-110.

T

TANG Y. Q., YUAN J., OSAPAY G., OSAPAY K., TRAN D., MILLER C. J., OUELLETTE A. J et SELSTED M. E. (1999)

A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science (New York, NY)* **286**, 498-502.

TAVARES T., CONTRERAS M.M., AMORIM M., MARTÍN-ÁLVAREZ P.J., PINTADO M.E., RECIO I., MALCATA F.X. (2011)

Optimization, by response surface methodology, of degree of hydrolysis and antioxidant and ACE-inhibitory activities of whey protein hydrolysates obtained with cardoon extract. *Int. Dairy J.* **21**, 926–933.

TOKE O. (2005)

Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*, vol. **80**, p. 717-735.

TOMITA M., WAKABAYASHI H., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S., et HAYASAWA H. (2002)

Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochemistry and Cell Biology*, **80**, 109e112.

TSOULI J. (1974)

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

V

VAIRO CAVALLI S., LUFRANO D., COLOMBO M.L., PRIOLO N. (2013)

Properties and applications of phytepsins from thistle flowers. *Phytochemistry* **92**, 16–32

VERISSIMO P., ESTEVES C., FARO C., PIRES E. (1995)

The vegetable rennet of *Cynara cardunculus L.* contains two proteinases with chymosin and pepsin-like specificities. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 621-626.

VERISSIMO P., FARO C., MOIR A.J., LIN Y., TANG J., PIRES E. (1996)

Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus L.* *Eur. J. Biochem.*, **235**, 762-768.

VIDAUD J. (1997)

Le figuier monographie de CTIFL (centre technique interprofessionnel des fruits et légumes). 267p.

VIEIRA M., PISSARRA J., VERISSIMO P., CASTANHEIRA P., COSTA Y., PIRES E., FARO C. (2001).

Molecular cloning and characterization of cDNA encoding cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus L.* *Plant Mol. Biol.* 45, 529–539.

VILMORIN J.B. (2003)

Histoire d'arbre. Ed. Jean Paul Gisserot. 74p.

VIOQUE M., GÓMEZ R., SÁNCHEZ E., MATA C., TEJADA L., FERNÁNDEZSALGUERO J. (2000)

Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 451–456.

VOET D., VOET J.G. (2005)

Biochimie, De Boeck université, 2^{ème} édition, pp : 127-207.

W

WALSTRA P., GEURTS T.J., NOOMEN A., JELLEMA A and VAN BOEKEL M.A.J.S. (1999)

Dairy technology: Principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker Inc.

WANG Z., WANG G. 2004.

APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research* 32, D590-D592.

WANG G. (2013)

Data base-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs. *Pharmaceuticals*, 6, 728-758.

WANG J., SU Y., JIA F and JIN H. (2013)

Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal* 2013, 7:62

WIESNER J et VILCINSKAS A. (2010)

Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*. 1(5):440-64.

WILLIAMS DONALD C., SGARBIERI VALDEMIRO C., et WHITAKER JOHN R. (1968)

Proteolytic Activity in the Genus *Ficus*. *Plant Physiol.* 43: 1083-1088.

WIMLEY W.C. et HRISTOVA K. (2011)

Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions. *J. Membr. Biol.* 239: 27-34.

WHITEHURST R. J. et VAN O. M. (2010)

Enzymes in Food Technology. 2^{ème} édition. Blackwell Publishing Ed. ISBN: 978-1-405-18366-6.

WOLF C.E., GIBBONS W.R. (1996).

Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *J. Appl. Microbiol.* 80:453-457.

Y

YAMAMOTO N., EJIRI M. et MIZUNO S. (2003)

Biogenic peptides and their potential use. *Current pharmaceutical design*, 9, 1345-1355

Z

ZANETTI M., GENNARO R., ROMEO D. (1995)

Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable c-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters*, 374, 1-5.

ZARE H., MOOSAVI-MOVAHEDI A. A., SALAMI M., MORTEZA M., SABOURY A. A. et SHEIBANI N. (2013)

Purification and autolysis of the ficin isoforms from fig (*Ficus carica cv. Sabz*) latex. *Phytochemistry* 87: 16–22.

ZASLOFF M. (2002)

Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. **415**: 389-395.

ZUCHT H. D., RAIDA M., ADERMANN K., MAGERT H. J., et FORSSMANN W. G. (1995)

Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372, 185e188.

ZIKIOU A. (2013)

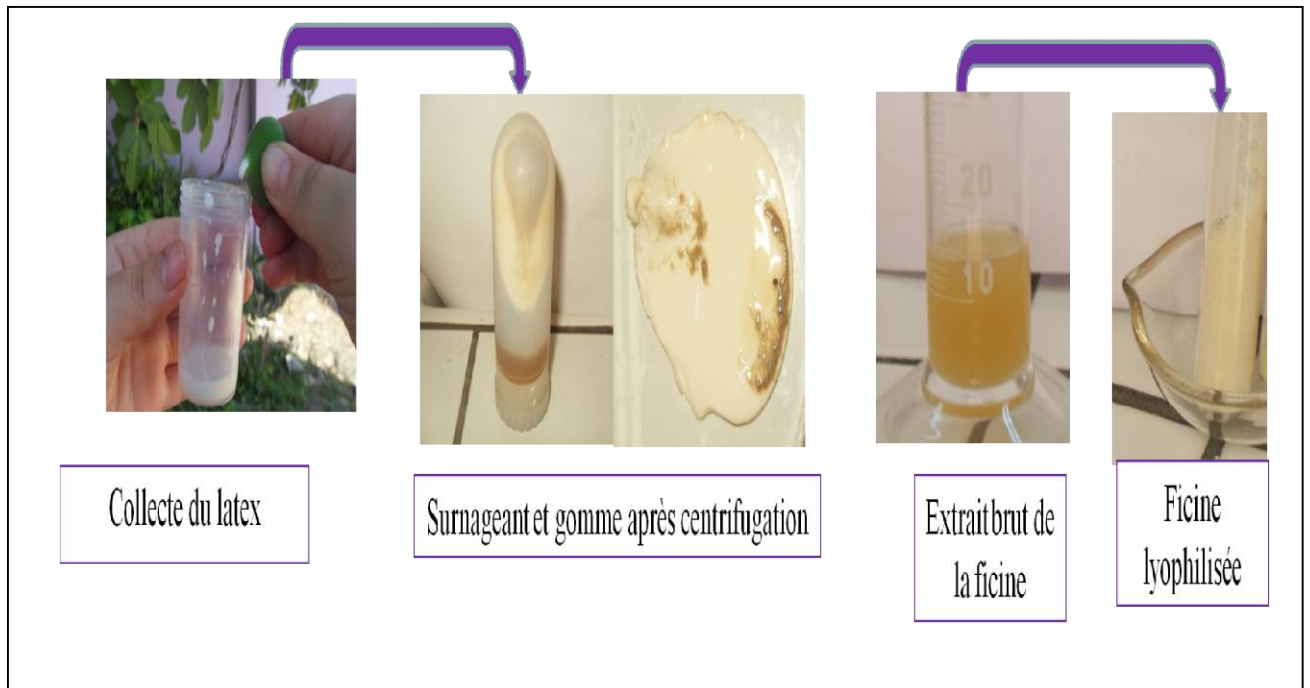
La coagulation du lait par l'extrait des fleurs de cardon (*Cynara cardunculus*). Mémoire de magister, université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires. 136p

Site web

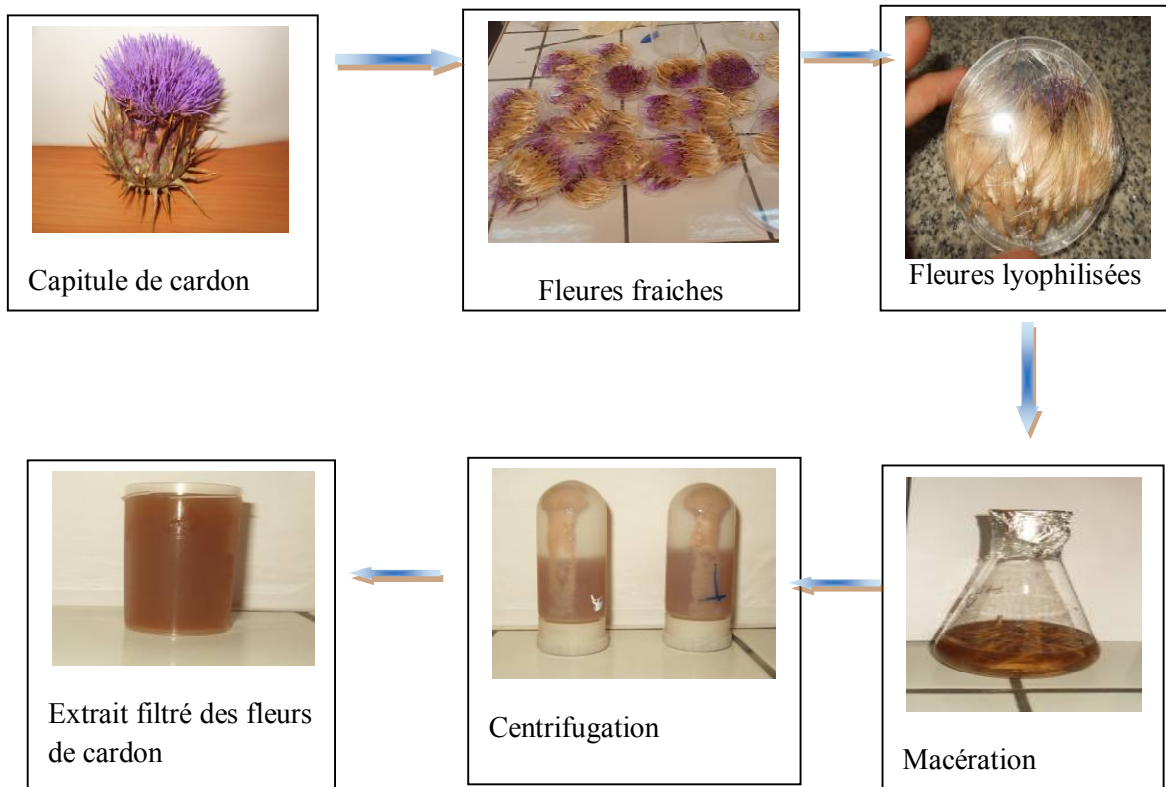
(<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Dernière consultation 14 octobre 2015

ANNEXES

1. Extraction de la ficine



2. Extraction de l'extrait enzymatique des fleurs de cardon (cardosines)



1. DOSAGE DES PROTEINES (BRADFORD, 1976)

1.1. Préparation de Réactif de Bradford

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

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

1.2. Elaboration de la courbe d'étalonnage des protéines

Une gamme étalon est préparée à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (BSA) (1mg/1mL) selon les quantités suivantes : 0, 20, 40, 60, 80 et 100 µg. Toutes les dilutions des solutions protéiques sont effectuées en présence de l'eau distillée. Les échantillons et le blanc sont ajustés à un volume final de 100µL.

Après addition de 3ml du réactif de Bradford et agitation, l'absorbance est mesurée à 595 nm contre le blanc

Tableau 1 : Préparation de la gamme d'étalonnage de la SAB (1mg/mL)

N° tube	blanc	1	2	3	4	5
SAB (µL)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µL)	100	80	60	40	20	0
Réactif Bradford (µL)	3000					

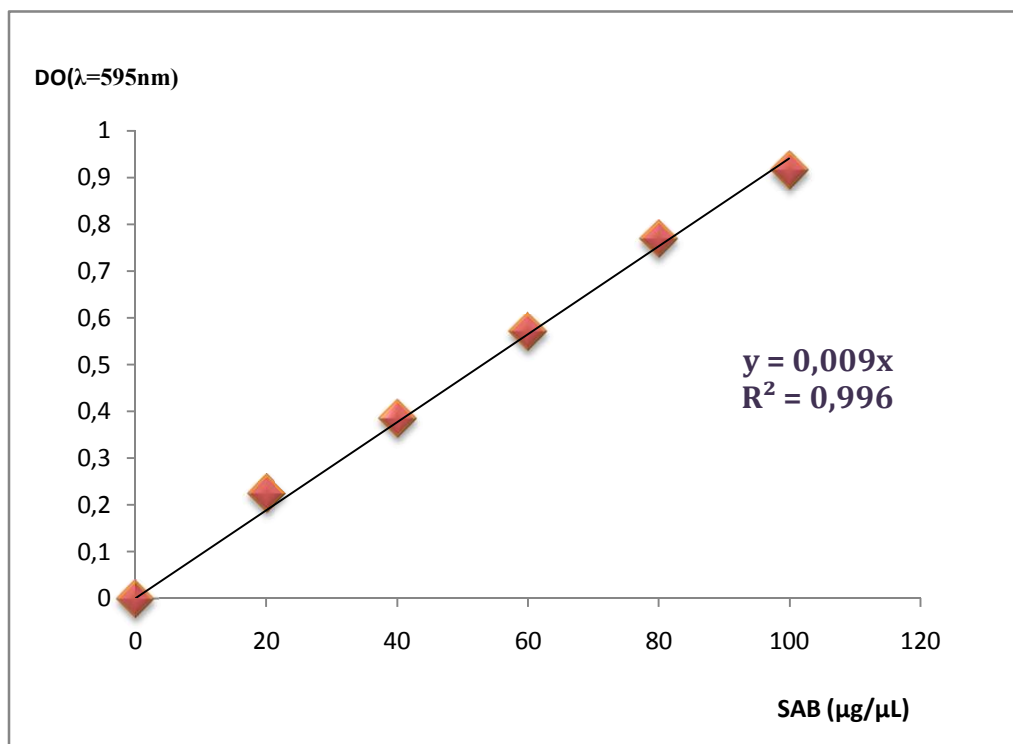


Figure 1 : Courbe d'étalonnage de la solution de SAB (1 mg/mL) par la méthode de Bradford, (1976).

2. MESURE DE L'ACTIVITE PROTEOLYTIQUE

2.1. Courbe d'étalonnage de la tyrosine

- Mode opératoire

Tableau 2 : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Tyrosine

N° du tube	blanc	1	2	3	4	5
Concentration en tyrosine (µg /ml)	0	20	40	60	80	100
Solution mère de tyrosine (mL)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
TCA (mL)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Na ₂ CO ₃ (mL)	2,5					
Agiter correctement puis laisser stabiliser le mélange pendant 10 min						
Folin-Ciocalteu (mL)	0,5					
Mélanger de nouveau rapidement et énergiquement après chaque addition du réactif de Folin et laisser reposer à l'ombre pendant 30 min au minimum						
Eau distillée (mL)	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5

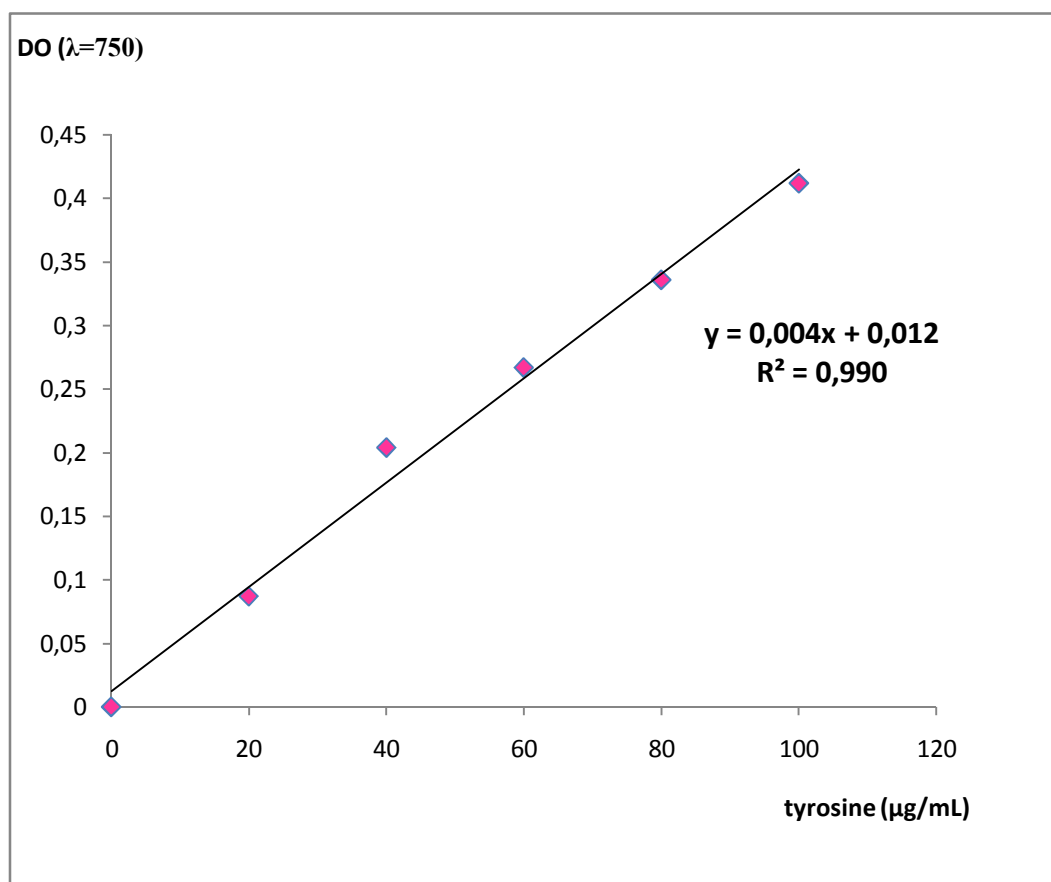


Figure 2 : Courbe d'étalonnage obtenu avec la tyrosine.

3. MESURE DU DEGRE D'HYDROLYSE (METHODE OPA)

3.1. Courbe d'étalonnage de la Leucine

- Mode opératoire

Tableau 3 : Préparation de la gamme d'étalonnage de la Leucine mg/mL

Concentration de la solution mère (Leucine) mg/mL	0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
Volume de la solution mère (μL)	0	20	40	60	80	100
Volume de l'eau distillée (μL)	100	80	60	40	20	0
Volume de réactif OPA (mL)	1					

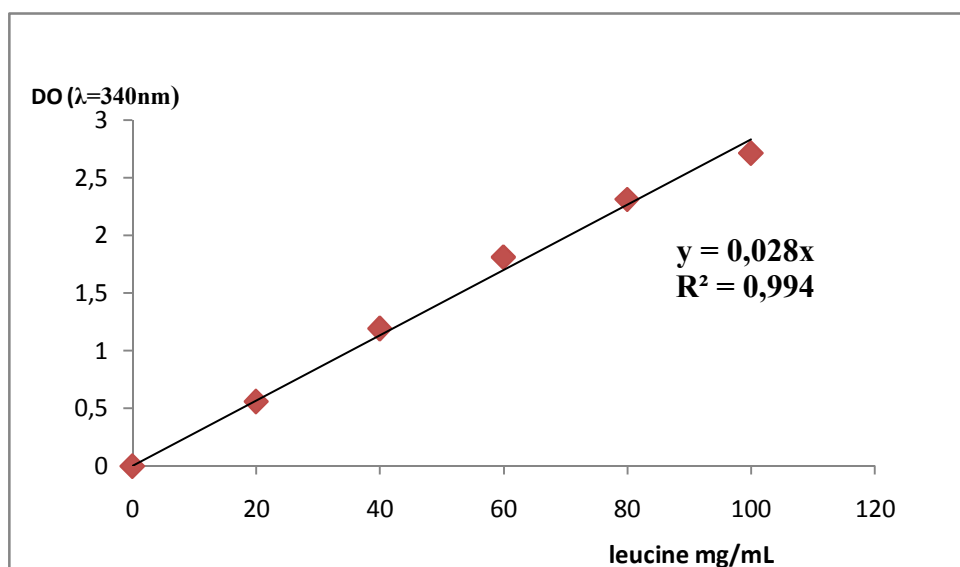


Figure 3: Courbe d'étalonnage à la Leucine (mg/mL) selon la méthode OPA

4. COURBE D'ETALONNAGE DE GEL D'ELECTROPHORESE POUR LA DETERMINATION DES POIDS MOLECULAIRES DES PROTEINES DES EXTRAITS ENZYMATIQUES

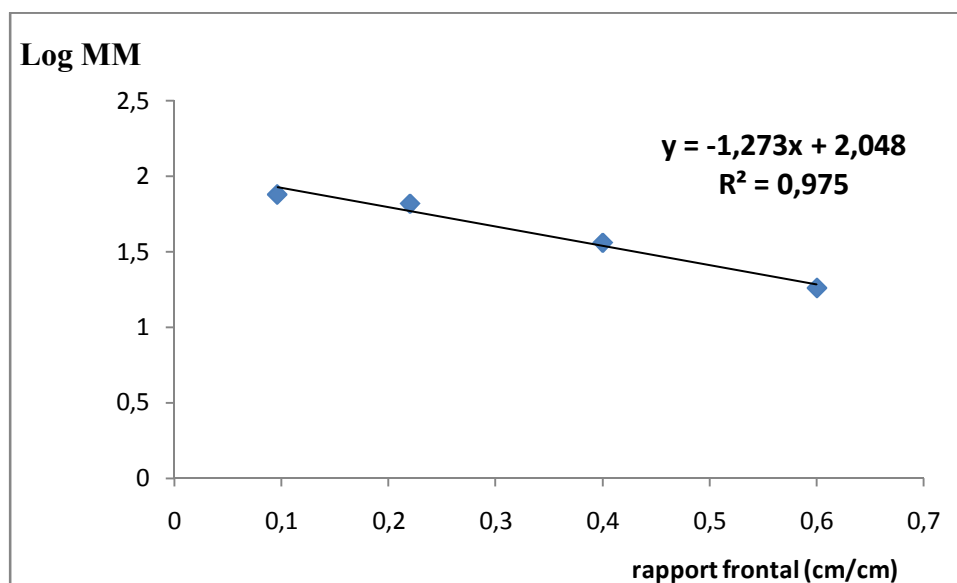


Figure 4: Courbe d'étalonnage pour l'estimation des poids moléculaire du gel SDS-PAGE Des protéines des extraits enzymatiques

I. ELECTROPHORESE DES PROTEINES EN CONDITIONS DENATURANTES (SDS-PAGE) (LAMMELI, 1970)

1. Tampon dénaturation (Bleu 5X) pour glycine SDS-PAGE

Produits	Concentration / Pourcentage initial	Concentration / Pourcentage final	Masse molaire (g/mol)	Quantité
Tris-HCL	312.5 mM	62.5 mM	121.14	1.89 g
EDTA	0.4 mM	0.08 mM	372.24	7.6 mg
SDS	7.5 %	1.5 %	288.38	3.75 g
Glycérol	25 %	5 %		12.5 ml
DTT	150 mM	30 mM	154.25	1.16g
Bleu de bromophénol	0.05%	0.01 %		25 mg

Eau pure qsp: 50ml

2. Solution d'acrylamide

Produits	Pourcentage (%)	Masse molaire (g/mol)	Quantité (g)
Acrylamide	30	71.08	29
Bis acrylamide	0.8	154.17	1

Eau pure qsp: 100ml

3. Tampon resolving Tris-HCl 3M pH 8.8

Produits	Concentration Pourcentage volume	Masse molaire (g/mol)	Quantité
Tris	3 M	121.14	36.34 g
SDS	0.8 %	288.38	0.8 g
β -Mercaptoethanol	0.8ml	78.13	0.8 ml

Eau pure qsp: 100ml

Ajuster à 8.8 avec du HCl

4. Tampon stacking Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

Produits	Concentration Pourcentage volume	Masse molaire (g/mol)	Quantité
Tris	0.5 M	121.14	6.075 g
SDS	0.4 %	288.38	0.4 g
β -Mercaptoethanol	0.2 %	78.13	200 μ l

Eau pure qsp: 100ml

Ajuster à 6.8 avec du HCl.

5. Tampon de migration pour Glycine SDS-PAGE pH 8.3

Produits	Concentration / Pourcentage	Masse molaire (g /mol)	Quantité
Tris	0.025 M	121.14	1.06 g
Glycine	0.192 M	75	5.04 g
SDS	0.1 %	288,38	0.35 g
p-mercaptoéthanol	0.05 %	78.13	175 µl

Eau pure qsp: 350ml

6. Solution de fixation/ décoloration

Produits	Pourcentage
Alcool	30 %
Acide acétique	5 %
Eau distillée	65 %

7. Solution de coloration

Produits	Quantité
Acide acétique 10 %	10 ml
Eau distillée	90 ml
Bleu de Coomassie R 250	0.03 g

8. Ammonium Persulfate APS à 15%

Persulfate d'Ammonium 0,15g

Eau distillée 1ml.

II. COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET DES SOLUTIONS**1. La composition du milieu de culture MUELLER HINTON**

Composition (g/l)	Gélose	Bouillon
Extrait de viande	3	3
Hydrolysate acides de caséine	17,5	17,5
Amidon	1,5	1,5
Agar	16	0

2. Préparation de la solution de la nisine

La nisine se solubilise dans une solution d'H Cl (0.01 N).

Pour 0.25 mg (nisine) 1 mL de solution d'H Cl 0.01N.

Abstract

The aim of this study is to obtain antimicrobial peptides from bovine casein. The active peptides are generated by proteolysis of these proteins, inactive in the native state.

The hydrolysis is carried out by the action of plant proteases obtained from latex of the *Ficus carica* (ficin) and the extract of flowers of the *Cynara cardunculus* (cardosin).

The characterization of plant proteases targeted the determination of activity, coagulant force and proteolytic activity. The hydrolysis of casein was led by applying different ratios E/S (w/w) for the two enzymatic extracts. The hydrolysis is followed by electrophoresis (SDS-PAGE, 15 %) analysis. The degree of hydrolysis is measured by the OPA method. The antimicrobial activity is sought on raw hydrolysates by the method of diffusion of the wells.

The main results obtained have shown that the extract of ficin exhibits coagulant activity of 188, 89 UP and a force coagulant 1/1/45 575. For cardosin coagulant activity is 1, 31 UP and the force coagulant 1/342. In addition, the proteolytic activity was estimated at 24075 μg and 142, 5 μg tyrosine equivalent per mL of enzyme for ficin and cardosin respectively.

The follow-up of the hydrolysis shows that the extension of the hydrolysis under the action of the ficin is pushed more than with the extract of cardoon flowers. The maximal values of the degrees of hydrolysis of the casein gotten under the action of the ficine are of 56, 7% with the ratio 1/100, 40, 9% with the ratio 1/500, 36% for the ratio 1/750 and 29, 68 for the ratio 1/1000. As for the hydrolysis by the extract of cardoon flowers the values are 39, 23% for the ratio 1/10, 32, 26% for the ratio 1/50 and 24, 29% for the ratio 1/100.

The setting in evidence of the antibacterial activity in the different hydrolysates, watch that the proteolytic action of the ficin and the extract of cardoon flowers offers, the possibility to generate some antimicrobial peptides from the bovine caseins.

Under imposed hydrolysis conditions, only the ratio E/S 1/100 for hydrolysis by ficin and the ratios 1/100, 1/50 and 1/10 for the hydrolysis by cardosin had an effect antimicrobial against 3 bacteria Gram (+) (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis*) and a one bacteria Gram (-) (*Escherichia coli*).

Under the action of the ficine the antimicrobial peptides is gotten has rates of hydrolyses correspond to the 6,24%, 13,25%, 24,75, 30,67% and 37,21%. The action of the cardosin frees active peptides in weaker DH and the antimicrobial activity has been gotten between 5min and 1h hydrolysis corresponding in DH between 1, 7% and 18, 32%.

The comparison of the results of the antimicrobial activity and those of the analyses électrophorétiques indicate a correlation between the presence of activity and the intermediate peptides letting suppose that these last those that are active in the raw hydrolysate.

This study has shown that proteases found in the latex of *F.carica* and flowers cardoon may be used for the proteolysis of the milk casein, as well as for generating antimicrobials peptides.

Key words: antimicrobial peptides, bovine caseins, cardosin, ficin, enzymatic hydrolysis

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو الحصول على الببتيدات المضادة للميكروبات من كازين الأبقار. يتم إنشاء هذه الببتيدات بواسطة التحلل البروتيني لهذه البروتينات، الغير نشطة في حالته الأصلية. تم التحلل من قبل انزيمات نباتية مستخرجة من النسغ الكامل لشجرة التين (الفيسين) و من أزهار الخرشوف البري(كاردوزين).

توصيف هذه الأنزيمات هدف أساسا إلى تحديد نشاط و قوة تخثر الحليب بواسطتها، كما تمت دراسة قوة إما هتها للبروتينات، تم تتبع التحلل المائي لكازين الأبقار بواسطة أسلوب التحلل الكهربائي (SDS-PAGE 15%). وتم قياس درجة التحلل عن طريق OPA. تم تحديد نشاط ناتج التحلل الخام ضد الميكروبات الممرضة وفق طريقة الانتشار عبر الثقوب مع سلالة مستهدفة.

النتائج المحصل عليها أظهرت أن مستخلص الفيسين يمتلك نشاط تخثري قدر ب U.P 188,89 و قوة تخثر قدرت 45575/1. فيما يخص مستخلص الأزهار فقد سجلنا نشاط تخثري يقدر ب U.P. 1,3 و قوة تخثر 342/1 بالإضافة إلى ذلك، قدرت قوة إمالة البروتينات ب 24075 μg و 142,5 μg من التيروزين لكل ملتر من الفيسين و مستخلص الأزهار على التوالي.

تتبع التحلل عن طريق OPA بين أن التحلل بواسطة الفيسين اشد من التحلل بواسطة مستخلص أزهار الخرشوف. القيم القصوى لدرجة التحلل المائي تحت عمل فيسين هي 7, 56% بالنسبة 1:100، 40.9% بالنسبة 1:500، ونسبة 36% بالنسبة 750/1 و 29.68 بالنسبة 1000/1. فيما يتعلق بالتحلل بواسطة مستخلص أزهار الخرشوف القيم القصوى المئوية لدرجة التحلل المائي هي 39,23 بالنسبة 10/1، 32. 26 بالنسبة 50/1 و 29,24 بالنسبة 1:100.

تسليط الضوء على نشاط الببتيدات المختلفة التي تم الحصول عليها ضد البكتيريا ، بينت أن عمل فيسين و مستخلص أزهار الخرشوف البري يتيح إمكانية توليد مضادات الميكروبات الببتيدات من الكازين ألبقري.

في ظل الشروط المفروضة، فقط البروتيووليسيز مع نسبة 1/100 للتحلل بواسطة الفيسين والنسب: 100/1 و 50/1 و 10/1 للتحلل بواسطة مستخلص الأزهار لها تأثير مضادات الميكروبات ضد 3 سلالات موجبة الغرام (+) (*Enterococcus* ، *fecalis Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*) و سلالة واحدة سالبة الغرام (-) (*Escherichia coli*) .

تحت عمل الفيسين الببتيدات المضادة للميكروبات تم الحصول عليها في نسب التحلل المائي 8.46% و 24,75 و 13.25% و 37.21%. تحت عمل الكاردوزينات الببتيدات النشطة تم الحصول عليها في نسب تحلل مائي منخفضة منحصرة بين 5 دقائق و 60 دقيقة من التحلل و الموافقة لنسب تحلل منحصرة بين 1.7% و 18.32%.

مقارنة نتائج نشاط مضادات الميكروبات و التحلل الكهربائي (SDS-PAGE 15%) تشير إلى وجود علاقة بين وجود نشاط و الببتيدات المتوسطة مما يوحي بأن هذه الأخيرة هي المسؤولة عن النشاط في الخليط الإجمالي المحصل عليه. هذا العمل أثبت أن الإنزيمات المستخرجة من النسغ الكامل لشجرة التين و من أزهار الخرشوف البري قادرة علي إنتاج ببيثيدات مضادة للميكروبات من كازين الأبقار .

الكلمات الرئيسية: الببتيدات المضادة للميكروبات، كازين الأبقار، التحلل البروتيني ، فيسين, كاردوزين

Résumé

L'objectif de la présente étude est l'obtention de peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines. Les peptides d'intérêt sont générés par protéolyse de cette protéine, inactive à l'état natif, sous l'action de deux protéases végétales : la ficine et la cardosine, elles sont extraites à partir du latex de figuier et de fleurs de cardon.

La caractérisation des extraits enzymatiques obtenus a visé la détermination de l'activité et la force coagulante, ainsi, l'activité protéolytique. L'hydrolyse des caséines a été conduite en appliquant plusieurs ratios E/S (P/P) pour les deux extraits enzymatiques. Le suivi de l'hydrolyse est effectué à l'aide d'analyses électrophorétique (SDS-PAGE à 15%) et le degré de protéolyse est mesuré par la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA). L'activité antimicrobienne est recherchée sur les hydrolysats bruts par mise en contact avec une souche cible selon la méthode de diffusion en puits.

Les principaux résultats obtenus de la caractérisation des extraits enzymatiques, ont montré que l'extrait de ficine présente une activité coagulante de 188,89 U.P. et une force coagulante de 1/45 575. Pour l'extrait de fleurs de cardon l'activité coagulante est de 1,31 U.P. et la force coagulante de 1/342. En plus, l'activité protéolytique a été estimée à 24075 µg et à 142,5 µg d'équivalent tyrosine par ml d'enzyme pour la ficine et l'extrait de fleurs de cardon respectivement.

Le suivi de l'hydrolyse montre que l'extension de l'hydrolyse sous l'action de la ficine est plus poussée qu'avec l'extrait de fleurs de cardon. Les valeurs maximales des degrés d'hydrolyse de la caséine obtenues sous l'action de la ficine sont de 56,7% avec le ratio 1/100, 40,9% avec le ratio 1/500, 36% pour le ratio 1/750 et 29,68 pour le ratio 1/1000. Quant à l'hydrolyse par l'extrait de fleurs de cardon les valeurs sont 39,23% pour le ratio 1/10, 32,26% pour le ratio 1/50 et 24,29% pour le ratio 1/100.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne dans les différents hydrolysats obtenus, montre que l'action protéolytique de la ficine et l'extrait de fleurs de cardon offre, la possibilité de générer des peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines.

Sous les conditions de protéolyse appliquées seuls, le ratio: E/S 1/100 pour l'hydrolyse par la ficine et les ratios : 1/100, 1/50 et 1/10 pour l'hydrolyse par l'extraits de fleurs de cardon ont généré des protéolysats ayant un effet antimicrobien contre 3 souche Gram (+) (*Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis*) et une souche à Gram (-) (*Escherichia coli*).

Sous l'action de la ficine les peptides antimicrobiens sont obtenus a des taux d'hydrolyses (DH) correspondent aux 6,24%, 13,25%, 24,75, 30,67% et 37,21%. L'action de la cardosine libère des peptides actifs à des DH plus faible et l'activité antimicrobienne a été obtenue pour les trois ratios E/S entre 5min et 1h d'hydrolyse correspondant des valeurs comprises entre 1,7% et 18,32% des degrés d'hydrolyses.

La comparaison des résultats de l'activité antimicrobienne et ceux des analyses électrophorétiques indique une corrélation entre la présence d'activité et les peptides intermédiaires laissant supposer que ces derniers qui sont actifs dans les hydrolysats bruts.

Cette étude a montré que les protéases extraites du latex de *F. carica* et des fleurs de *C. cardunculus* peuvent être utilisés pour la protéolyse des caséines bovines, afin de générer peptides antimicrobiens.

Mots clés : caséines bovines, cardosine, ficine, hydrolyse enzymatique, peptides antimicrobiens.