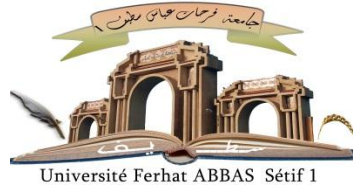


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITÉ FERHAT ABBAS - SETIF 1

FACULTÉ DE TECHNOLOGIE

THESE

Présentée au Département du Génie des procédés

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Option: Génie des procédés pharmaceutiques

Par

BEN ABBES Farah

THÈME

**Propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de la
caséine du lait de chamelle et ses hydrolysats
pepsiques et applications**

Soutenu le 26/ 07/2021 devant le jury composé de :

BENANIBA Mohamed Tahar	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Président
BELHATTAB Rachid	Professeur	Univ. Ferhat Abbas Sétif 1	Directeur de thèse
ZELLAGUI Amar	Professeur	Univ. Oum El Bouaghi	Examineur
GHERRAF Noureddine	Professeur	Univ. Oum El Bouaghi	Examineur
MESSAOUDI Abdelatif	Professeur	Univ. Batna 1	Examineur

REMERCIEMENTS

La page des remerciements, est une opportunité d'adresser mes plus sincères pensées à tous ceux qui m'ont aidé à murir tout en progressant dans ma vie et qui ont été présents à mes côtés durant toutes ces années.

Je commence par adresser mes plus chaleureux remerciements :

A mon promoteur **Pr. Rachid Belhattab** pour sa patience, ses précieux conseils, pour sa disponibilité exceptionnelle et ses nombreuses critiques constructives. Aux **Pr. M. Seghier**, et **Dr. D. Boulahbal- Anes**, qui m'ont accueilli dans leur laboratoire de polio- institut Pasteur annexe Sidi Fredj - Alger, pour leur appui, et leur générosité. A **Dr. Y. Noui** du laboratoire de Biochimie et Nutrition département de la Technologie Alimentaire, université Hadj-Lakhdher Batna- 1. Pour son aide et présence indispensable. A **Mr. Yammami** du service contrôle de qualité de lait, Aures -Lait, Batna ainsi qu'au personnel du labo de Microbiologie du CHU de Batna .A **Pr. B. Botta** du département de Chimie et de Technologie de Pharmacie, ainsi que **Pr. M.L. Mangoni** du laboratoire de Microbiologie, Université Sapienza, Rome, Italie, pour leurs accueil, leur conseils, et leur aide. Je tiens à préciser que l'acquisition de données en si peu de temps aurait été impossible sans l'inestimable collaboration de braves gens dont il serait ingrat de taire les noms :

- **A.Ghiloubi** ingénieur du laboratoire de génie de procédés alimentaires et au personnel du laboratoire de Sciences des aliments (**LSA**), département de la Technologie Alimentaire, université Hadj- Lakhdher, Batna 1. Ainsi qu'à celui du laboratoire de microbiologie appliquée (**LMA**), université de Ferhat Abbas, Sétif 1.

-**Dr. C. Benbetka** du laboratoire P3 institut Pasteur, Annexe Sidi Fredj Alger.

-**Dr. B. Casiaro**, et **Dr. M. Lofredo** du laboratoire de Microbiologie, Université Sapienza, Rome, Italie.

-**Pr. H. Gouzi**, département de Biologie, Université Amar Thelidji- Laghouat.

À ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre à réaliser ce travail.

Finalement, je remercie ma famille et mes amies pour leur encouragement et leur compréhension, un merci spécial à Mira Malika qui a toujours cru en moi, à mon PAPA et MOMI avec qui j'ai traversé toute l'Algérie du bout à l'autre.

Dédicaces

A mes parents

Qui m'ont apporté leur soutien

Qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras

A mes deux frères et ma sœur

Qui m'ont poussé à continuer

A mon professeur

Pour le savoir qu'il m'a transmis

A mes amis

Pour leur écoute

SOMMAIRE

Résumés

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Etude bibliographique

Chapitre I

Le dromadaire

I.1. Classification.....	5
I.2. Origine du dromadaire.....	5
I.3. Répartition.....	6
I.4. Morphologie.....	7
I.5. Alimentation.....	7
I.6. Système d'élevage.....	8
I.7. Races du dromadaire en Algérie.....	9

Chapitre II

Le lait camelin

II.1. Définition.....	12
II.2. Production de lait de chamelle.....	12
II.3. Caractéristiques du lait de chamelle.....	12
II.3.1. Paramètres physiques.....	12
II.3.1.1. Densité.....	12
II.3.1.2. Acidité Dornic.....	12
II.3.1.3. Le pH.....	12
II.3.2. Composition chimique.....	13
II.3.2.1. Teneur en eau.....	13
II.3.2.2. Matière grasse.....	13
II.3.2.3. Le lactose.....	13
II.3.2.4. Les vitamines.....	13
II.3.2.5. Fraction azotée.....	13
II.3.2.5.1. Fraction d'azote non protéique.....	13
II.3.2.5.2. Fraction d'azote protéique.....	14
II.3.2.6. Teneur en minéraux.....	17
II.4. Caractéristiques thérapeutiques du lait de chamelle.....	17
II.4.1. Propriétés antimicrobiennes.....	18
II.4.1.1. Activité antibactérienne.....	18
II.4.1.2. Activité antivirale.....	18
II.4.2. Prévention de la maladie du diabète.....	18
II.4.3. Effet anti cholestérol.....	18
II.4.4. Activité anti cancéreuse.....	18
II.4.5. Traitement de la tuberculose.....	19
II.4.6. Traitement de la maladie de Crohn.....	19
II.4.7. Effet anti allergique.....	19

Chapitre III

Les peptides bioactifs

III.1. Définition.....	21
III.1.1. Les peptides opiacés.....	22
III.1.2. Les peptides anti-thrombotiques.....	22
III.1.3. Les peptides vecteurs de transport d'oligoéléments.....	22
III.1.4. Les peptides anti –hypertensifs.....	22
III.1.5. Les peptides immunomodulants.....	23
III.1.6. Les peptides antioxydants.....	23
III.2. Production des peptides bioactifs.....	23
III.3. Les peptides bioactifs à l'échelle industrielle.....	24
III.4. Les peptides bioactifs du lait camelin.....	24
III.5. Catalyse enzymatique par la pepsine.....	26
III.5.1. La pepsine et son zymogène.....	26
III.5.2. Clivage.....	26

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes.....	30
I.1. Provenance du lait utilisé.....	30
I.2. Analyses physico-chimiques.....	30
I.2.1. Le pH.....	30
I.2.2. La densité.....	30
I.2.3. Indice de réfraction.....	30
I.2.4. L'acidité titrée (acidité Dornic).....	30
I.3. Analyses biochimiques.....	30
I.3.1. Matière sèche.....	30
I.3.2. Teneur en eau.....	31
I.3.3. Teneur en cendres.....	31
I.3.4. Teneur en matière grasse.....	31
I.3.5. Teneur en lactose.....	31
I.3.6. Matière azotée totale.....	31
I.3.7. Teneur en protéines sériques et caséines.....	32
I.3.8. Dosage des caroténoïdes.....	32
I.3.9. Dosage de la vitamine C.....	33
I.4. Méthode d'analyse.....	34
I.4.1. Séparation de la caséine et du lactosérum.....	34
I.4.2. Obtention d'hydrolysats pepsiques.....	34
I.4.3. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.....	34
I.4.4. Analyse par RP-HPLC (Reversed –phase high performance liquid chromatography.....	36
I.4.5. Mesure par ATR-FTIR.....	37
I.5. Activité antioxydante et antiradicalaire.....	37
I.5.1. La capacité totale antioxydante (TAC): test du phosphomolybdate.....	37
I.5.2. Test de réduction du fer (reducing power).....	37
I.5.3. Test du piégeage du radical ABTS+•.....	38
I.5.4. Test du piégeage du radical DPPH.....	38

I.6. Activité anti microbienne.....	39
I.6.1. Essai de la dose létale	39
I.6.1.1. Souches utilisées.....	39
I.6.1.2. Préparation des milieux de culture.....	40
I.6.2. Préparation du milieu solide et dépôt des hydrolysats.....	40
I.7. Activité antivirale.....	40
I.7.1. Culture cellulaire.....	40
I.7.1.1. Milieu.....	40
I.7.1.2. Entretien des cellules.....	41
I.7.2. Détermination du titre viral sur les A549.....	41
I.7.2.1. Calcul du titre.....	41
I.7.3. Dilution.....	41
I.7.3.1. Dilution de la caséine cameline et ses hydrolysats.....	41
I.7.3.2. Dilution du virus.....	42
I.7.3.3. Suspension cellulaire.....	42
I.7.4. Manipulation.....	42
I.8. Activité anti lithiasique.....	43
I.8.1. Formation de cristaux.....	43

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Caractéristiques du lait camelin collecté.....	46
II.1. Choix de la race.....	46
II.2. Caractéristiques du lait camelin.....	46
II.2.1. Le pH.....	46
II.2.2. La densité.....	47
II.2.3. L'indice de réfraction.....	47
II.2.4. L'acidité titrée (acidité Dornic).....	47
II.3. Analyse biochimique.....	47
II.3.1. La matière sèche.....	47
II.3.2. L'eau.....	47
II.3.3. Les cendres.....	47
II.3.4. Teneur en matière grasse.....	48
II.3.5. Le lactose	48
II.3.6. Matière azotée totale.....	48
II.3.7. Teneur en protéines sériques et caséines.....	48
II.3.8. Teneur en caroténoïdes.....	48
II.3.9. Teneur en vitamine C.....	48
II.4. Analyse et purification de la caséine cameline et ses hydrolysats.....	49
II.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant.....	49
II.4.2. Analyse par RP-HPLC de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	50
II.4.3. Mesure par ATR-FTIR.....	60
II.5. Activités antioxydante et antiradicalaire.....	68
II.5.1. La capacité totale antioxydante (TAC): test du phosphomolybdate.....	68
II.5.2. Test de réduction du fer (reducing power).....	69
II.5.3. Test de piégeage du radical ABTS ^{•+}	70
II.5.4. Test de piégeage du radical DPPH.....	71
II.6. Activité antimicrobienne.....	72
II.6.1. Sensibilité des bactéries et levures à la caséine et ses hydrolysats pepsiques.....	72

II.7. Activité antivirale.....	75
II.7.1. Cytotoxicité de la caséine et ses hydrolysats sur les lignées cellulaires.....	75
II.7.2. Activité antivirale de la caséine et ses hydrolysats.....	78
II.8. Activité antilithiasique.....	86
Conclusion et perspectives	91
Références bibliographiques	94
Annexes	113

ملخص

يعتبر حليب الإبل من العناصر الغذائية الأساسية للبدو الرحل، وتشمل فوائده القدرة على تعزيز نمو الجسم، الوقاية من مرض السكري، تعزيز المناعة والدورة الدموية وتخفيف الحساسية. الهدف من هذه الدراسة هو تقدير التركيب الكيميائي الفيزيائي لحليب الإبل الذي تم جمعه في أبريل 2018، في منطقة الأغواط، والتحقق من خصائص مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات والنشاط المضاد للحصى للبروتين الرئيسي في حليب الإبل وهو الكازيين. وكذلك تلك الخاصة بنواتج الاماهة بالبيبيسين التي تم الحصول عليها خلال فترة زمنية تتراوح من 0 إلى 180 دقيقة. يحتوي الحليب الذي تم جمعه على درجة حموضة مقدارها 0.1 ± 6.32 حمض Dornic بمقدار 1 ± 17.1 D^o، ومحتوى الدهون 1 ± 28 غ / لتر مع محتوى نيتروجين بنسبة $0.01 \pm 4.3\%$ ، يحتوي على مصّل اللين 7.9 غ / لتر و 34.08 غ / لتر من الكازيين، الرماد 9 غ / لتر. مادة جافة $0.5 \pm 13\%$ ، مضادات الأكسدة مثل الكاروتينات 0.16 مغ / لتر مما يفسر اللون الأبيض للحليب، بينما فيتامين C، يبدو أنه يتجاوز 25.25 مغ / لتر. أظهرت الهجرة الكهربائية بواسطة الترسيب الكهربائي SDS-PAGE، وجود شريط بالقرب من 28 kDa وكلما طالت مدة التحلل المائي زادت الهجرة الكهربائية للمكونات. مكنت تقنية RP-HPLC من ظهور معول فردي خاص بالكازيين، والذي تنخفض شدته مع زيادة زمن التحلل المائي. أظهر التغيير في البنية الثانوية المحصل عليه بفك حزام الاميد بطريقة ATR-FTIR ارتفاع نسب الكوع: الكازيين 1.8% و 7.38% بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليه بعد 180 دقيقة. اجريت اربع تحاليل لتقييم النشاط المضاد للأكسدة منها طريقة 2,2'- (ABTS) 2,2- diphenyl-1-picryl hydrazyl و azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (DPPH)، وكانت النتائج 54.63% و 30% للكازيين وتتراوح من 83,1% و 17% بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليه بعد 180 دقيقة من التحلل على الترتيب. فيما يتعلق بالقدرة المضادة للأكسدة لطريقة الفسفوموليبيديوم و ارجاع الحديد، تراوح الامتصاص من 0.164 الى 0.176 و من 0.136 الى 0.7 بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليها من 15 الى 180 دقيقة على التوالي. النشاط المضاد للميكروبات الكازيين ليس له تأثير على *Bacillus megaterium* BM 11، *Escherichia coli* ATCC 25922، *Staphylococcus aureus* ATCC 25922، *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228، *Acinetobacter baumannii* ATCC 25922، *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 1918 NCPPB، *Candida parasilopsis* ATCC 22019، *Candida albicans* ATCC 24433، ATCC 19606 جميع و نواتج الاماهة تأثيرا مثبتا على الكائنات الحية الدقيقة باستثناء *S. aureus*، وذلك بتركيز 80 مغ / مل. اجري النشاط المضاد لفيروس كوكساعي ب6 في الزجاج وتم تقدير كمية الخلايا الحية Vero, A549 بعد اضافة الفيروس المعامل مسبقا بالكازيين و نواتج الاماهة المحصل عليها بعد 72 ساعة. أظهرت العينات نشاط سمي خلوي بتركيز 1120 ميكروغرام / مل. ابدت الكازيين و نواتج الاماهة المحصل عليه بعد 60 دقيقة القدرة على حماية كلتي الخلايا من الاصابة بالفيروس IMO1 بتركيز 112 ميكروغرام / مل بمعدل 100%. في حين كان لنواتج تحلل اماهة 90 تأثير على خلايا Vero فقط. تم تقدير النشاط المضاد لتشكيل الحصى الكلوي حيث كان للكازيين القدرة على منع تشكل الرواسب عكس نواتج التحلل.

كلمات مفتاحية: كازيين الإبل، نواتج الاماهة بالبيبيسين، النشاط المضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، النشاط المضاد للفيروسات، نشاط مضاد للحصى.

Résumé

Le lait de chamelle est un nutriment de base des nomades, ses avantages comprennent sa capacité à favoriser la croissance du corps, prévenir le diabète, stimuler l'immunité et la circulation sanguine et atténuer les réactions allergiques. Cette présente étude a pour objectif d'estimer la composition physicochimique du lait de chamelle collecté en mois d'Avril 2018, dans la région de Laghouat et d'investiguer le potentiel antioxydant, antimicrobien et antilithiasique de la protéine majeure du lait camelin qui est la caséine : ainsi que celui de ses hydrolysats pepsiques obtenus sur un intervalle de temps allant de 0 à 180 min d'hydrolyse. Le lait collecté présente un pH acide de 6.32 ± 0.1 avec une acidité Dornic de $17.1 \pm 1^\circ\text{D}$, la matière grasse représente 28 ± 1 g/L avec un taux de matière azotée de $4.3 \pm 0.01\%$ dont une teneur du lactosérum de 7.9 g/L et 34.08 g/L de caséine, les cendres sont à 9 ± 0.1 g/L quant au taux de matière sèche, il revient à $13 \pm 0.5\%$. Le taux d'antioxydants tels que les caroténoïdes est faible 0.16 mg/L ce qui explique la couleur blanchâtre du lait, quant à la vitamine C, sa teneur semble élevée : 25.25mg/L. La caractérisation par électrophorèse SDS-PAGE, de la caséine montre une bande avoisinant les 28 kDa et plus le temps d'hydrolyse est long, plus les bandes sont diffuses. Purifiée par la méthode RP-HPLC, la caséine présente un pic singulier, qui diminue d'intensité au fur et à mesure que le temps d'hydrolyse augmente. La déconvolution de la bande Amide I obtenue par la technique ATR-FTIR, a montré un changement de structure notamment l'augmentation des coudes de 1.8% (caséine) à 7.38% après 180 min d'hydrolyse. Concernant l'activité antioxydante, quatre tests ont été réalisés : à savoir par les méthodes de l'acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS avec 54.63% d'inhibition pour la caséine et atteignant 83,1 % pour l'hydrolysats de 180 min. L'inhibition du radical 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) était de 30% pour la caséine et 17% pour les hydrolysats à 180 min. Les DO des tests de réduction de fer, et du molybdate, voient leur absorbance augmenter de 0.164 à 0.176 et de 0.136 à 0.7 de 15 à 180 min d'hydrolyse, respectivement. L'activité antibactérienne de la caséine révèle l'absence d'effet sur *Bacillus megaterium* BM 11, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 1918 NCPPB, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Candida parasilopsis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 24433. Tandis que tous les hydrolysats ont manifesté un effet inhibiteur sur les microorganismes sauf sur *S. aureus*, à une concentration de 80 mg/mL. La caséine et ses hydrolysats à des concentrations de 0.035-120 µg/mL favorisent la survie des lignées cellulaires Vero et A549 et leur prolifération mais manifestent un effet cytotoxique à 1120µg/mL. Les résultats des tests de l'évaluation de l'activité antivirale vis à vis du virus Cox B6 préincubé à 1 MOI sur des cellules Vero et A549 mettent en évidence l'efficacité de de la caséine et l'hydrolysats de 60 min à 112µg/mL, à 100%. L'hydrolysats de 90 min était efficace à 100% sur les cellules Vero uniquement, après 72h d'incubation. L'effet antilithiasique de la caséine par inhibition de formation de cristaux est très prometteur tandis que les hydrolysats étaient inactifs.

Mots Clés : Caséine cameline, hydrolysats pepsiques, antioxydants, antimicrobiens, antiviral, antilithiasique.

Abstract

Camel milk has always been a major traditional staple in the nutrition of the pastoral nomadic people, its benefits include its ability to promote the growth of the body, prevent diabetes, stimulate immunity, blood stream and alleviate allergic reactions. For the purpose of this study, we broadly define physicochemical properties of camel milk collected in April 2018, from Laghouat region and to investigate the antioxidant, antimicrobial antiviral potential and anti-lithiasis properties of casein: major protein camel milk and those of its peptic hydrolysates after 180 min of hydrolysis. The pH of collected milk was 6.32 ± 0.1 and $17.1 \pm 1^\circ\text{D}$ Dornic acidity, fat content rose to $28 \text{ g / L} \pm 1$ while nitrogen content was found to be $4.3\% \pm 0.01$. Casein is the dominant protein group with 34.08 g / L followed by whey 7.9 g / L ; Ash content was $9 \text{ g / L} \pm 0.1$ and $13\% \pm 0.5$ dry matter. The mean content of carotenoids was 0.16 mg/L which explain opaque white colour of milk, the amount of vitamin C seems high 25.25 mg / L . Molecular weights profile of milk casein separated by SDS-PAGE electrophoresis gave an estimation of 28kDa while casein hydrolysates show high electrophoretic mobility. The RP-HPLC procedure was used for the separation of casein, different chromatographic profiles were obtained, change in secondary structure of casein and casein hydrolysates obtained by ATR- FTIR spectrum and deconvolution curves were obtained. Increase in the contents of β -turn 7.38% in casein hydrolysates of 180 min was noticed compared to the original casein sample 1.8%. Samples were screened for possible antioxidant activities following four tests, among them free radical scavenging activity 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Casein showed 54.63% and 30% scavenging activity compared to 83.1 %17% for 180 min hydrolysis sample respectively. Concerning antioxidant capacity of the reducing power and phosphomolybdenum methods, absorbance rose from 0.164 to 0.176 and from 0.136 to 0.7 from 15 to 180 min hydrolysis respectively. Antimicrobial activity was tested by using the inhibition zone assay on LB-agarose plates against several Gram positive and Gram-negative bacteria, casein has no effect on *Bacillus megaterium* BM 11, *Staphylococcus epidermis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* 1918 NCPPB, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Candida parasilopsis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 24433, while all hydrolysates showed an inhibitory effect on microorganisms except for *S. aureus*, at a concentration of 80 mg / mL. The antiviral activity was assessed *in vitro* against Coxsackie B6 virus (Cox B6), by evaluating the amount of viable cell (Vero and A549 cells) after the addition of Cox B6 pre-treated with casein and the hydrolysate for 72h .Samples revealed cytotoxicity at $1120 \mu\text{g/mL}$. Casein and 60 min hydrolysate ($112 \mu\text{g/mL}$) were able to protect Vero and A549 cells from harmful viral infection (1MOI), at a rate of 100%, while 90 min hydrolysate was efficient on Vero cells only. Anti lithiasis test was assessed and casein could prevent calculus formation unlike hydrolysates.

Key words: Camel casein, pepsin hydrolysates, antioxidant, antimicrobial, antiviral, antilithiasis.

Liste des abréviations

α -La : α -Lactalbumine

A 549: Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de Normalisation

Ala : Alanine

AMPs: Antimicrobial peptides

AN : Assession number

Arg : Arginine

ARNm : Acide ribonucléique message

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ATR: Attenuated Total Reflectance

β -Lg : β -Lactoglobuline

Bcl 2: B-cell lymphoma 2

BSA: Bovin serum albumin

BT-474: Human breast tumor

CDV-Lederle: Canine distemper virus

CNH: Hydrolysate de caséine

COM : Calcium oxalate monohydraté

CVB6 : Virus Coxsackie serotype 6

Cys : Cystéine

D : Dornic

DIC T₅₀ : Dose infectieuse en culture de tissu 50 %

DIPh: Di-chloro-2, 6-phénolindophénol

DMEM: Dubelco Eagle's minimal essential medium

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle

DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

ECP: Effet cytopathique

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

Gln : Glutamine

Glu : Acide glutamique

HCC1937 BL: Lymphoblastoid cell line

HCT 116 : Lignée cellulaire de cancer du côlon humain

HeLa: Immortal human cell

HepG2: Liver cancer cell line

His: Histidine

HPLC: High pression Chromatographie liquide

Ig: Immunoglobuline

IGF: Insulin-like growth factor

IL- 12: Interleukin

IP : Inositol trisphosphate

Leu: Leucine

Lf : Lactoferrine

MCF7 : Mechigan cancer foundation (lignée de cellules tumorales mammaires)

Met: Methionine

MOI: Multiplicity of infection

NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria

PBS: Phosphate-buffered saline

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PGRPs: Peptidoglycan recognition proteins

Phe: Phenylalanine

Pro: Proline

SDS: Dodécyl sulfate de sodium

SOD: Superoxide dismutase

STAT: Signal transducers and activators of transcription

TCA : Acide trichloroacétique

TEMED : (N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène-diamine)

TFA: Triflouroacétique

TNF α : Tumor necrosis factor

Trp: Tryptophane

Tyr: Tyrosine

VHC: Virus de l'hepatite C

Liste des figures

Figure 1	Distribution et points d'introduction du chameau domestique (Wilson ,1998)..	5
Figure 2	Aires de distribution du dromadaire en Algérie (Ben- Aissa, 1989).....	7
Figure 3	Distribution géographique de dromadaire en Algérie (Cherifi <i>et al.</i> , 2017)...	10
Figure 4	Micrographie électronique d'une micelle des caséines bovines réalisée par microscope électronique à balayage à émission de champ. Barre d'échelle = 200 nm (Dalgleish <i>et al.</i> , 2004).....	16
Figure 5	Modèle de structure de la micelle de caséine développé par Holt, (1992).....	16
Figure 6	Diverses fonctions des peptides bioactifs issus des protéines du lait (Dziuba,2014).....	21
Figure 7	Séquence complète d'acides aminés de la pepsine porcine (Sepulveda, 1975).....	27
Figure 8	Présentation schématique du clivage entre les positions P1 et P1' après formation du complexe enzyme –substrat en 08 sites de liaison (Anonyme - 2,2020).....	27
Figure 9	Mécanisme d'action de l'oxydation de la vitamine C par le 2,6 di chloro-phénol-indophénol (2,6-DIPh) (Rao <i>et al.</i> , 1987).....	33
Figure 10	Structure du radical DPPH et sa réduction par un antioxydant (Milardovic <i>et al.</i> ,2005).....	38
Figure 11	Organisation de microplaque pour essai de sensibilisation du virus CVB6 à la caséine et ses hydrolysats peptiques.....	43
Figure 12	Electrophorèse de la caséine cameline sur SDS-PAGE.....	49
Figure 13	Electrophorèse de la caséine du lait camelin et ses hydrolysats A : 60 min B : 90 min, C :120 min en SDS PAGE , gel de concentration T= 4.8% ; C= 2.7, gel de séparation :T=17% ; C= 2.7% de	50
Figure 14	RP-HPLC chromatogrammes de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	59
Figure 15	Spectres FTIR-ATR de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	65

Figure 16	Déconvolution de la bande d'amide I de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	67
Figure 17	Evaluation de l'activité antioxydante des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline par le test du phosphomolybdate exprimée en absorbance	68
Figure 18	Evaluation de l'activité antioxydante des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline par le test de réduction du fer exprimée en absorbance	69
Figure 19	Activité anti radicalaire exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS en présence des hydrolysats pepsiques.....	70
Figure 20	Activité anti radicalaire exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en présence des hydrolysats pepsiques.....	72
Figure 21	Activités antibactérienne et antifongique de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	73
Figure 22	Activité antivirale de l'hydrolysat 60 min de la caséine cameline utilisant les cellules Vero et CVB6.....	76
Figure 23	Activité antivirale manifestée par la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques utilisant les cellules A549 et CVB6.....	78
Figure 24	Activité antivirale de la caséine cameline contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (1 MOI).....	79
Figure 25	Activité antivirale de la caséine cameline contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (0.1 MOI).....	80
Figure 26	Activité antivirale de l'hydrolysat (30 min) contre CVB6 infectant cellules A549 (1et 0.1 MOI).....	81
Figure 27	Activité Antivirale de l'hydrolysat (60 min) contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (1MOI).....	82
Figure 28	Activité antivirale de l'hydrolyst (60 min) contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 0.1 MOI.....	83
Figure 29	Antivirale de l'hydrolysat de (90 min) contre CVB6, infectant les cellules Vero (1 MOI).....	83
Figure 30	Formation de cristaux type COM	87

Figure 31	Diminution de formation de cristaux après ajout de caséine cameline.....	87
Figure 32	Effet de l'ajout des hydrolysats sur la formation des cristaux.....	88

Liste des Tableaux

Tableau I	Quelques peptides présents sur la structure primaire des caséines bovines et leurs activités.....	25
Tableau II	Composition de gels SDS- PAGE.....	35
Tableau III	Programme de solvant pour résolution de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	36
Tableau IV	Dilutions finales de l'échantillon.....	42
Tableau V	Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de la région de Laghouat.....	46
Tableau VI	Pourcentage de changement de la structure secondaire de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques.....	67
Tableau VII	Diamètres de zones d'inhibition (mm) de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques sur différentes souches	74

Introduction

INTRODUCTION

Le lait constitue, pour l'homme une source de nutriments de base : protéines, glucides lipides, ainsi de vitamines et minéraux notamment le calcium. L'Algérie, est un grand consommateur de lait : près de 117 litres de lait par an et par habitant (**Souki,2009**). Par ailleurs l'insuffisance de la production nationale conduit à une importation massive de lait en poudre, ce qui fait de notre pays le deuxième plus grand importateur après le Mexique. Le lait représente une part de 18.4 % dans les importations alimentaires (**Makhlouf et al., 2015**), cette dépense poussa l'état à encourager la production laitière qui est assurée par le cheptel bovin à 80%, le reste par le lait de brebis et le lait de chèvre, cependant la production laitière cameline est marginale (**Dilmi -Bouras, 2008**).

Le lait de chamelle a été depuis longtemps une principale ressource alimentaire des nomades, consommé cru, les populations asiatiques où le chameau bactériane prédomine, lui attribuent des vertus bénéfiques tels que la substitution du lait maternel pour nourrisson, la prise de poids, augmentation de l'appétit mais aussi des propriétés thérapeutiques appuyées par la recherche scientifique : prévention des maladies du foie, la tuberculose, le diabète, la maladie de Crohn... etc.(**Galali et Al-Dmoor, 2019**). Dès la fin des années 70, de nombreuses études se sont focalisées sur les molécules bioactives issues des protéines alimentaires, et leur application dans des domaines où les enjeux de la santé sont importants. Les constituants actifs du lait encryptés dans leurs séquences, et libérés par hydrolyse enzymatique, peuvent servir d'agents thérapeutiques dus à leur large spectre d'action, faibles niveaux de toxicité, diversité structurale et absence ou faible niveau d'accumulation dans les tissus (**Marx, 2005**).

Le stress oxydant fait référence au déséquilibre entre la génération des espèces oxygénées activées EOA, qui proviennent de l'oxygène moléculaire non réduit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et la capacité de l'organisme à les neutraliser (**Aravodis, 2005**). Les principales cibles biologiques des EOA sont : l'acide désoxyribonucléique (ADN), les protéines et les lipides membranaires, ce qui a pour conséquence l'endommagement de la membrane cellulaire, le vieillissement et à l'apoptose (**Haleng et al., 2007**). L'organisme vivant dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes : enzymatique comme la superoxyde dismutase SOD et non enzymatique divisé en antioxydants endogènes comme le glutathion et exogènes apportés essentiellement par l'alimentation (**Comhair et Erzerum,2002**).

Pour empêcher la détérioration des aliments, l'industrie alimentaire fait appel aux antioxydants synthétiques comme le butyl- hydroxyanisole (BHA) et le butylhydroxytoluène

(BHT), retrouvés aussi dans les cosmétiques, ils sont suspectés de provoquer des réactions allergiques cutanées, d'être un potentiel cancérigène voir de rentrer en compétition avec certaines fonctions hormonales (**Desmier, 2016**). Leurs effets négatifs sur la santé humaine ont mené les chercheurs à opter pour l'utilisation d'antioxydants naturels comme les extraits de plantes mais qui représentent une contrainte pour la matière première. Divers travaux ont été menés pour déterminer la composition chimique du lait camelin, qui est similaire à celle du lait bovin, par ailleurs d'autres composés tels que les antioxydants n'ont fait l'objet que de tentatives peu nombreuses. Dans ce contexte nous nous sommes proposé de déterminer les paramètres physico-chimiques du lait camelin collecté localement, ainsi que d'analyser *in vitro* quelques propriétés biologiques des composés bioactifs.

Le présent travail porte sur deux parties essentielles. La première théorique est consacrée à :

- Une étude bibliographique sur le dromadaire, la composition du lait de chamelle, et les peptides bioactifs.

La seconde pratique, dont le but est de :

- Déterminer la composition du lait collecté d'une des régions centre d'Algérie : la wilaya de Laghouat.
- Isoler la caséine qui est la protéine majeure de lait et obtention de fractions actives par hydrolyse.
- Evaluer l'activité antioxydante de la caséine et de ses hydrolysats, ainsi que leurs activités : antibactérienne, antifongique, antivirale et antilithiasique.

Étude bibliographique

Chapitre I

Le dromadaire

I.1. Classification

Le dromadaire ou chameau à une bosse (*Camelus dromedarius*) et le chameau bactrien ou chameau à deux bosses (*Camelus bactrianus*) constituent les deux espèces du genre *Camelus* de la famille des camélidés qui comporte un autre genre le Lama. Les camélidés appartiennent au sous ordre des ruminants et à la classe des mammifères vertébrés placentaires (**Mukassa - Mugerwa, 1985**).

I.2. Origine du dromadaire

L'origine de l'espèce cameline remonte au « *Protylopus* », un animal de la taille du lièvre, durant la période glaciaire, appelée transition Pliocène-Pleistocène, il y a 50 millions d'années environ, le genre *Camelus* migra de l'Amérique du nord, à travers le détroit de Béring, vers l'Asie, l'Est de l'Europe et l'Afrique (**Colbert, 1935 ; cité par Kohler-rollefson, 1991**).

La seule espèce présente aujourd'hui en Afrique est le genre *C.dromedarius* qui a migré vers les régions chaudes et arides d'Afrique du Nord et du Proche-Orient, pour se muer en animal à une bosse, aux pattes et au cou allongé, produit final d'une adaptation complète au milieu hostile (**Yagil, 1985 ; cité par Bourdanne, 1998**) a été introduite plus tard en Australie, aux îles Canaries, en Amérique du Nord, en Italie et dans le sud de l'Espagne (**Bourdanne, 1998**). (**Fig.1**).



Figure 1: Distribution et points d'introduction du chameau domestique (**Wilson ,1998**)

I.3. Répartition

Dans le monde

La population totale des chameaux dans le monde est estimée à environ 35 millions de têtes (**Devaux *et al.*, 2020**). Les dromadaires qui vivent dans les régions arides du nord et du nord-est de l'Afrique représentent 80% de cette population, dont 60% sont principalement implantés en Somalie, Ethiopie, Soudan, Djibouti, et le Kenya. La Somalie, détient à elle seule 7 millions de têtes (**Faye, 2014**).

En Algérie

L'effectif camelin est estimé à 381.882 têtes en 2017 (**Gherrissi *et al.*, 2020**), il est réparti sur 17 wilayas :

-92% du cheptel dans huit wilayas sahariennes : Ouargla, Ghardaïa, El-Oued, Tamanrasset, Illizi, Adrar, Tindouf et Bechar.

-8% du cheptel dans neuf wilayas steppiques : Biskra, Tebessa, Khenchela, Batna, Djelfa, El-Bayad, Naâma, Laghouat et M'sila.

Géographiquement, on distingue trois aires de distribution dont la population cameline y est répertoriée :

- La première aire de distribution, est le Sud-Est subdivisée en deux :

a- Zone centre : Ouargla, Ghardaïa, Laghouat et Djelfa.

b -Zone Sud- Est proprement dite: El-oued, Biskra, M'sila, Tébessa, Batna-Khenchela.

- La deuxième aire, est le Sud-Ouest représentée par : Bechar, Tindouf, Naama, El-Bayadh, et le nord d'Adrar.

- L'extrême sud, représente la troisième aire de distribution : Tamanrasset, Illizi, le sud d'Adrar (**Ben -Aissa, 1989**) (**Fig. 2**).



Figure 2 : Aires de distribution du dromadaire en Algérie (Ben- Aissa, 1989)

I.4. Morphologie

Le dromadaire est caractérisé par la longueur des membres et du cou et la forme cylindro conique de l'abdomen (Ramet, 1993). Le male mesure entre 1.8 et 2 m au garrot, la bosse fait 20 cm de plus, son poids est entre 200 et 400 kg, les femelles font 10 cm en hauteur et 10 % en poids de moins que les males. L'animal a de petites oreilles, les yeux larges et saillants les narines longues, sa lèvre supérieure est devisée, poilue et sensitive tandis que la lèvre inférieure est pendante, la peau est recouverte de poils courts allant du plus foncé au blanchâtre (Wilson ,1984). Il peut perdre jusqu'à 30 % de son poids en eau.

I.5. Alimentation

La ration journalière de l'animal est de 8 kg de matière sèche (Peyre- De- Fabregues, 1989), il se nourrit des plantes herbacées, d'arbuste, de pousse d'arbres et même de cactées et noyaux de datte (Ramet, 1993). Le dromadaire préfère ingérer les épineux, les halophytes. Il consomme arbres et arbustes (40% de son alimentation), arbustes nains (45%) et les plantes herbacées (5-10%). (FAO, 1989). L'Acacia est un exemple des plantes épineuse et parmi les espèces pastorales les plus appréciées par le dromadaire (Matharu, 1966 ; cité par Mukassa - Mugerwa, 1985).

I.6. Système d'élevage

La classification des systèmes de production animale se fait généralement selon la quantité de consommation des intrants et par le matériel génétique utilisé : systèmes extensif et moderne, divisé en intensif et semi-intensif. Le terme "pastoralisme" fait référence aux modes de conduite des troupeaux en dépendance des ressources herbagères naturelles qui correspond à une exploitation extensive des pâturages naturels entraînant des déplacements d'ampleur variable.

I.6.1. Système extensif:

Selon les disponibilités en eau et les ressources pastorales, Il y a deux types de mobilité du bétail tel que le nomadisme et la transhumance.

I.6.1.1. Transhumance

C'est le déplacement saisonnier des troupeaux pour l'exploitation de ressources fourragères et hydrauliques temporaires dans un espace agraire dont les éleveurs ont la maîtrise technique.

Les troupeaux sont conduits parfois par des bergers familiaux mais ils sont souvent confiés à des bergers salariés (LARES, 2015).

I.6.1.2. Nomadisme

Le nomadisme est défini comme un ensemble de déplacements irréguliers anarchiques entrepris par un groupe de pasteurs d'effectifs variables dans des directions imprévisibles.

Dans ce mouvement migratoire, les familles et les campements suivent le troupeau qui se déplace acycliquement dans les territoires très vastes (Ague, 1998).

I.6.1.3. Elevage sédentaire

C'est un processus d'évolution et d'adaptation des populations nomades qui réduisent l'amplitude de leurs déplacements et incluent des pratiques agricoles dans leurs activités.

Les ressources sont situées à proximité de l'habitat fixe, les troupeaux se déplacent, souvent sur de longues distances, mais ils reviennent chaque soir au village.

I.6.2. Système moderne

Le système moderne a pour objectif de satisfaire la forte demande et hausse de consommation suite à la croissance de la population.

I.6.2.1. Elevage semi intensif :

Ce type d'élevage est caractérisé par une utilisation modérée d'intrants. En saison sèche, après avoir reçu une ration le matin, le troupeau qui ne contient que des femelles laitières part à la recherche de pâturages à quelques kilomètres à la ronde. Il reçoit l'après-midi de l'eau et une complémentation alimentaire composée de tourteau d'arachide, de riz, de blé etc... (Ould

-**Soule, 2003 ; Correa, 2006**). Pendant l'hivernage, l'alimentation est quasi-exclusivement basée sur les pâturages naturels.

I.6.2.2.Elevage intensif

Ce système utilise le matériel génétique introduit, l'achat d'aliments, l'utilisation courante des produits vétérinaires et le recours à la main d'œuvre salariée (**Feliachi, 2003**). L'alimentation est composée de foin, de paille et de concentré comme complément (**Adamou et al., 2005**).

I.7. Races du dromadaire en Algérie

Les Races de bat de trait et de selle qui se trouvent en Algérie sont :

-**Le Chaambi:** animal médialigne, musclé, il se caractérise par diverses variantes de taille et de pelage. C'est une race fortement croisée avec du sang de dromadaire arabe, très bon pour le transport, moyen pour la selle. Sa répartition va du grand Erg Occidental au grand Erg Oriental. On le retrouve aussi dans le Metlili des Chaambas.

-**L'Ouled Sidi Cheikh:** c'est un animal de selle. Solide, à pelage foncé mi-long, également fortement croisé avec du sang arabe. C'est un animal bien adapté aussi bien à la pierre qu'au sable. On le trouve dans les hauts plateaux du grand Erg Occidental.

-**Le Sahraoui:** il est issu du croisement Chaambi et Ouled Sidi Cheikh. C'est un excellent méhari, robuste, à pelage foncé, mi-long. Son territoire va du grand Erg Occidental au Centre du Sahara.

-**L'Ait Khebbach :** de taille moyenne, robe foncée et à poil ras, c'est un animal de bât. On le trouve dans l'aire Sud-Ouest.

-**Le Chameau de la Steppe:** c'est un dromadaire commun, petit, bréviligne. C'est un mauvais porteur, il est utilisé pour le nomadisme rapproché. On le trouve aux limites sud de la steppe.

-**Le Targui ou race des Touaregs du Nord :** c'est un animal fin avec ses membres très musclés. La bosse est petite et rejetée en arrière. La queue est également petite et les plantes des pieds sont fines. C'est un excellent méhari pour les patrouilles aux frontières. Il a une robe claire ou pie, des poils ras et une peau très fine. Excellent méhari, animal de selle par excellence souvent recherché au Sahara comme reproducteur. Réparti dans le Hoggar et le Sahara Central.

-**L'Aier:** bon marcheur et porteur. Se trouve dans le Tassili d'Ajjer.

-**Le Reguibi:** très bon méhari. Il est réparti dans le Sahara Occidental, le Sud Orannais (Béchar, Tindouf). Son berceau: Oum -El -Asse (Reguibet).

-Le Chameau de l'Aftouh : utilisé comme animal de trait et de bât. On le trouve aussi dans la région des Reguibet. (Tindouf, Bechar) (Ben-Aissa, 1989) (Fig. 3).

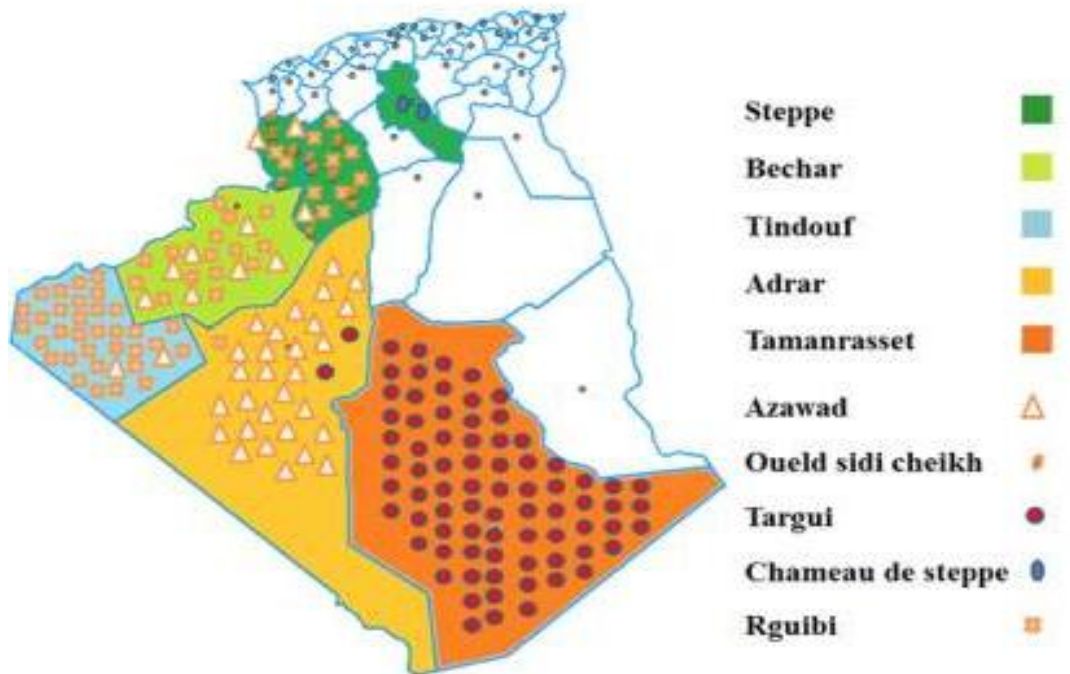


Figure 3 : Distribution géographique de dromadaire en Algérie (Cherifi *et al.*, 2017)

Chapitre II

Le lait camelin

II.1. Définition

Le lait camelin est un aliment complet, il contient plusieurs vitamines, minéraux et d'autres composés bioactifs, toutefois il possède une capacité particulière à se conserver quelques jours à différentes températures sans altération de sa qualité hygiénique et organoleptique (Kaskous, 2019).

II.2. Production de lait de chamelle

La proportion de femelles allaitantes est de l'ordre de 18 pour cent de 20 millions de têtes de population cameline (Hjort- af- Ornäs, 1988). La production mondiale de lait est estimée à 5.4 millions de tonnes dont 24 % environ sont prélevés, pour la consommation humaine (Anonyme- 1, 2006). La production du lait camelin en Algérie est de 8100 tonnes par an (FAO, 2006), avec une moyenne de production journalière est de 3kg/j pour une durée de lactation de 9 à 16 mois (Farah, 2011), ces valeurs peuvent varier selon : la nutrition, stade de lactation, fréquence et rang de traite, conditions climatiques, de mise bas, la race et le statut sanitaire (Siboukeur, 2007).

II.3. Caractéristiques du lait de chamelle

Le lait de chamelle est de couleur blanche mate, goût un peu salé et d'un aspect plus visqueux que le lait de vache, qui est de couleur jaunâtre. Ces caractéristiques et surtout le goût du lait de chamelle diffèrent selon l'alimentation des animaux et la disponibilité en eau (Farah, 1993). L'ingestion de fourrages comme la luzerne, donne un goût sucré, certaines plantes halophytes le rendent salé (Farah et Bachmann, 1987).

II.3.1 Paramètres physiques

II.3.1.1. Densité : La densité moyenne de lait de chamelle est de 1.029 alors que celle du lait bovin est de 1.032, celle-ci est proportionnelle à la concentration des éléments dissouts et inversement proportionnelle à la teneur en graisse (Farah et Bachmann, 1987).

II.3.1.2. Acidité Dornic

L'acidité Dornic est de 14.83 pour la région saharienne et 15.12 pour les régions steppiques (Alloui-Lombarkia *et al.*, 2007), cependant elle peut atteindre la valeur de 22.

II.3.1.3. Le pH

Le lait de dromadaire est légèrement acide, avec un pH variant entre 6.57 et 6.97 (Khaskheli *et al.*, 2005).

II.3.2. Composition chimique

II.3.2.1. Teneur en eau

La teneur en eau du lait camelin varie entre 86 et 88%, contrairement aux autres animaux elle atteint son maximum pendant la période de déshydratation (**Kula, 2016**). En effet, il a été montré que la restriction en eau alimentaire des chamelles se traduit par une dilution du lait et s'élève à 91% (**FAO, 2013**). Cette dilution pourrait être l'effet d'un mécanisme d'adaptation naturelle pourvoyant en eau les chamelons durant la période de sécheresse (**Yagil et Etzion, 1980 ; Faye et Mulato, 1991**).

II.3.2.2. Matière grasse

La teneur en matière grasse du lait de chamelle est comprise entre 1.2 et 6.4% ou des teneurs plus élevées d'acides gras à longues chaînes (C14 à C22) ont été signalés avec un taux de 96% alors que le lait de vache n'en contient que 85 % (**Al- Haj et Al- Kanhal, 2010**).

II.3.2.3. Le lactose

La teneur en lactose reste presque inchangée au cours des périodes et sous conditionnée de régime hydraté ou déshydraté variant entre 3.3 et 5.8% (**Konuspayeva et al., 2009**). Cependant une légère variation est observée en fonction de la végétation dans quelques régions désertiques (**Abbas et al., 2013**).

II.3.2.4. Les vitamines

Le lait de chamelle contient diverses vitamines, telles que les vitamines : C, A, E, D et celles du groupe B (**Farah et al., 1992; Haddadin et al., 2008**). Le lait de chamelle est connu pour sa teneur en vitamine C qui est trois fois plus élevée que dans le lait bovin avec une valeur de 37.4 mg/L (**Farah et al., 1992**). Il a été rapporté que la vitamine B3 serait 5 à 8 fois plus élevée dans le lait camelin que dans le lait bovin avec une teneur de 4.600 mg/kg, et une teneur en tocophérols (vitamine E) de 0.530 mg/kg (**Kappeler et al., 1998**) alors que celle du lait bovin est entre 0.1 à 0.200 mg/kg (**Farah et al., 1993**).

II.3.2.5. La fraction azotée

La fraction azotée représente 48.5g/L (**Mehaia et Al -Kanhal, 1992**), elle se divise en deux parties : une fraction en azote non protéique représentant 5 à 10% et une fraction d'azote protéique répartie en : lactosérum à 25% et des caséines à 75% (**Siboukeur, 2007**).

II.3.2.5.1. Fraction d'azote non protéique

Cette fraction est riche en urée, acides aminés libres comme l'acide glutamique, la glutamine, l'alanine, la phénylalanine, créatine, nucléotides, des précurseurs de vitamines, de l'acide

urique, de la taurine (Siboukeur, 2007 ; Boudjenah, 2012), de la créatinine, de l'acide hippurique et de l'ammoniac (Faye *et al.*, 2010).

II.3.2.5.2. Fraction d'azote protéique

-Le lactosérum

Le lactosérum constitue la fraction restant soluble après précipitation de protéine à pH acide, il représente 0.63 à 0.8% des protéines totales du lait camelin (Khaskheli *et al.*, 2005).

Les majeures protéines du lactosérum camelin sont :

La β -lactoglobuline

Cette protéine représente 50% des protéines du lactosérum bovin mais semble absente ou existe seulement sous forme de traces dans le lait camelin (El -Agamy, 2000). Des études ont confirmé son absence aussi dans le lait humain (Sindayikengera et Xia, 2005; Chatterton *et al.*, 2006). Cette protéine globulaire est constituée d'une seule chaîne de 162 acides aminés qui interagit avec des petites molécules hydrophobes, ce qui lui confère la fonction potentielle de transporteur moléculaire (Jameson *et al.*, 2002).

L' α -lactalbumine

C'est une métalloprotéine qui fixe le calcium, elle constitue 20% des protéines bovines sériques, tandis qu'elle est la protéine majoritaire du lactosérum camelin avec 2.2 g/L, le lait humain en contient 2.45 g/L (Salami *et al.*, 2008). Cette protéine joue également un rôle biologique au niveau de la synthèse du lactose (De -Wit, 1989). Les activités biologiques attribuées à cette protéine et ses peptides sont : inhibition de l'enzyme de conversion d'angiotensine (ECA), activité anti-cancérogène, activité antimicrobienne, activité opioïde, activité antistress, amélioration des capacités cognitives et amélioration du sommeil (Chatterton *et al.*, 2006).

L'albumine de sérum bovin (BSA)

La BSA est une protéine formée d'une seule chaîne polypeptidique de 580 acides aminés stabilisée par 17 ponts disulfures. Elle est riche en groupes glutamylcystéine dans sa séquence, et représente 7% des protéines du lactosérum bovin (Zimecki et Kruzal, 2007). Sa concentration moyenne est de 8.5mg /L dans le lait camelin (El -Hatmi *et al.*, 2006). Elle joue un rôle de transporteur d'ions et métaux (Jouan, 2002). La BSA possède aussi des propriétés antioxydantes et immunostimulantes et joue un rôle important dans le système de synthèse et d'activation du glutathion (Bounous, 2000).

La lactoferrine (Lf)

Constituée d'une chaîne comprenant 689 résidus aminoacides, sa concentration dans le lait camelin est de 220 mg/L (**Kappeler *et al.*, 1999**) contre 0.1g/L dans le lait bovin (**Zimecki et Kruzal, 2007**). Fixant le fer, cette protéine a des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, anti-cancérigènes, immunorégulatrices et anti-inflammatoires. Elle possède également des propriétés antivirales (VHC, human cytomegalovirus, papilloma virus) (**Sun et Jansen, 2012**).

Les immunoglobulines (Ig s)

Appelés aussi les protéines anticorps, les immunoglobulines sont des glycoprotéines qui représentent 75 à 80 % des anticorps circulants, leur proportion dans le lactosérum est de 10%. Ils sont divisés en 5 classes, on retrouve dans le lait bovin 4 nommées : les Ig G, Ig A, Ig M et les Ig E, avec une prédominance des Ig G dans le colostrum camelin, en particulier les sous classes Ig G2 + Ig G3, qui atteignent, à 1h postpartum une concentration 100.6 mg/mL (**El-Hatmi *et al.*, 2006**). Les Ig G possèdent une activité antivirale élevée notamment contre les rotavirus (**El-Agamy *et al.*, 1992**). Le lactosérum camelin contient d'autres éléments comme la lactoperoxydase, enzyme d'oxydo-réduction (**Tayefi-Nasrabadi *et al.*, 2011**), mais aussi des lysozymes qui possèdent une activité antibactérienne et des peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) connues pour leur activité anticancéreuse, du sein notamment (**Gul *et al.*, 2015**).

-Les caséines

Constituée de quatre fractions : $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, et κ , les caséines sont les principales protéines dans le lait de chamelle, représentant environ 52 à 87 % des protéines totales (**Al-Haj et Al-Kanhal, 2010**). La caséine β cameline est la principale fraction caséinique (65%) suivie de la caséine $\alpha 1$ (22%), contrairement au lait bovin où ces deux fractions sont presque similaires (37 et 30 % respectivement). La caséine κ représente seulement 3.47% de la caséine cameline totale (**Kappeler *et al.*, 2003**) contre 13% dans le lait bovin (**Al-Haj et Al-Kanhal, 2010**).

Les caséines sont structurés en sphères volumineuses appelées micelles, la surface granuleuse est due à la présence de submicelle (**Fig. 4**). Les micelles ont un diamètre compris entre 160 et 300 nm (**Farah et Rüegg, 1989**) leur constitution est de 90 % de caséines, plus précisément la β caséine et la $\alpha 1$ qui forment un cœur hydrophobe au centre, les caséines $\alpha 2$ et κ plus hydrophiles, à la surface s'y ajoutent les phosphates de calcium qui forment un gel flexible attachant les unités de caséine (**Fig. 5**). Les principales unités de la caséine sont :

La caséine- $\alpha 1$

La caséine $\alpha 1$ du lait bovin est une protéine constituée de 199 acides aminés, sans résidus de cystéine avec un poids moléculaire de 23 kDa, son point isoélectrique est de 4.7. Les sept résidus phosphorylés sont regroupés dans la région 43-80 (Cayot *et al.*, 1998). La caséine $\alpha 1$ de lait camelin est constituée de 215 acides aminées avec un pI de 4.4 et représente une similitude de 39% avec celle du lait de vache avec un poids moléculaire de 25.77 kDa (Kappeler *et al.*, 1998).

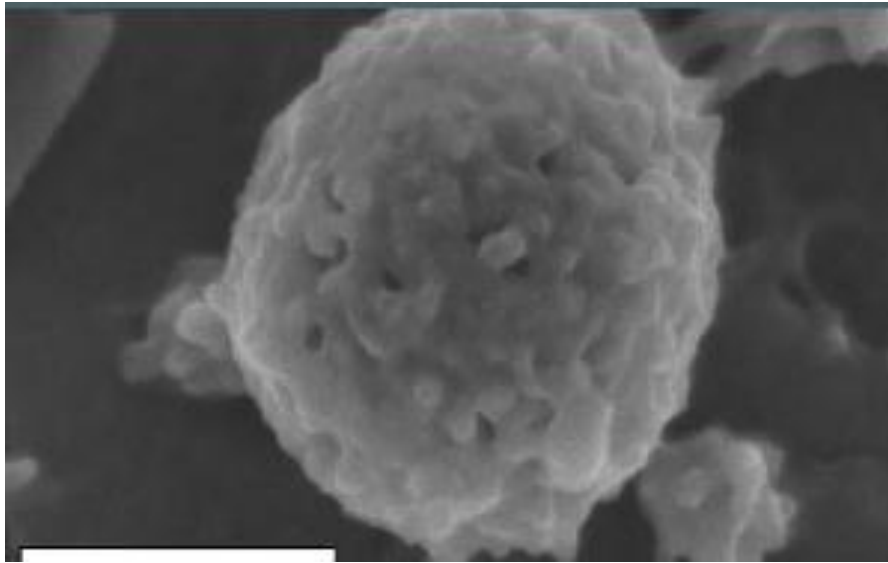


Figure 4 : Micrographie électronique d'une micelle des caséines bovines réalisée par microscope électronique à balayage à émission de champ. Barre d'échelle = 200 nm (Dagleish *et al.*, 2004)

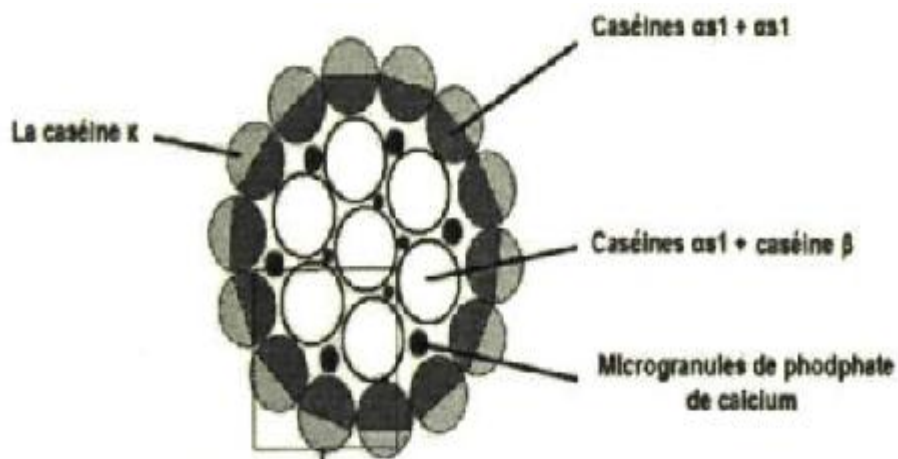


Figure 5 : Modèle de structure de la micelle de caséine développé par Holt, (1992)

La caséine - α 2, α 3, α 4, α 6

La différence entre ces caséines réside dans le nombre de résidus phosphorylés, ils sont constitués de 207 acides aminés, et une masse moléculaire de 25 kDa, avec un point isoélectrique de 4.58 dans le lait bovin. Le lait camelin contient 2.6g/L de caséine - α 2, son poids moléculaire est de 21.26 kDa, elle représente une similitude de 56% avec celle du lait de vache.

La caséine - β

La caséine β bovine est une protéine de 24 kDa, constituée de 209 acides aminés, son point isoélectrique est de 4.76, celle du lait camelin en contient 217 acides aminés et a une similitude de 64% (Kappeler *et al.*, 1998).

La caseine - κ

C'est une protéine de 169 acides aminés, et de poids moléculaire de 18.97 kDa, glycosylée sur les résidus méthionine 131, 133,135 et 138, dans le lait bovin, elle joue un rôle primordiale dans la coagulation (Jolles *et al.*, 1962 ; Mercier *et al.* 1973). Tandis que la caséine κ cameline a un poids moléculaire de 22 ,29 kDa et représente une similitude de 56% avec celle du lait de vache (Kappeler *et al.*, 1998).

II.3.2.6. Teneur en minéraux

Le lait camelin est une source riche en minéraux notamment Na, K, Ca, P, Mg, Fe, Zn, Cu. avec une teneur variant entre 0.6 à 1% (Konuspayeva *et al.*, 2009), les valeurs moyennes sont 59 mg pour le sodium, 156 mg pour le potassium, 114 mg pour le calcium, 10.5mg pour le magnésium, 0.29 mg pour le fer, 0.53mg pour le zinc, et 0.05mg/100g pour le manganèse (Abbas *et al.*, 2013).

II.4. Caractéristiques thérapeutiques du lait de chamelle

Consommé cru, le lait camelin est prescrit comme remède dans de nombreuses maladies humaines. Il est utile dans les troubles gastriques et intestinaux, diabète type 1, et allergie alimentaire. En outre, le lait de chamelle a été utilisé pour réduire le taux de cholestérol dans le sang, pour éviter la maladie du psoriasis, guérir l'inflammation dans le corps, pour aider les patients atteints de tuberculose, en contribuant à renforcer le système immunitaire humain, réduire la croissance de cellules cancéreuses et guérir l'autisme (Kaskous, 2016).

II.4 .1. Propriétés antimicrobiennes

II.4.1.1.Activité antibactérienne

Le lait de chamelle inhibe à la fois les bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif, y compris *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. (El- Agamy, 1992 ; Kumar *et al.* ,2016 a ; b). La lactoferrine cameline est un agent bactériostatique et bactéricide, qui en se liant au fer, inhibe la croissance de *Salmonella typhimurium* (El – Agamy *et al.*, 1992 ; Ochoa et Cleary, 2009).

II.4.1.2. Activité antivirale

L'activité antiviral de la lactoferrine est bien connue, cette protéine isolée par El -Rashdi et Tball, (2007) du lait camelin a montré son efficacité contre le virus de l'hépatite C, une autre étude menée par Yagil, (2013) attribuerait cette activité notamment contre les rotavirus aux anticorps qui protègeraient les enfants de moins de 5 ans des diarrhées aiguës.

II.4.2.Prévention de la maladie du diabète

Le lait de chamelle contient des concentrations plus élevées d'insuline et de ces analogues (IGF-1) par rapport au lait de vache (Hamad *et al.*, 2011; Mullaicharam, 2014). L'effet des immunoglobulines de petite taille sur les cellules β , et l'absence de la coagulation dans l'estomac contribuerait à l'action hypoglycémiant chez les malades atteints de diabètes type1 (Agrawal *et al.*, 2007).

II.4.3. Effet anti cholestérol

Le mécanisme de l'hypocholestérolémie du lait camelin n'est toujours pas clair, mais différentes hypothèses ont été proposées, comprenant: l'interaction entre les peptides bioactifs dérivés de protéines de lait de chamelle et de cholestérol, qui entraîneraient une réduction de celui-ci (Li, 1998) et la présence de l'acide orotique dans le lait de chamelle qui serait responsable d'abaissement du taux de cholestérol chez les sujets traités par supplément de peptides camelins (Buonopane *et al.* , 1992) et chez les rats (Rao,1981).

II.4.4. Activité anti cancéreuse

Selon une étude de Korashy *et al.*, (2012) , le lait de chamelle aurait inhibé de manière significative la prolifération des cellules HepG2 (hépatome humain) et MCF7 (sein humain) Par l'induction des récepteurs et les mécanismes à médiation par le stress oxydatif. Le potentiel de la lactoferrine de lait de chamelle réside dans la capacité d'inhiber la prolifération de la lignée cellulaire du cancer du côlon, HCT-116 *in vitro* et les dommages à l'ADN (Habib *et al.*, 2013).

II.4.5. Traitement de la tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse causée par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de fièvre, toux et expectorations. **Mal et al.,(2006)** ont traité des malades par un supplément de lait camelin et ont révélé une augmentation de concentration de zinc de 20.38 à 44.97% chez les patients traités, alors que la concentration de fer, elle passe de 14.92 à 20.92% contre 6.94–10.79% et 6.98–9.29% chez les patients non traités respectivement, avec diminution de fièvre, essoufflement, toux et gain de poids après traitement.

II.4.6. Traitement de la maladie de Crohn

La maladie de Crohn est une maladie qui provoque une inflammation du système digestif.

Il a été prouvé que l'infection par les *Mycobacterium avium* SPP: paratuberculose (MAP) conduit à une réponse auto-immune secondaire, ouvrant la voie pour la maladie de Crohn, cependant le lait de chamelle a été identifié comme efficace dans la récupération des maladies auto-immunes en raison de ces propriétés bactéricides combinées avec les PGRPs (**Alluwaimi, 2007**).

II.4.7. Effet anti allergique

Le lait de chamelle est une excellente alternative au lait de vache, car il est mieux digéré par l'organisme humain, due à l'absence de la β -lactoglobuline : un allergène puissant impliqué dans 82 % des cas d'allergies au lait chez les jeunes enfants (**Makinen-Kijunen et Palosne, 1992**).

Chapitre III

Les peptides bioactifs

III.1. Définition

Les protéines ne sont pas seulement une source d'apport d'azote et d'acides aminés essentiels à l'organisme, ils libèrent aussi des peptides bioactifs issus de dégradation enzymatique. Les peptides bioactifs sont des séquences protéiques de deux à vingt acides aminés, inactives au sein des molécules précurseurs (Mohanty *et al.*, 2016). Ces fragments sont bénéfiques pour divers systèmes physiologiques de l'organisme, tels que les systèmes cardiovasculaire, digestif, immunitaire et nerveux, influençant ainsi positivement la santé. Leurs effets peuvent être classés comme antimicrobiens, anti-oxydatifs, anti-thrombotiques, antihypertenseurs, et immunomodulateurs (Korhonen et Pihlanto, 2003) (Fig. 6). De plus, les peptides bioactifs jouent un rôle dans le métabolisme et la synthèse des protéines et ont donc un effet sur le système musculo-squelettique (Willoughby, 2013).

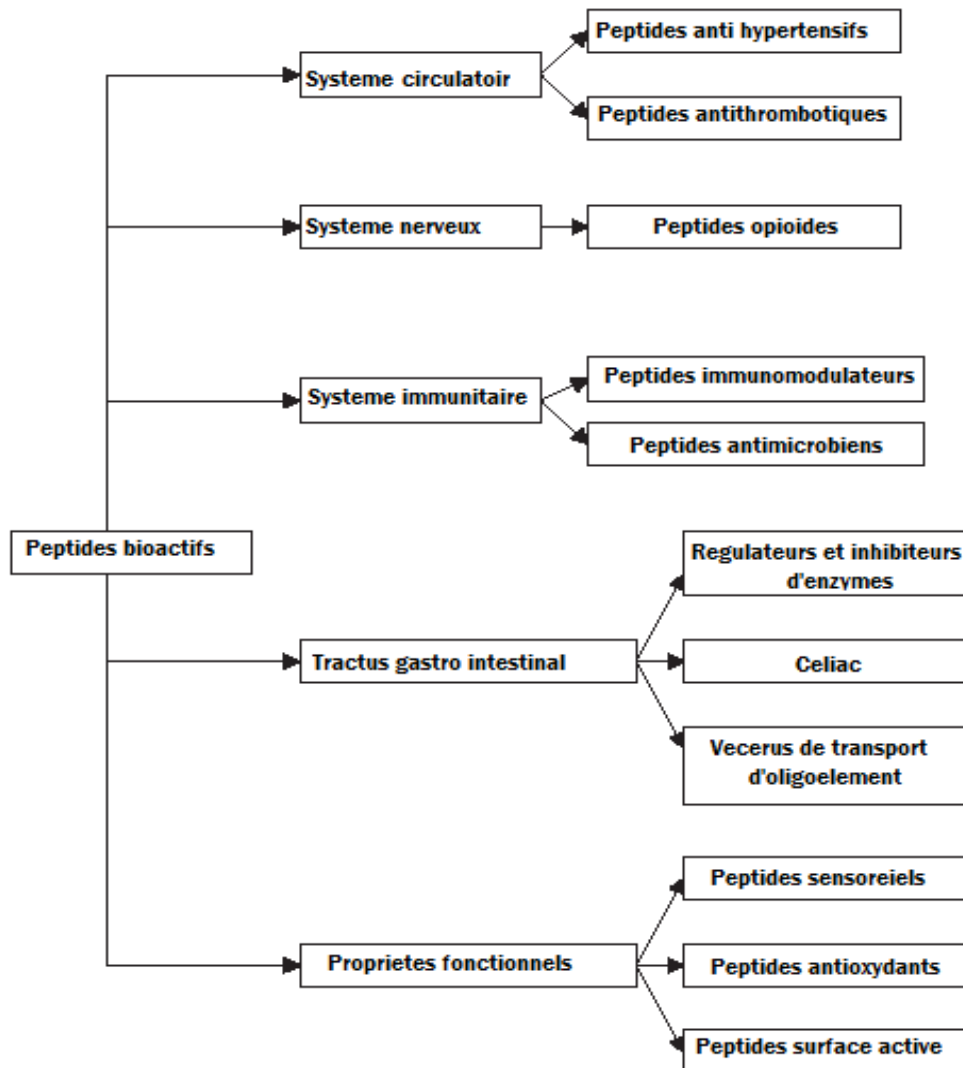


Figure 6 : Diverses fonctions des peptides bioactifs issus des protéines du lait (Dziuba, 2014)

III.1.1. Les peptides opiacés

Ils font référence à l'endorphine, d'où leur appellation les exorphines comme les β -casomorphines qui correspondent aux séquences 60-66 de la caséine β bovine et 51-57 pour la caséine β humaine et sa séquence homologue existant aussi chez le lait de chamelle, son activité est similaire à la morphine et exerce son action sur la motricité, échanges intestinaux, effets analgésiques, modulation de diverses hormones.

III.1.2. Les peptides anti-thrombotiques

Ces peptides correspondent à l'extrémité C-terminale 106-169 de la caséine κ , ils sont capables d'inhiber l'agrégation plaquettaire et de se lier sur des récepteurs spécifiques situés à la surface des plaquettes comme le caséino-glycomacropéptide dont les séquences de type Arg-Gly-Asp-X permettent de retrouver les similitudes avec la lactoferrine humaine (séquence 39-42).

III.1.3. Les peptides vecteurs de transport d'oligoéléments

Ces vecteurs séquestrent les minéraux, comme les phosphopeptides qui jouent un rôle fonctionnel en limitant la précipitation de phosphate de calcium, insoluble à son site d'absorption intestinal (duodénum). Il s'agit des caséines α_1 (recouvrant la séquence 43-79) et β (recouvrant la séquence 1-25). Ces phosphopeptides ont même des propriétés anticariogéniques (Leonil, 2000).

III.1.4. Les peptides anti-hypertensifs

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) qui intervient dans la régulation physiologique de la tension artérielle, appartient à la classe de protéases catalysées par le zinc et le chlore générant l'angiotensine vasoconstrictrice, libérant ainsi l'aldostérone qui augmente la concentration en sodium et la pression sanguine. La structure des peptides anti-hypertensifs a été identifiée suite à une digestion gastro-intestinale *in vitro* d'un précurseur comme la caséine (Karaki *et al.*, 1990; Yamamoto *et al.*, 1994). Ces inhibiteurs entrent en compétition avec le substrat car ils contiennent des résidus hydrophobes comme la proline, phénylalanine et la tyrosine à trois positions du C terminal. (Cheung *et al.*, 1980). Contreras *et al.*, (2011) ont utilisé la pepsine pour hydrolyser la caséine, en trois séquences peptidiques dérivés de la α_1 -caséine et α_2 -caséine et les ont caractérisés comme inhibiteurs de l'ECA antihypertensifs.

III.1.5. Les Peptides immunomodulants

Ces peptides sont capables de stimuler la prolifération des lymphocytes, la phagocytose des macrophages et la production de cytokines comme les peptides issus de La β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, et la lactoferrine qui peuvent moduler plus ou moins fortement la réponse immune spécifique (Jacquot, 2007). Huang *et al.*, (2010) ont démontré que l'hydrolyse du lactosérum par différentes enzymes (pepsine, alcalase, neutrase), pouvait stimuler ou inhiber la sécrétion de certaines cytokines, notamment l'IL-12 et/ou le TNF- α chez les splénocytes murins ou des macrophages. Deux peptides présents dans la séquence primaire de l' α -Lactalbumine (f 50-51 et f 18-20) ont été identifiés comme possédant un potentiel immunostimulant sur la prolifération de lymphocytes sanguins humains (Kayser et Miesel, 1996).

III.1.6 .Les peptides antioxydants

Ces peptides constitués essentiellement d'acides aminés hydrophobes, comme Pro, Tyr, Trp empêchent la peroxydation des acides gras essentiels. Les hydrolysats de caséine de chèvre présentent une puissante activité de piégeage des anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (Ahmed *et al.*, 2015). Les caséinophosphopeptides notamment les peptides riches en phosphosérines présentent un potentiel antioxydant plus élevé (Cervato *et al.*, 1999). Par contre les protéines du lactosérum sont moins douées d'activité antioxydante comparées aux caséines, cette activité est attribuée aux groupements thiols de la β -lactoglobuline (Clausen *et al.*, 2009).

III.2. Production des peptides bioactifs

En application industrielle, les aliments contenant des protéines précurseurs de peptides bioactifs sont produits soit par fermentation où l'on emploie les souches comme *Bacillus spp*, *Bifidobacterium* et même *Streptococcus thermophilus* 4F44 (247 peptides identifiés, dont 143 dérivés de la β -caséine) (Chang *et al.*, 2014 a). La synthèse chimique aussi est une alternative à produire des peptides bioactifs, une série de peptides contenant His notamment Pro-His-His a montré son efficacité à inhiber la peroxydation des lipides (Nguyen *et al.*, 2009). La troisième voie enzymatique par l'hydrolyse digestive avec l'implication de d'enzymes protéolytiques et enzymes d'origine microbiologique (Korhonen et Pihlanto, 2003). Les fonctionnalités requises des peptides bioactifs dépendent de la source des protéines, du prétraitement du substrat protéique, du type de protéases utilisées et des conditions d'hydrolyse appliquées. Les enzymes digestives et les combinaisons de diverses protéinases, y compris l'alcalase, la chymotrypsine, la pancréatine et la thermolysine.

La pepsine et la trypsine sont couramment utilisées pour produire des peptides inhibiteurs de l'ECA, à savoir : l' α -lactorphine (α -La f (50–53)), la β -lactorphine (β -Lg f (102–105)), la β -lactotensine (β -Lg f(146–149)) et albutensine A (BSA f (208–216) (**FitzGerald et Meisel.,1999**). Divers chercheurs ont élucidé les séquences des peptides dérivés de la caséine bovine et leurs fonctions (**Tab I**).

III.3. Les peptides bioactifs à l'échelle industrielle

Peu d'ingrédient contenant les peptides bioactifs sont commercialisés, on retrouve surtout les peptides dérivés de caséines incorporés dans les ingrédients pour récupération musculaire (PeptoPro de DSM Food Specialties, Pays- Bas) , des phosphopeptides pour absorption des minéraux (Capolac Arla Foods Ingredients, Suède) ou même des capsules contenant des fragments de α s1-caséine f (91–100) commercialisées sous le nom de PRODIET F200/Lactium, France, pour réduire le stress (**Korhonen et Pihlanto ,2003**). Pour faire face à des défis d'application technologique (cout élevé de production, faible solubilité, stabilité et réduction de temps de demi vie) (**Agyei et Danquah , 2011**),des processus combinant champ électrique et procédés membranaires sont utilisés exemple : la méthode de précipitation des phosphopeptides de la caséine, diafiltration et échange d'anions a pu générer un rendement de 20% (p / p) de produire 40 kg de phosphopeptides de caséine (**Ellegård et al., 1999**).

III.4. Les peptides bioactifs du lait camelin

Le premier peptide bioactif isolé de la caséine cameline identifié par **Shuangquan et al. (2008)**, est le fragment f (99- 107) de la caséine κ , de séquence AIPPKKNQD généré par *Lactobacillus helveticus* doué d'activité anti ECA, d'autre part, **Homayouni-Tabrizi et al. (2016)** ont pu isoler deux fragments nommés (KQ-15) et (NV-13); le fragment 170-184 correspondant à la séquence KVLVPVQQMVPYPRQ de la β -CN et le fragment 138-149 séquencé NEDNHPGALGEPV de la caséine α S1-, capables d'augmente l'expression du gène SOD1 et qui ont un rôle antioxydant. Des homologues de casecidin 15 et 17 issus de lait bovin (**Tab I**) à noter f(193-204) dont la séquence est PFQEPVPDPVRG, f(193-213) PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV, issus de la β caséine cameline ont été identifiés et ont inhibé la croissance bactérienne des souches *Staphylococcus aureus* CNRZ 3, *Listeria innocua* ATCC33090 et *Escherichia coli* ATCC25922 par **Almi-Sebbane et al.,(2018)**. Cependant le séquençage des peptides bioactifs issus du lactoserum camelin après l'hydrolyse n'a pas fait l'objet d'étude excepté pour des peptides antimicrobiens de poids moléculaire de 414.05 et 452.06 Da généré par la papaïne (**Abdel -Hamid et al., 2016**).

Tableau I : Quelques peptides présents sur la structure primaire des caséines bovines et leurs activités

Protéine précurseur	Fragment	Séquence peptidique	Nom	Fonction	Reference
Caséine α 1	23-27	FFVAP	α -casokinin-5	Inhibition d'ECA	Maruyama et al., 1987
	28-34	FPEVFGK	α -casokinin-7	Inhibition d'ECA	
	158-162	YVFPF	α 1-Casomorphin	Agoniste opioïdes	Vassou et al., 2008
Caséine α 2	189-197	AMKPWIQPK	-	Antihypertenseur	Yamamoto, et al., 1994
	94-103	QKALNEINQF	-	Inhibition d'ECA	Srinivas et Prakash., 2010
Caséine β	60-70	YFPFGPIP	B-casomorphin-11	Immuno--modulateur	Meisel., et Frister, (1989)
	177-183	AVPYPQR	β -casokinin-7	Inhibition d'ECA	
	193-207	YQEPVLGPVRGP FPII	Casecidin 15	Antimicrobien	Maruyama et al., 1985 Birkemo et al., 2009
	193-209	YQEPVLGPVRGP FPIIV	Casecidin 17		
Caséine κ	106-116	MAIPPCKKNQDK	Casoplatelin	Anti thrombotique	Jollés et Caen (1991)

III.5. Catalyse enzymatique par la pepsine

III.5.1. La pepsine et son zymogène

La pepsine est une endopeptidase de poids moléculaire de 35 000 Da, constituée d'une chaîne de 327 acides aminés (**Fig. 7**), et participant à la digestion des protéines alimentaires au niveau de l'estomac, elle se forme sous l'influence de l'acide chlorhydrique à partir d'un précurseur : zymogène ou pro-enzyme inactive, appelé pepsinogène qui est synthétisé au niveau de la muqueuse gastrique, et qui appartient à la classe des protéases aspartiques, de masse moléculaire de 42.000 Da (**Banga-Mboko et al., 2002**). Le pepsinogène est activé en pepsine par la perte de plusieurs acides aminés basiques (lysine, histidine, arginine), mis en action par la sécrétion d'HCl par la cellule pariétale. L'acétylcholine qui se fixe sur les récepteurs muscariniques de cette cellule est induit par le second messager IP3, une augmentation de calcium intracellulaire conduit ensuite à l'activation des protéines kinases et à la sécrétion d' H^+ (**Bocquet, 2006**). Le pH optimum d'action de la pepsine se situe entre 1.8 et 4.4.

III.5.2. Clivage

Le clivage de la pepsine se fait sur la position P1, P1' (**Fig. 8**) de préférence au niveau du C-terminal des acides aminés aromatiques : Tyr et Phe, ou bien hydrophobes tel que Leu, Ala, Gln et Glu. A $pH > 2$, le clivage se fait surtout au niveau de Phe, Leu et Tyr sur ces deux positions mais sera réduit à zéro par la présence de Pro, Lys et His en position P3, Arg en position P1', de même pour Pro en position P2 et P2' (mais favorable pour Pro en position P4 et P3). Le clivage est plus spécifique à $pH 1,3$. Il se fait surtout pour Phe et Leu en position P1 avec un clivage négligeable pour tous les autres acides aminés dans cette position (**Anonyme -2,2020**).

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Provenance du lait utilisé

Le lait de chamelle analysé provient de de la race Sahraoui, dans la région de Laghouat. Collecté au mois d'Avril, les échantillons sont embouteillés, transportés dans une glacière puis conservés au congélateur après mesure de pH et d'acidité à l'arrivée.

I.2. Analyses physico-chimiques

I.2.1. Le pH

La mesure du pH est faite par émergence de l'électrode du pH mètre préalablement calibré avec deux solutions tampon à pH différents, dans l'échantillon à 20 C°.

I.2.2. La densité

La mesure de densité s'effectue par introduction du lacto-densimètre dans une éprouvette contenant l'échantillon à analyser à 20 C°, lorsque celui-ci se stabilise, la lecture est effectuée directement.

I.2.3. Indice de réfraction

La déviation que subit une onde lorsqu'elle change de vitesse entre deux milieux est dite réfraction. La mesure de l'indice de réfraction, est faite par un refractomètre digital à une température de 20°C.

I.2.4. L'acidité titrée (acidité Dornic)

L'acidité Dornic est le nombre de millilitres d'une solution alcaline nécessaire pour neutraliser l'acidité de 100 mL de lait. Elle est déterminé par titrage en plaçant 10 mL de lait dans un bécher de 100 mL en présence de 0.1 mL de phénolphaléine comme indicateur coloré, remplir la burette de la solution de NaOH 0.1 N et titrer jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante (Norme Française 04-206 Janvier 1969).

I.3 .Analyses biochimiques

I.3.1 Matière sèche

On utilise l'étuve pour la dessiccation où 2 g de produit sont mis dans des capsules, introduits dans l'étuve à 102-103 C° pendant 15 heures, puis refroidis au dessiccateur et pesés. La matière sèche exprimée en pourcentage de masse est donnée par la formule :

$$\text{MS (\%)} = M_1/M_2 \times 100$$

M₁ : Masse du résidu après dessiccation

M₂ : Masse de la prise d'essai (g)

I.3.2. Teneur en eau

Elle est obtenue par déduction de la teneur en matière sèche de la prise d'essai.

I.3.3. Teneur en cendres

La matière sèche du lait est incinérée dans un four à mouffles à 530 C° pendant 4 h, puis pesée (AFNOR, 1980).

I.3.4. Teneur en matière grasse

La teneur en matière grasse est basée sur la méthode acido-butyrométrique (Norme ISO 488 : 1983) par dissolution des protéines du lait par l'acide sulfurique concentré, la matière grasse est séparée en présence de l'alcool isomylique, par centrifugation à 65-70°C dans un butyromètre de Gerber. On effectue directement la lecture de taux de matière grasse dans la branche graduée du butyromètre. (g/100 mL de lait).

I.3.5. Teneur en lactose

La méthode la plus utilisée est celle de Bertrand, après défécation de 20 mL de lait à l'hexacyanoferrate (II) de potassium et d'acétate de zinc, récupérer 10 mL de filtrat et rajouter 10 mL d'eau distillée, mélanger à une solution cuivrique puis à une solution tartro alcaline. Bouillir et refroidir, laisser le précipité se former. Après lavage avec 20 mL d'eau, l'oxyde cuivreux formé est dissout dans 20 mL d'une solution de sulfate ferrique. Le sulfate ferreux formé est dosé par manganimétrie (Norme NF V 04-213 de janvier 1971) (**Annexe 1**).

I.3.6. Matière azotée totale

La détermination de la teneur en matière azotée totale est basée sur la méthode de Kjeldahl (Norme ISO 8968 – 1 : 2001). En partant du principe que la protéine végétale ou animale contiendrait en moyenne 16% d'azote. L'azote organique est d'abord minéralisé par oxydation puis distillé pour former l'ammoniac qui sera piégé dans l'acide borique et enfin titré avec l'acide sulfurique.

Mode opératoire

Prendre 1 mL de l'échantillon dans un matras, ajouter 15 mL d'acide sulfurique, en présence d'un catalyseur et des pastilles en verre, les placer dans le bloc de minéralisation, chauffer à 350 C° pendant 4h. L'azote organique est réduit en azote minéral, après refroidissement des matras, les placer dans le distillateur, qui en présence de Na OH 40%, permet le dégagement de l'ammoniaque, noter la couleur bleu, la vapeur est condensée et récupérée à la sortie du réfrigérant dans 10 mL de l'acide borique pour former du borate d'ammonium puis titrer le distillat par pH-métrie avec de l'acide sulfurique 0.1 N.

La teneur en matière azotée est calculée selon la formule :

$$\text{MAT}\% = \frac{V \times 6.25 \times 0.14}{\text{PE}}$$

Où

MAT : Matière azotée totale

V : Volume de l'acide sulfurique versé (mL)

PE : Prise d'essai (g)

I.3.7. Teneur en protéines sériques et caséines

Le principe repose sur la combinaison d'une réaction au biuret et une réaction au réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, à base de phosphomolybdate et de phosphotungstate, réagit avec la tyrosine, le tryptophane et la cystéine, pour donner une coloration bleue foncée, qui s'ajoute à celle, résultant de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques (**Lowry et al ., 1951**).

Mode opératoire

Le dosage des protéines sériques est réalisé par écrémage du lait à 3500xg pendant 20 min suivi par précipitation des caséines à pH 4.3, le dosage du lactosérum s'effectue sur 1mL de surnageant dilué puis ajouter 5 mL de la solution C, après 10 min ajouter 0.5 mL de la solution (0.5 mL Folin et 7.5 mL eau distillée), laisser incuber 30 min à l'obscurité puis lire les absorbances à 750 nm. et en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec de la BSA (**Annexe 2, Fig.01**).

I.3.8. Dosage des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes est basé sur la méthode de **Jackson et al., 1998** avec modification

Mode opératoire

Le lait est saponifié par introduction de 4 mL d'échantillon dans un tube bouché à vis, on ajoute 3 mL de solution KOH (50/50 p/v) et 5 mL d'éthanol 95%. Homogénéiser pendant 10 minutes, chauffer dans un bain marie à 45°C pendant 45 min. transvaser dans une ampoule à décanter, puis ajouter 1.5 ml d'hexane. L'extraction est répétée deux fois, la phase organique lavée avec 2.5 mL d'acide acétique 5% puis vortexée pendant 30 secondes, la phase supérieure est évaporée dans un rotavapeur puis récupérée dans de l'éthanol. Cette phase est utilisée pour le dosage des caroténoïdes, par spectrophotométrie à 450 nm, en se référant à la courbe d'étalonnage utilisant le β -carotène (**Annexe 02, Fig.02**).

I.3.9. Dosage de la vitamine C

Pour le dosage de la vitamine C, on utilise le 2,6 di-chloro-phénol-indophénol (2,6-DIPh) qui oxyde l'acide ascorbique et colore en rose la solution en milieu acide (**Fig. 9**).

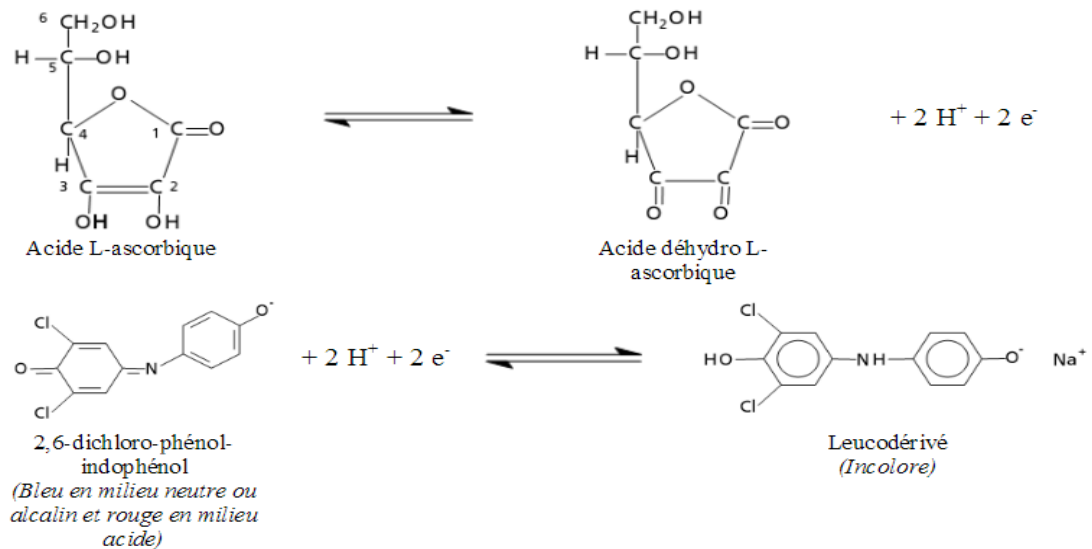


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'oxydation de la vitamine C par le 2,6 di-chloro-phénol-indophénol (2,6-DIPh) (Rao *et al.*, 1987).

Mode opératoire

La méthode utilisée est décrite par **Vladesco et Prahoveanu, (1939)** qui consiste à mélanger 50 mL de lait avec 4 mL de solution saturée de chlorure-de sodium. Le mélange est bien homogénéisé et filtré, après 30 minutes de repos à travers un papier filtre. Prendre 25 mL du filtrat dans un bécher en agitant continuellement, titrer avec une solution de 0.268g de 2-6 dichloro-phénol-indophenol et 0.1 g de carbonate de sodium dans de l'eau distillée qsp 1L, jusqu'à ce que le liquide arrive à une nuance rose qui persiste pendant 30 secondes.

La teneur en vitamine c est calculée selon l'équation

$$C_2 = \frac{C_1 \times V_1}{V_2} \times 1000$$

Où

C₂ : Teneur en vitamine C dans le lait en g/L

C₁ : Teneur en de2-6dichlorphénolindophenol en g/L

V₁ : Chute de la solution du 2,6-DIPh en mL

V₂ : Volume de la solution à titrer en mL

I.4. Méthodes d'analyse

I.4.1. Séparation de la caséine et du lactosérum

Mode opératoire :

La caséine a été séparée par écrémage du lait, à 3500 x g pendant 20 min à 4°C deux fois, puis centrifugée à 5000 x g, 4°C pendant 15 min après précipitation avec HCl 4 N à pH4.3. Son pH est ajusté à 7 avec NaOH 1N après être diluée dans un volume équivalent d'eau distillée et centrifugée à 5000 x g, 4°C, précipitée à pH 4.3 et suspendue dans l'eau puis son pH est ajusté à 7 avec du NaOH, congelée et lyophilisée et enfin conservée à - 20°C. (Wangoh *et al.*, 1998).

I.4.2. Obtention d'hydrolysats pepsiques

Afin d'obtenir des fractions peptidiques douées d'activité biologique, la pepsine est employée comme enzyme simulant une digestion enzymatique. Selon la méthode de Parrot *et al.*, (2003), le pH de caséine de concentration de 20 mg/mL est ajusté à 2 par HCl 1N, on ajoute une solution de pepsine à concentration initiale de 1g/L dans 0.01M HCl avec un rapport enzyme/ substrat 1 :200 (p/p), on homogénéise en agitant puis on laisse au bain marie à 37°C et on prélève des aliquotes à 15,30, 45,60,90,120,150 et 180 min d'incubation. On arrête la réaction en chauffant à 85°C pendant 5 min. Les aliquotes sont congelés après versement en fines couches dans des coupelles et lyophilisés pour des dosages ultérieurs.

I.4.3. Electrophorese sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

La méthode de Laemmli (1970) est utilisée pour séparer les protéines selon leur poids moléculaire, en condition dénaturante, le SDS : sodium dodécyl sulfate ($C_{12}H_{25}SO_4$), est un détergent anionique qui englobe la protéine de charge négative, le β mercaptoethanol rompt les ponts di sulfure, le gel de concentration (stacking gel, 3 à 5%) est coulé en haut du gel de séparation (résolution, 6-15% polyacrylamide). La séparation se fait par migration vers l'anode après application d'un champ électrique. T et C sont des indices de structure de gel définie par leur porosité :

$$T=(a+b) /V \text{ et } C= b/ (a+b)$$

Où :

a : Masse de l'acrylamide (g)

b : Masse du bisacryamide (g)

V : Volume du tampon en mL

Mode opératoire

Deux gels à différentes concentrations d'acrylamide et de bisacrylamide, un gel de séparation 17% à pH 8.8 et un gel de concentration 4.8% à pH 6.8 sont préparés (**Tab II**). Le gel de séparation est coulé en premier entre une plaque en verre et une plaque d'alumine, espacé par un spacer on laisse 1.5 cm de moins à partir du sommet puis on coule le gel de concentration, mettre le peigne puis on laisse gélifier. Les puits sont obtenus après retrait du peigne, les protéines dissoutes dans 800 μ L de tampon de l'échantillon (500 μ L de tampon du gel de concentration, de l'eau distillé et du SDS à 10% à volume égale soit 250 μ L et 50 μ L du 2-mercaptoéthanol), sont chauffées à 95°C pendant 5 min, on ajoute 200 μ L de glycérol à 50% et un grain de bleu de bromophenol. On dépose 10 à 20 μ L dans chaque puits, la cuve est remplie de tampon d'électrode à pH 8.3 constitué de 1.2 g de Tris HCl, 5.76g de glycine, 0.2 g de SDS et 200 mL d'eau distillée. Le générateur de courant marque 25mA et 20V pendant 1h (**Annexe 3, Fig.03**). La fixation se fait au TCA 10% puis coloration par une solution de bleu de Coomassie et enfin décoloration par des solutions appropriées (**Annexe 3, Fig. 03**).

Tableau II : Composition de gels SDS- PAGE

	Solution de séparation		Solution de concentration	
	T=17%	C=2.7%	T=4.8%	C=2.7%
Tris HCl pH 6.8	2.51 mL		-	
Tris HCl pH 8.8	-		1.25 mL	
Acrylamide 36% (p/V)				
Bisacrylamide 1% (p/V)	4.6 mL		0.65 mL	
Eau désionisée	2.73 mL		2.9 mL	
Dégazer 2min				
TEMED	13 μ L		50 μ L	
SDS	100 μ L		10 μ L	
Persulfate d'ammonium (10%)	75 μ L		05 μ L	

I.4.4. Analyse par RP-HPLC (Reversed –phase high performance liquid chromatography)

Cette méthode présente l'avantage de réduire le temps d'analyse avec une grande résolution.

La phase stationnaire est une solution de force ionique faible, l'élution des protéines est obtenue en augmentant l'hydrophobicité de la phase mobile. La caséine cameline a été purifiée par RP-HPLC à l'hôpital universitaire Sapienza, Rome selon la procédure de **Jeyaragavan (2001)** avec quelques modifications. La séparation a été conduite sur un équipement Waters Binary équipé d'une colonne de 5 µm, 10* 250 mm, RP- HPLC JUPITER5U-C 18-300A.

Préparation des échantillons

10 mg de chaque échantillon sont solubilisés dans 1mg de TFA à 0.2%, centrifugés pendant 10 min, puis filtrés sur une membrane (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA) 22µm. 150µL de cette solution sont injectés par injecteur automatique. La colonne a été équilibrée avec le solvant A (0.2 % TFA dans H₂O désionisée). Un gradient linéaire pour augmenter le flux du solvant B contenant de l'acétonitrile/propanol 4 :1 a été utilisé pour réaliser l'élution. La séparation des caséines et ses hydrolysats est achevée par application du gradient linéaire selon le programme décrit au **Tab III**. Où le débit était 1.2 mL /min et l'absorbance enregistrée à 220 nm.

Tableau III : Programme de solvant pour résolution de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
40	90	10
41	55	45
46	5	95
47	90	10

I.4.5 .Mesure par ATR-FTIR

Les spectres de la réflectance totale atténuée en infrarouges à transformée de Fourier (FTIR-ATR) des échantillons de caséine cameline et ses hydrolysats peptiques ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre (PerkinElmer), d'un nombre d'onde de 400 à 4000 cm^{-1} , avec une résolution de 2 cm^{-1} (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). L'interprétation des changements dans les composants de bande amide I qui se chevauchent (1 600 à 1 700 cm^{-1}) a été rendue possible par déconvolution à l'aide du logiciel Peak-Fit v4.12 (SPSS Inc.), la ligne de base, les corrélations à 0.99 et les amplifications ont été corrigées linéairement.

I.5. Activité antioxydante et antiradicalaire

I.5.1.La capacité totale antioxydante (TAC): test du phosphomolybdate

Le principe est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire des ions molybdate Mo (VI) MoO_4^{2-} en molybdène Mo (V) $[\text{H}_4\text{PMoO}_8^{\text{VI}}\text{Mo}_4\text{O}_{40}]^{3-}$ et formation d'un complexe vert à pH acide (Prieto *et al.*, 1999).

Mode opératoire

On ajoute à 0.1 mL de chaque hydrolysats (20 mg/mL), 1 mL du réactif contenant (0.6 M acide sulfurique, 28 mM phosphate de sodium et 4 mM molybdate d'ammonium). On laisse incuber dans un bain marie à 95 °C pendant 90 min. L'absorbance est mesurée à 695 nm après refroidissement.

I.5.2. Test de réduction du fer (reducing power)

Principe

La méthode est basée sur la réduction du ferricyanure de potassium (Fe^{3+}) en ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}) par un antioxydant, qui réagit ensuite avec le chlorure ferrique pour former un complexe ferrico-ferreux qui donne une couleur bleue (Hwang *et al.*, 2009).

Mode opératoire

Une solution de chaque hydrolysats (0.5mL) est mélangé à un tampon phosphate (0.2M) à pH 6.6 puis on ajoute 0.5 mL de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%, on laisse incuber a 50°C pendant 20 min, après refroidissement on ajoute 0.5 mL d'acide trichloroacétique à 10% pour stopper la réaction, centrifuger puis prendre 1mL du surnageant ajouter le même volume d'eau distillée et 0.2 mL de FeCl_3 , laisser à l'abri de la lumière pendant 10 min. Lire les absorbances à 700 nm.Un contrôle a été préparé en remplaçant l'échantillon d'hydrolysats avec de l'eau distillée.

I.5.3. Test du piégeage du radical ABTS^{•+}

Principe

L'ABTS ^{•+} est un radical généré par réaction entre l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) et persulfate de potassium K₂S₂O₈ de couleur bleu vert dont l'absorbance est mesurée à 734 nm, cette couleur disparaît par ajout d'un antioxydant.

Mode opératoire

L'activité de piégeage des radicaux libres de la caséine cameline et de ses hydrolysats pepsiques a été analysée selon la méthode décrite par **Miller *et al.* (1993)**, avec une légère modification: Un volume de 100 µL de chaque échantillon a été ajouté à 2,9 mL du réactif radical ABTS ^{•+} (7 mM dans du persulfate de potassium K₂S₂O₈, incubés pendant 16 heures puis dilués dans un tampon phosphate de sodium 0.2 M) et incubé pendant 30 min à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 734 nm. L'activité de piégeage des radicaux des échantillons testés a été calculée avec l'équation:

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [1 - (A_s - A_b) / (A_i - A_b)] \times 100$$

Où

A_i est l'absorbance du cation radical ABTS ^{•+} initial,

A_s est l'absorbance de l'échantillon

A_b est l'absorbance du blanc

I.5.4. Test de piégeage du radical DPPH

Principe

L'activité anti radicalaire est évaluée par la méthode de **Brand-williams (1994)**.

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre, de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H (**Fig. 10**).

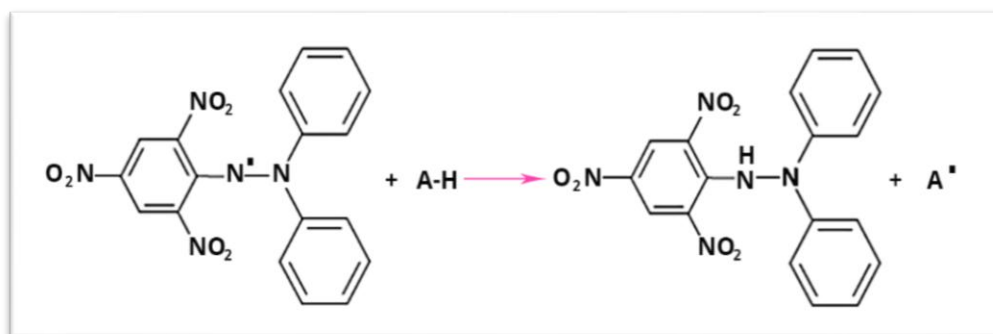


Figure 10 : Structure du radical DPPH et sa réduction par un antioxydant (**Milardovic *et al.*, 2005**)

Mode opératoire

Mettre 0.1mL de chaque dilution dans un tube à essai, ajouter 3.9 mL de solution méthanolique de DPPH de concentration de 6.5×10^{-5} mole/L, laisser incuber 30 min à l'abri de la lumière et à température ambiante, puis lire l'absorbance à 517 nm, le blanc se compose de méthanol pur. Le pouvoir anti radicalaire est calculé selon l'équation

$$\text{Inhibition \%} = \frac{\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}}{\text{Abs}_{\text{contrôle}}} \times 100$$

Où :

Abs_{contrôle} : Absorbance du DPPH

Abs_{échantillon} : Absorbance de l'échantillon plus DPPH

I.6. Activité anti microbienne**I.6.1. Essai de la dose létale :**

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion de puits.

I.6.1.1. Souches utilisées

Les souches utilisées sont des souches de référence American type culture collection (ATCC) obtenues du laboratoire de Microbiologie de l'université de Sapienza, Rome, Italie.

03 souches Gram positif

Bacillus megaterium BM 11

Staphylococcus epidermis ATCC12228

Staphylococcus aureus ATCC 25923

03 souches Gram négatif

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas syringae pv *tabaci* 1918 NCPPB

Acinetobacter baumannii ATCC 19606

02 levures

Candida parasilopsis ATCC 22019

Candida albicans ATCC 24433

I.6.1.2. Préparation des milieux de culture

Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure, on racle à l'aide d'une anse quelques colonies de chacune des souches bactériennes à tester. Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu LB (lysogeny broth) pour les bactéries et WB (Winge broth) pour les levures. On décharge dans 6 ml du milieu LB puis on laisse incuber pendant 6 h à 37°C.

La solution doit avoir une DO de 0.8 à 590 nm.

I.6.2. Préparation du milieu solide et dépôt des hydrolysats

Prendre 500µL de la suspension, dilués dans 4500 µL LB pour les *Bacillus*, 300 µL dans 4700 µL du LB pour *Staphylococcus*, ou 3 mL de suspension dans 3 mL du WB pour les *Candida*, puis prendre 50 µL de l'inoculum, ajouter 6 ml du milieu LB additionné à 1% d'agarose. Couler dans des boîtes Pétri à 8 mm d'épaisseur, poinçonner des puits de 6 mm de diamètre sur les milieux puis y introduire 50µl de chaque hydrolysats à concentration de 80 mg/ mL, dilués dans du PBS à 2 mM additionné à 5% d'acétonitrile. Incuber à 37°C pendant 24 heures. Mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

I.7. Activité antivirale

L'étude de l'activité virale a été effectuée au niveau du Laboratoire de Polio, institut Pasteur annexe Sidi Ferdjd, Alger.

Principe

Mesurer par colorimétrie la réduction de titre infectieux de virus, en fonction de la concentration de la caséine cameline, et de ses hydrolysats pepsiques de 15,45, 30, 60,90,120,150 et 180 min, en les préincubant avec le virus CVB6 à 37 C° sur les cellules A549 et Vero pendant 1h.

I.7.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires choisies dans les tests d'activité antivirale et de cytotoxicité sont les cellules Vero (cellules fibroblastiques de rein de singe vert (*Cercopithecus aethiops*) et les cellules A549 (cellules épithéliales basales alvéolaires humaines adénocarcinomatiques). Ces cellules sont sensibles à de nombreux virus dont le virus à ARN nu, il s'agit d'un entérovirus le Coxsackie virus, sérotype B (CVB6).

I.7.1.1. Milieu

On utilise un milieu DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), additionné de 10% de sérum de veau fœtal SVF (milieu de croissance), et le milieu + 2% de SVF comme milieu de survie (**Annexe 4**).

I.7.1.2. Entretien des cellules

Les cellules Vero de passage 23+4, après avoir été décongelées, sont incubées à 37°C (4 mL dans 21 mL du milieu DMEM+ SVF+ATB), puis trypsinées (par lavage au PBS, 5 mL deux fois et 1mL de trypsine et chauffage à l'incubateur) on vérifie le détachement des cellules des parois puis on ajoute 9 mL du milieu ,on effectue le calcul au microscope après coloration au Trypan bleu .En raison de 22.6×10^6 cellules/10 mL, on prend 4.5 mL et on complète avec 15.5 mL du milieu de survie. De même pour les cellules A549 qui sont de passage 34+7 avec un milieu de croissance à 7% et un milieu de survie à 2%.

I.7.2. Détermination du titre viral sur les A549

Le titre est la dose infectieuse qui provoquent un effet cytopathogène (ECP). Le MOI Multiplicity of infection, est le ratio particules virales sur cellules infectées, le MOI dépend du nombre des particules virales, de la vitesse et le temps d'infection et le nombre de cellules infectées.

Mode opératoire

Déposer 1.8 mL de milieu DMEM à 2% de SVF dans des tubes, mettre dans le premier tube 0.2 mL de suspension virale de titre 10^{-1} , vortexer, transvaser dans le second tube contenant 1.8mL du milieu puis vortexer. Faire de même jusqu'au tube de dilution 10^{-9} . Prendre une plaque de 96 puits puis déposer 0.1 mL de milieu préparé dans chaque cupule (sauf la dernière colonne qui contient le milieu seul). Mettre 0.1 mL de suspension cellulaire A549 à raison de 20000 cellules /cupule, la manipulation est la même pour les cellules Vero sauf pour le nombre de cellules est de 50000/cupule. Incubez à 37°C, en atmosphère contenant 5% de CO₂.

Calcul du titre

Le titre viral requis pour causer une infection chez 50 % des cultures cellulaires inoculées est le DIC T₅₀, calculé selon l'équation :

$\text{Log DICT}_{50} = \text{Log de la } 1^{\text{ère}} \text{ dilution utilisée} - \text{Log du facteur de dilution } \sum (\text{cupules positive} / \text{nombre de cupule de chaque dilution} - 0.5)$ (Morfin et Frobert, 2008).

I.7.3. Dilution

I.7.3.1. Dilution de la caséine cameline et ses hydrolysats

A partir d'une solution de 2.24 mg/mL de caséine (ou hydrolysate), prendre 0.5 mL de cette solution puis ajouter 4.5 ml de milieu DMEM +2% SVF, on obtient une dilution au 1/10, effectuer des dilutions à raison de 1mL dans 4 mL du milieu en agitant au vortex. Donc on

aura des concentrations de 2240 µg/mL pour la solution mère et des dilutions de 224µg, 44.8 µg, 8.96 µg, 1.792 µg, 0.3584 µg et 0.071 µg/mL.

Si dans les cupules tests on dilue au ½ .Au final les concentrations obtenues (**Tab IV**).

Tableau IV : Dilutions finales de l'échantillon

dilution	S _m	S/10	S/50	S/250	S/1250	S/6250	S/31250
Concentration µg/mL	1120	112	22.4	4.48	0.896	0.179	0.0355

I.7.3.2. Dilution du virus

Répartir 0.9 mL de milieu (DMEM+2% SVF) dans chaque tube des 5 tubes à hémolyse.

Prendre 100µL de chaque tube et l'introduire dans le second tube. Bien homogénéiser à l'aide du vortex avant d'introduire un nouvel embout stérile dans chaque tube. Des dilutions de 10⁻¹ jusqu'à 10⁻⁵ seront obtenues.

I.7.3.3. Suspension cellulaire

La concentration cellulaire des cellules Vero est de 30000 par cupule, dans le milieu (DMEM+2% SVF). Soit 6 mL par plaque à 96 puits.

I.7.4. Manipulation

-Prendre 100 µL du milieu et l'introduire dans toute la ligne A

Ajouter 40 µL dans les colonnes 11 et 12 du milieu

-prendre 100 µL de la solution antivirale et introduire dans chaque cupule en commençant par la concentration la plus faible (commencer par la ligne B)

-Ajouter 60µL de suspension cellulaire dans toutes les cupules

-ajouter 40µL de chaque dilution de virus dans les colonnes de 1 à 10, ou la dilution 10⁻¹ est représentée par les colonnes 1 et 2, dilution 10⁻² est représentée par les colonnes 3 et 4etc.

(**Fig.11**).

-incuber sous CO₂ pendant 72 h.

Lecture

Mettre dans chaque cupule 50µL de rouge neutre 0.15% puis incuber 45 min a 37C°.

Rejeter le milieu et rincer avec 300µL de citrate éthanol et éliminer le colorant superflu.

Additionnez 100 µL de citrate éthanol puis lire les DO a 540 nm.

Le pourcentage d'activité antivirale est calculé comme suit :

$$AA\% = \frac{DO_S - DO_V}{DO_C - DO_V} \times 100$$

Où :

DO_S est la densité optique des cellules infectées par le virus et traitées par l'extrait

DO_V est la densité optique des cellules infectées par le virus seulement

DO_C est la densité optique des cellules non infectées par le virus et traités par l'extrait

	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}							TC	TC
CVB6													
0.035μg/ml													
0.179μg/ml													
0.89μg/ml													
4.48μg/ml													
22.4μg/ml													
112μg/ml													
1120μg/ml													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Figure 11 : Organisation de microplaque pour essai de sensibilisation du virus CVB6 à la caséine et ses hydrolysats pepsiques.

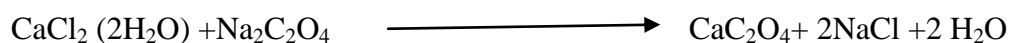
I.8. Activité anti lithiasique

I.8.1. Formation de cristaux

Le calcul rénal également appelé néphrolithiase, urolithiase, lithiase rénale, ou lithiase urinaire est un agrégat solide de minéraux dissous, le plus souvent composé d'oxalate de calcium. Celui-ci se trouve sous deux formes. La forme la plus fréquente est l'oxalate de calcium di-hydraté dont le nom minéralogique est weddellite. L'autre forme est l'oxalate de calcium mono-hydraté ou whewellite (**Ernandez *et al.*,2013**).

Principe

Le composant principal des calculs urinaire est l'oxalate de calcium CaC_2O_4 , ce cristal ionique est précipité selon l'équation :



Mode opératoire.

On introduit 0.0735 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 50 mL d'eau bidistillée, pH 4.6, ajouter une solution d'oxalate de sodium (0.067g de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ dans 50 mL) pH 5.10, pour obtenir une concentration finale de 5mM. Incuber pendant 24h (**Thongboonkred *et al.*, 2006**).

Dans des boîtes de Petri introduire 4mL de solutions de mélange des sels et 1mL de caséine et ses hydrolysats à concentration de 2 mg/mL, puis incuber pendant 24h. Le témoin négatif est composé de 4 mL de mélange des deux sels et 1mL de PBS 2mM. Observer à l'aide de microscope optique muni d'appareil photo.

Chapitre II

Résultats et discussion

II. Caractéristiques du lait camelin collecté

II.1.Choix de la race

Les femelles de la race Sahraoui, sont robustes, le pelage est de couleur beige, elles deviennent adultes à l'âge de 3-4 ans et peuvent mettre bas vers 5 ans après 12-14 mois de gestation. La production de lait camelin est de 6 à 9 L/j. Le lait est trait tôt le matin, il est de couleur blanchâtre et légèrement sucré.

II.2. Caractéristiques du lait camelin

Les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait étudié sont rassemblées dans (Tab V).

Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques du lait de la région de Laghouat

paramètre	Valeurs moyenne
pH	6.32±0.1
Acidité Dornic (°D)	17.1±0.1
Indice de réfraction (nD 20)	1.344±0.0001
Densité	1.027±0.00125
Matière grasse (g/L)	28 ±1
Lactose (%)	4.075±0.1768
Matière azotée totale (%)	4.31 ±0.01
Matière sèche (MS %)	13.5 ±0.04243
Teneur en eau (%)	86.47±0.04243
Cendres (%)	0.9531 ±0.063
Teneur en vitamine C (mg/L)	25.25±0.3536
Teneur en caroténoïdes (mg/L)	0.16 ± 0.2

II.2.1.Le pH

Le pH du lait camelin analysé est de 6.32 ± 0.1 à une température de 20°C, cette valeur est proche de celle trouvée par **Siboukeur, (2007)** avec un pH 6.31 du lait collecté des femelles de la population Sahraoui de Ouargla à la même température, alors que les valeurs rapportées du sud Tunisien sont de 6.46 (**Sboui et al, 2009**). Le pH du lait camelin se situe entre 6.4 à 6.7, similaire à celui du lait de brebis (**Singh, 2017**). Cependant ces valeurs restent plus faibles par rapport à celles du pH de lait bovin qui se situe entre 6.6 et 6.8. Le pH dépend de la présence de caséine et d'anions citriques et phosphoriques (**Lapointe -Vignola, 2002**). Cependant, cette acidité est attribuée à la forte concentration en vitamine C que contient le lait camelin (**Yagil, 1985 ; Farah et al., 1992 ; Haddadin et al., 2008**).

II.2.2.La densité

La densité du lait étudié est de 1.027, cette valeur est égale à celle trouvée par **Kamoun (1995)** et **Sboui et al., (2009)** chez l'espèce cameline tunisienne, ceci nous renseigne sur le taux de matière sèche et la viscosité de la solution (**Sboui et al, 2009**).

II.2.3. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction est de 1.344 nD à 20°C, proche à celui du lait de brebis avec 1.33 (**FAO, 2008**), et qui est affecté par la répartition des différents acides gras dans la matière grasse.

II.2.4. L'acidité titrée (acidité Dornic)

L'acidité indique la teneur en acide lactique formé à partir du lactose. Le lait camelin analysé présente une acidité de 17,1 °D, alors que **Sboui et al., (2009)** ont trouvé une valeur de 17.25 pour le lait collecté au sud tunisien, d'autres auteurs ont trouvé des valeurs inférieures (aux alentours de 15°D) (**Kamoun ,1995 ; Bouhaddaoui et al.,2019**). La variation de l'acidité dépend de l'alimentation, condition environnementale et période de lactation (**Abu-Tarboush, 1996**).

II.3. Analyse biochimique

II.3.1. La matière sèche

Le lait analysé contient 13.53 % de matière sèche, proche de la valeur trouvée par **Gnan (1986)**, qui est de 13% pour le lait camelin libyen, la valeur moyenne de celle-ci est de 11.80, (**Singh, 2017**).La teneur en matière sèche du lait varie en fonction du stade de lactation (**Bengoumi et al., 1994**).

II.3.2. L'eau

La teneur en eau du lait analysé est de 86.47%, selon quelques auteurs elle serait entre 86 et 88% (**Al-Haj et Al-Kanhal, 2010**). Cette valeur passe à 91% lorsque les chamelles développent un system de dilution de lait pour prévenir contre la déshydrations des chamelons en cas de stress hydrique (**Yagil ,1980**).

II.3.3.Les cendres

La teneur en cendre serait de 0.9531 % dans notre échantillon de lait. Cette valeur est proche de la valeur trouvée par **Attia, (2001)** et qui est de 0.99%. La fourche fixée par certains auteurs se situe entre 0.6 et 0.9% (**Al- Haj et Al-Kanhal, 2010**), cette valeur est relative à l'apport alimentaire (**Yagil , 1985**) et au stade de lactation (**Farah, 1993**).

II.3.4. Teneur en matière grasse

Le lait analysé représente une teneur en matière grasse de 28 ± 1 g /L, cette valeur est identique à celle trouvée par **Siboukeur (2007)**. La teneur en matière grasse dépendrait de plusieurs facteurs tels que le stade de lactation, la saison, la nutrition, la physiologie de l'animal et sa race (**Linn, 1988**).

II.3.5. Le lactose

Le lactose présent dans le lait étudié présente une valeur de 4.15% proche de la valeur trouvée par **Ramdaoui (1998)** avec 4.19% chez le lait camelin marocain. La teneur varierait entre 3.3 à 5.8% et serait reliée à la nature de la végétation notamment les halophytes (**Khaskheli et al., 2005**).

II.3.6. Matière azotée totale

La teneur de la matière azotée totale de nos échantillons est de 4.31% et se situe dans la fourchette citée par **Konuspayeva (2007)** variant entre 1.4 et 6.7%. Selon **Yagil et Etzion (1980)** ces valeurs sont comprises entre 4.6 et 5.7 % en régime hydraté mais chutent jusqu'à 2.5% en régime non hydraté.

II.3.7. Teneur en protéines sériques et caséines

En se référant à la courbe d'étalonnage de la BSA (**Annexe 2, Fig. 01**), la teneur du lactosérum serait de 7.9 g/L ce qui représente 18.80% des protéines totales, cette valeur est comparable à la valeur 7.51 g/L trouvée par **Siboukeur (2007)**. La teneur en caséine serait de 34.08 g/L et représenterait 81.14 % des protéines totales. Cette valeur est proche à celle trouvée par **Mohamed et al., (1989)** et qui est de 34, 01g/L.

II.3.8. Teneur en caroténoïdes

La teneur en caroténoïdes dans le lait camelin a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage du β -carotène (**Annexe2, Fig. 02**), le résultat trouvé est de 0.16 mg/L, cette valeur est inférieure à celle mentionnée par **Renner, (1989)** et qui est de 0.21 mg/L pour le lait de vache. Selon **Marino et al., (2012)** ces variations pourraient être attribuées à plusieurs facteurs tels que la saison (cette teneur serait plus élevée au printemps par rapport à l'automne), et la végétation.

II.3.9. Teneur en vitamine C

La vitamine C trouvée dans notre échantillon présente une teneur de 25.25 mg/L. Cette valeur est proche de la valeur trouvée par **Mehaia (1994)** soit 24.9 mg/L. La moyenne avancée par certains auteurs serait de 34.16 mg/L (**Kula et Dechasa, 2016**). Elle reste deux à cinq fois

plus élevée par rapport au lait de vache (Stahl *et al.*, 2006).cette teneur varie en fonction de la saison et le stade de lactation (Mohamed *et al*, 2005).

II.4. Analyse et purification de la caséine cameline et ses hydrolysats

II.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant

Après écrémage du lait par centrifugation, les globules gras montent en surface, la précipitation de la caséine est à pH 4.3 au lieu de 4.6, à ce stade la déminéralisation des micelles est maximale car leurs diamètres sont plus grands que ceux du lait de vache (Farah et Rüegg ,1989).L'analyse de la pureté de la caséine isolée est caractérisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide conditions dissociantes et dénaturantes en présence du dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS).Cette méthode donne une estimation du poids moléculaire des protéines comparées à celui du standard. Le profil électrophorétique de la caséine est représenté par **Fig.12**. On distingue une bande de faible mobilité électrophorétique, avec un poids moléculaire estimé à 28 kDa, proche de la valeur d'Ochirkhuyag *et al* .,(1997), estimée à 27.5 et 26.3 kDa pour les caséines β,α respectivement, d'autres auteurs avanceraient des valeurs de 33 kDa pour la caséine α - S2 et de 29.5 pour la caséine β (El - Agamy, 1997) . Après hydrolyse des bandes diffuses et de poids moléculaire plus petit apparaissent (**Fig.13**).

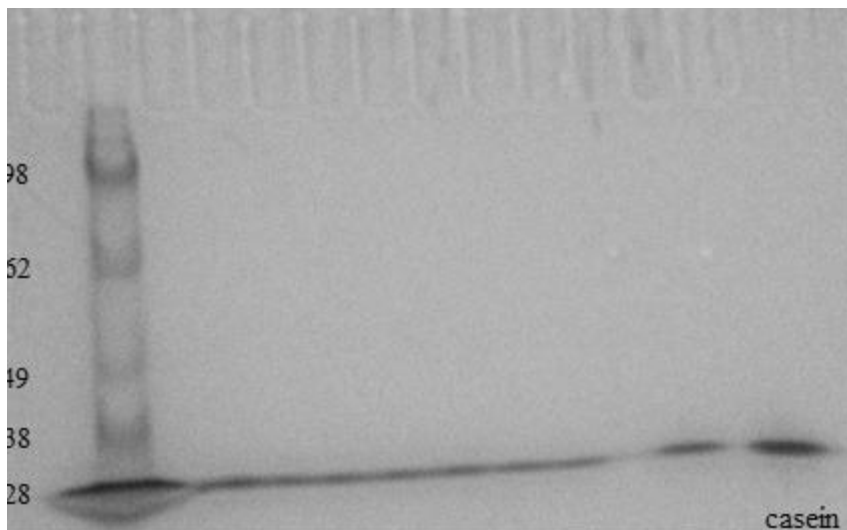


Figure 12 : Electrophorèse de la caséine cameline sur SDS-PAGE

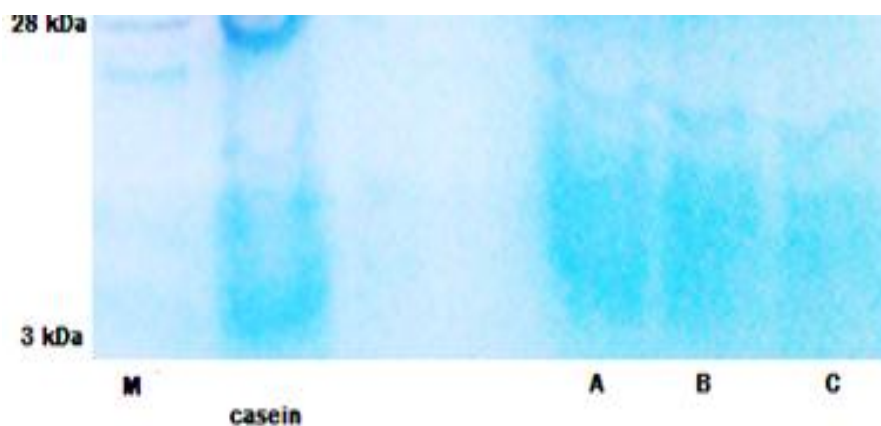
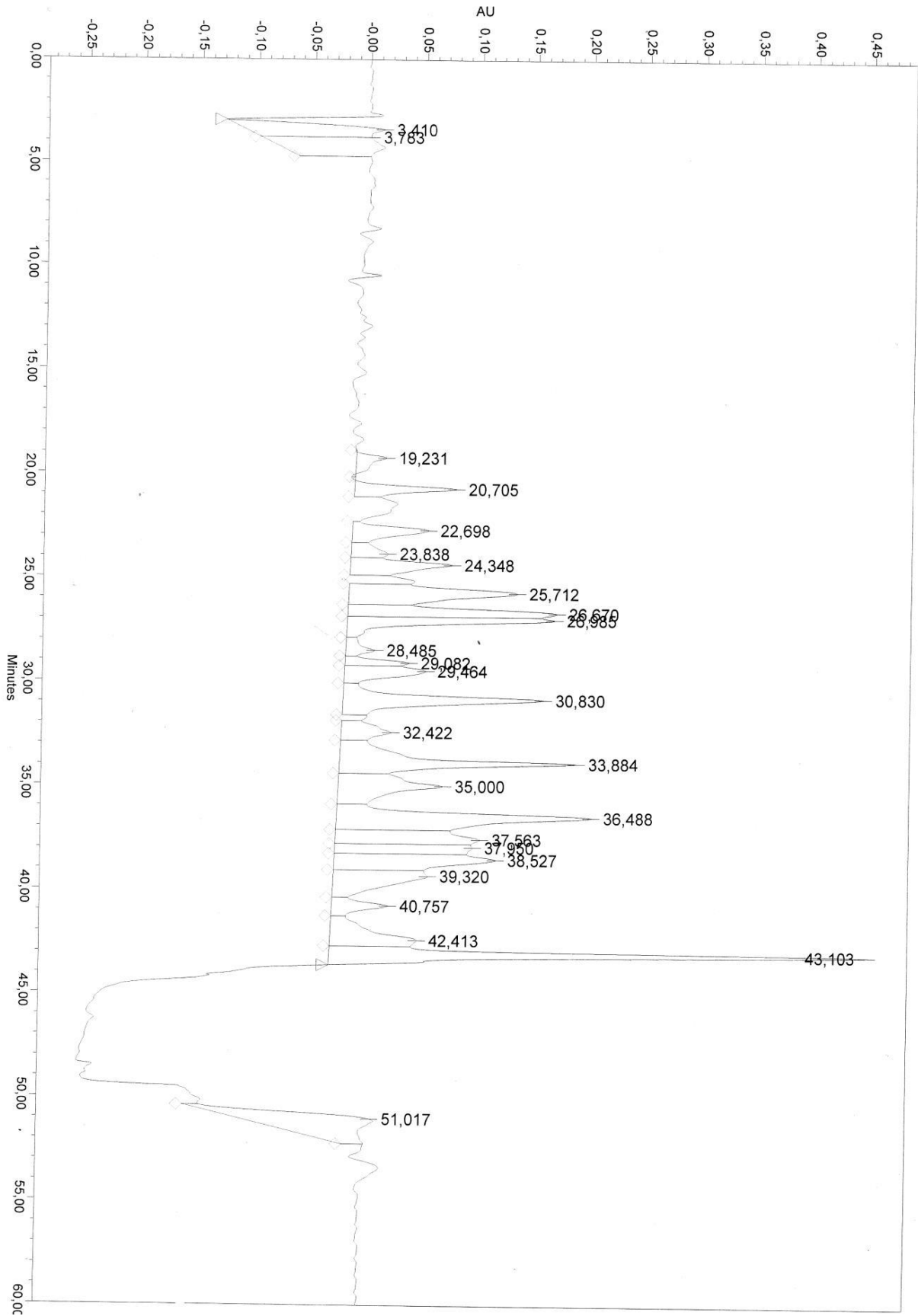


Figure 13 : Electrophorèse de la caséine du lait camelin et ses hydrolysats, **A** : 60 min, **B** : 90 min, **C** : 120 min en SDS-PAGE, gel de concentration T=4.8% ; C= 2.7, gel de séparation : T=17% ; C= 2.7%

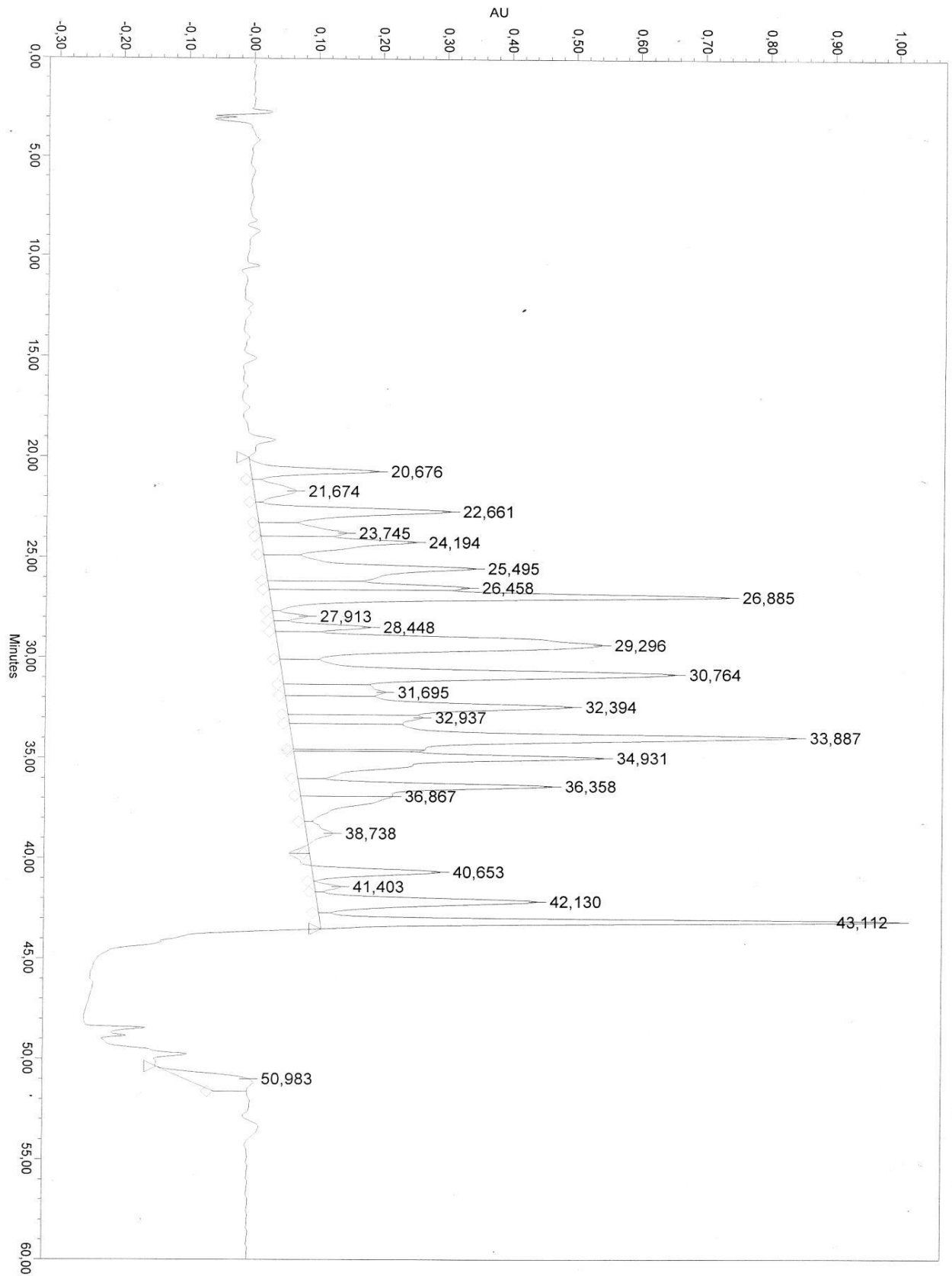
L'action de la pepsine se caractérise par l'apparition de bandes moins marquées, le profil électrophorétique des hydrolysats de 60,90 et 120 min montre leurs poids moléculaire faible et de grande mobilité électrophorétique. **Adoui (2014)** a obtenu des bandes de poids moléculaire variant entre 10 et 15 kDa relatifs à l'hydrolyse de la caséine bovine avec de la pepsine après 1h d'hydrolyse puis disparition totale des bandes après 2h d'hydrolyse. Le clivage de la caséine cameline se porte essentiellement sur 41, 36, 45 et 23 sites pour la α s1- (AN O97943), α s 2- (AN O97944), β - (AN Q9TVD0) et k (AN P79139) respectivement (**Anonyme -2, 2020**). La caséine β , qui représente 65% des caséines est la fraction la plus sensible à l'hydrolyse par la pepsine (**Chang et al., 2013**).

II.4.2. Analyse par RP-HPLC de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques

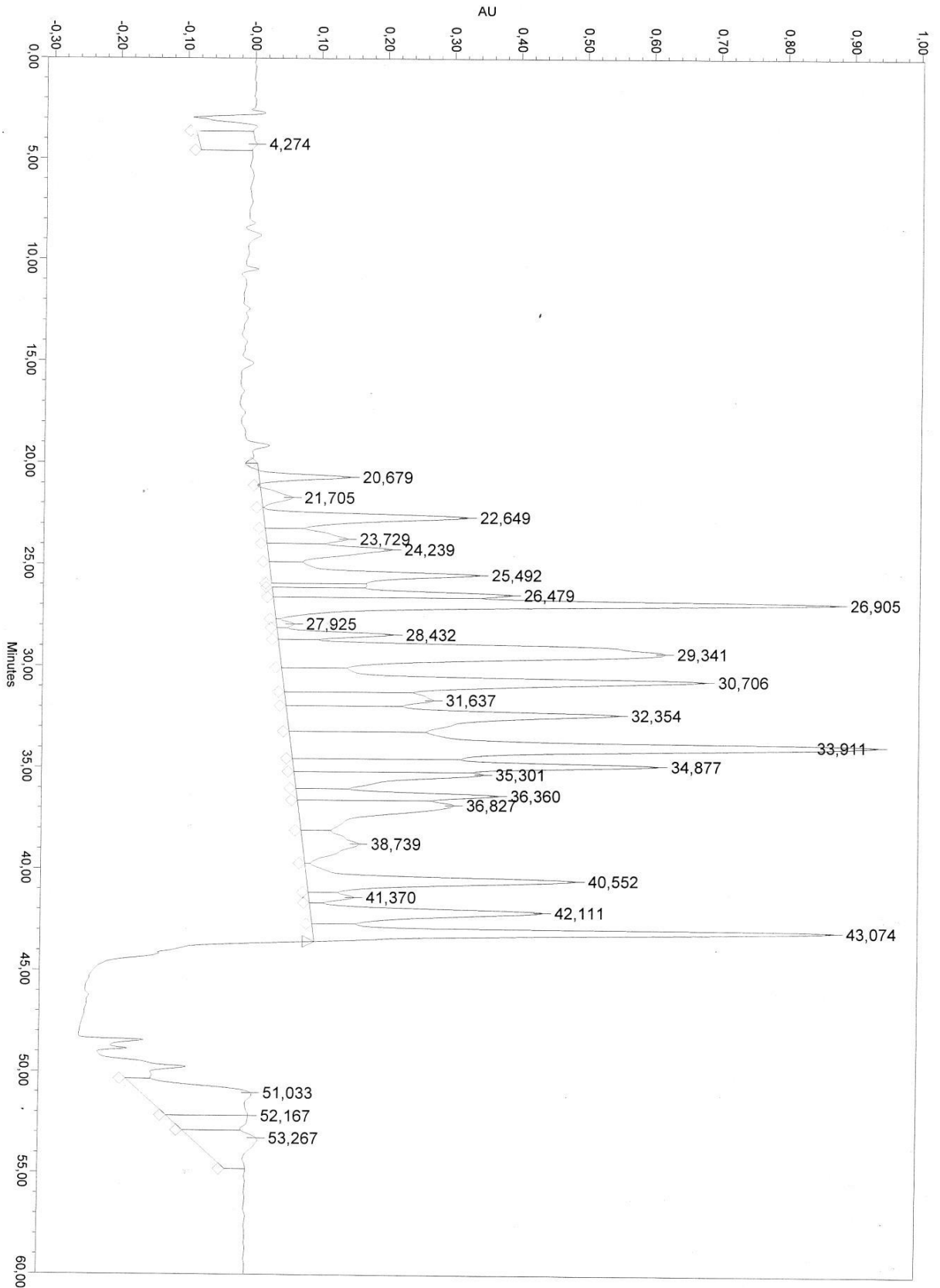
La HPLC en phase inverse permet de séparer les protéines en se basant sur leurs différences d'hydrophobicité. Les différentes fractions caséiques sont éluées selon l'ordre: κ > α S2 > α S1 > β -caséine (**Jeyaragavan, 2001**). La β -Caséine est la dernière qui est élue comparée aux autres caséines due à sa grande hydrophobicité ou elle est élue à 43.10 min (**Fig. 14, A**). Les profils des hydrolysats de la caséine cameline obtenus par hydrolyse après 15, 30, 45, 60, 90,120, 150 et 180 min sont représentés par **Fig.14, B, C, D, E, F, G, H,I** respectivement.



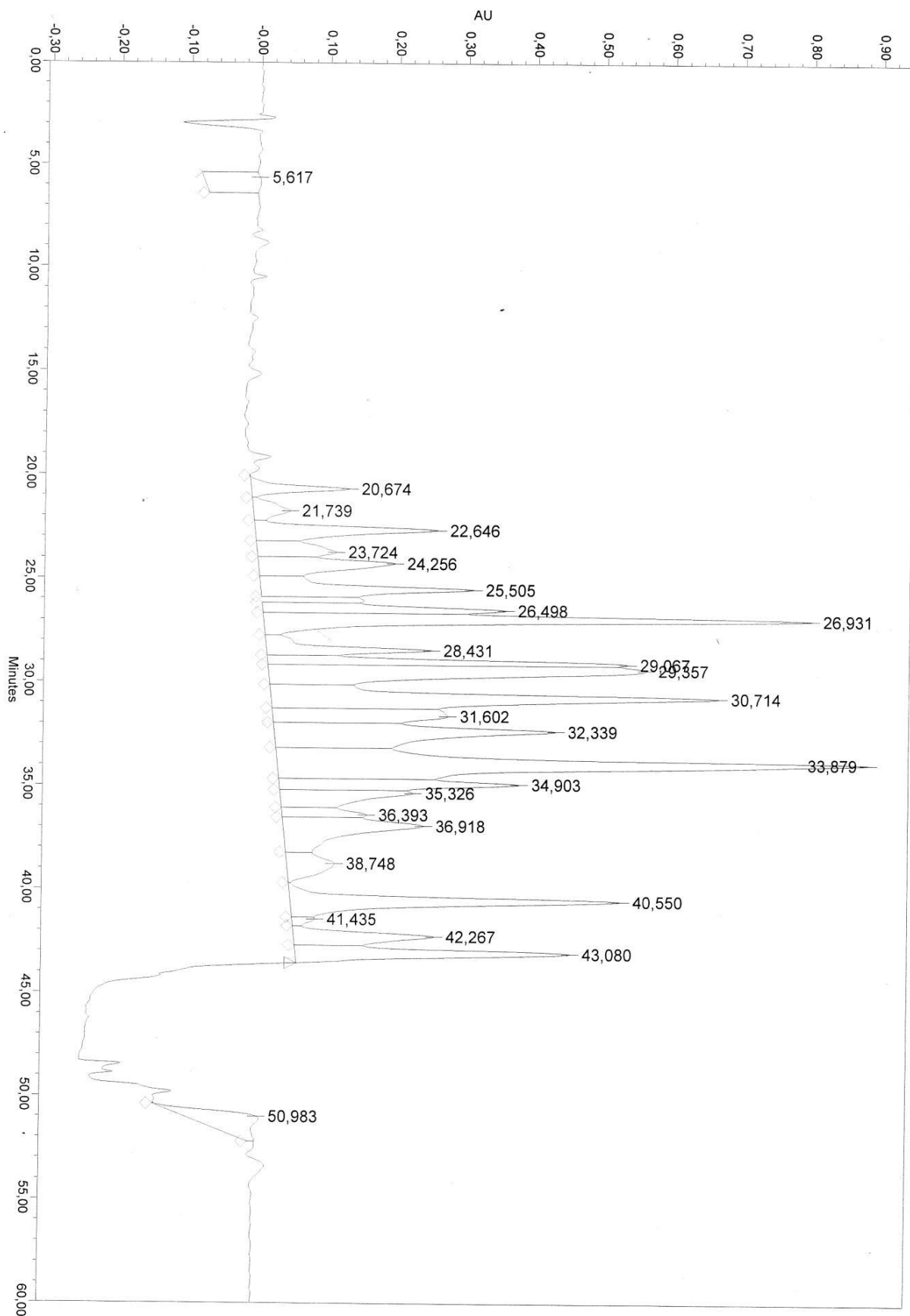
A



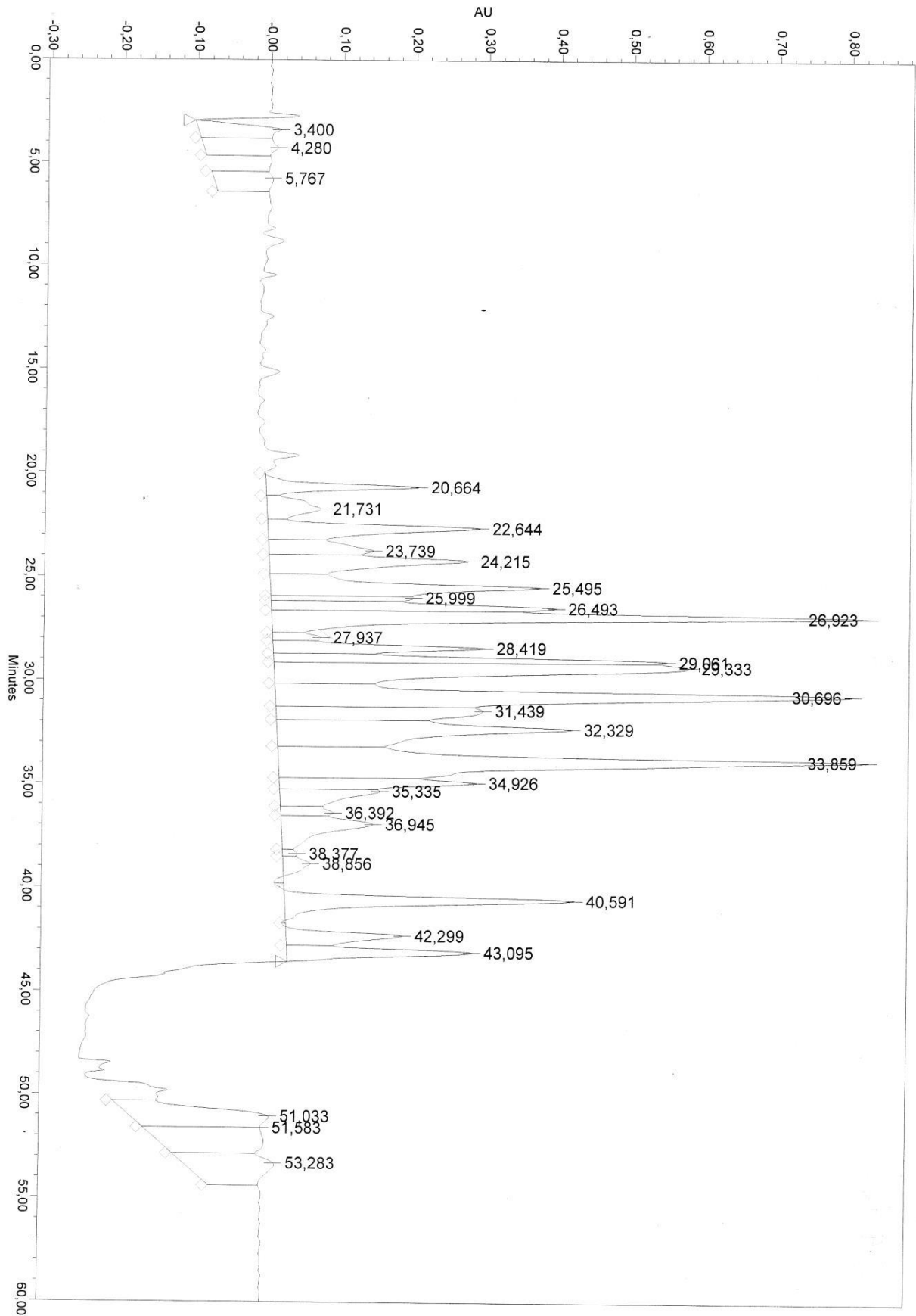
B



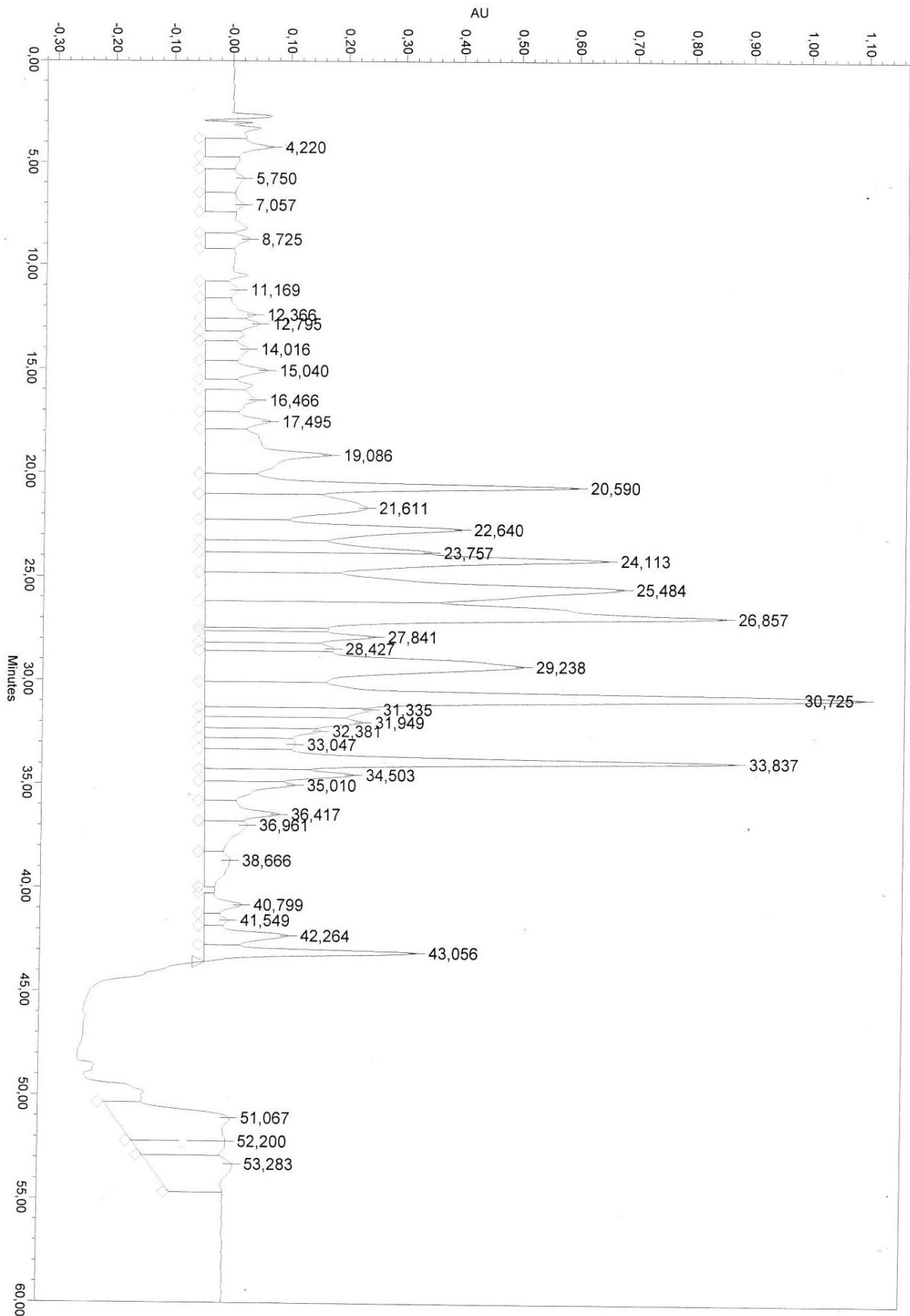
C



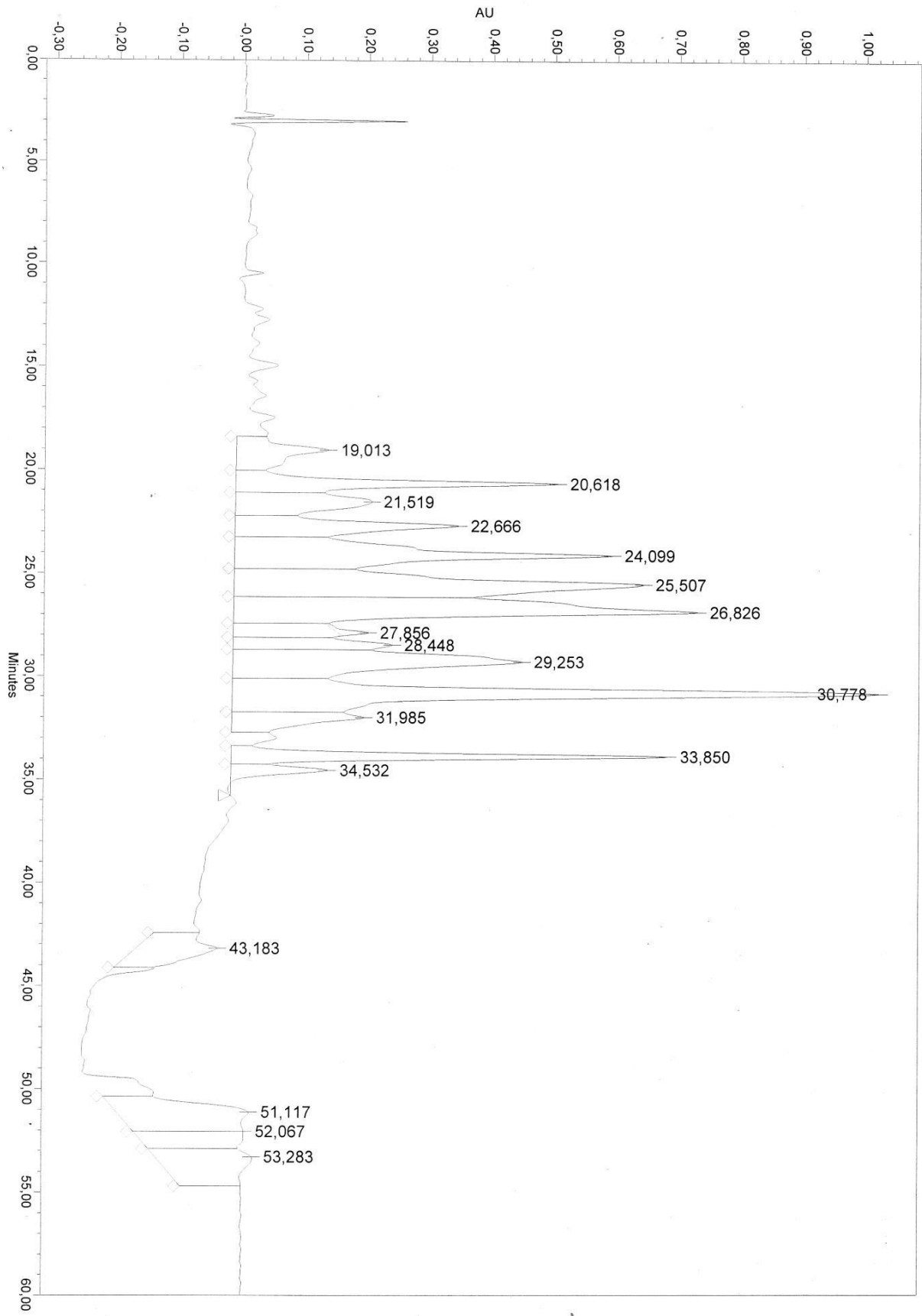
D



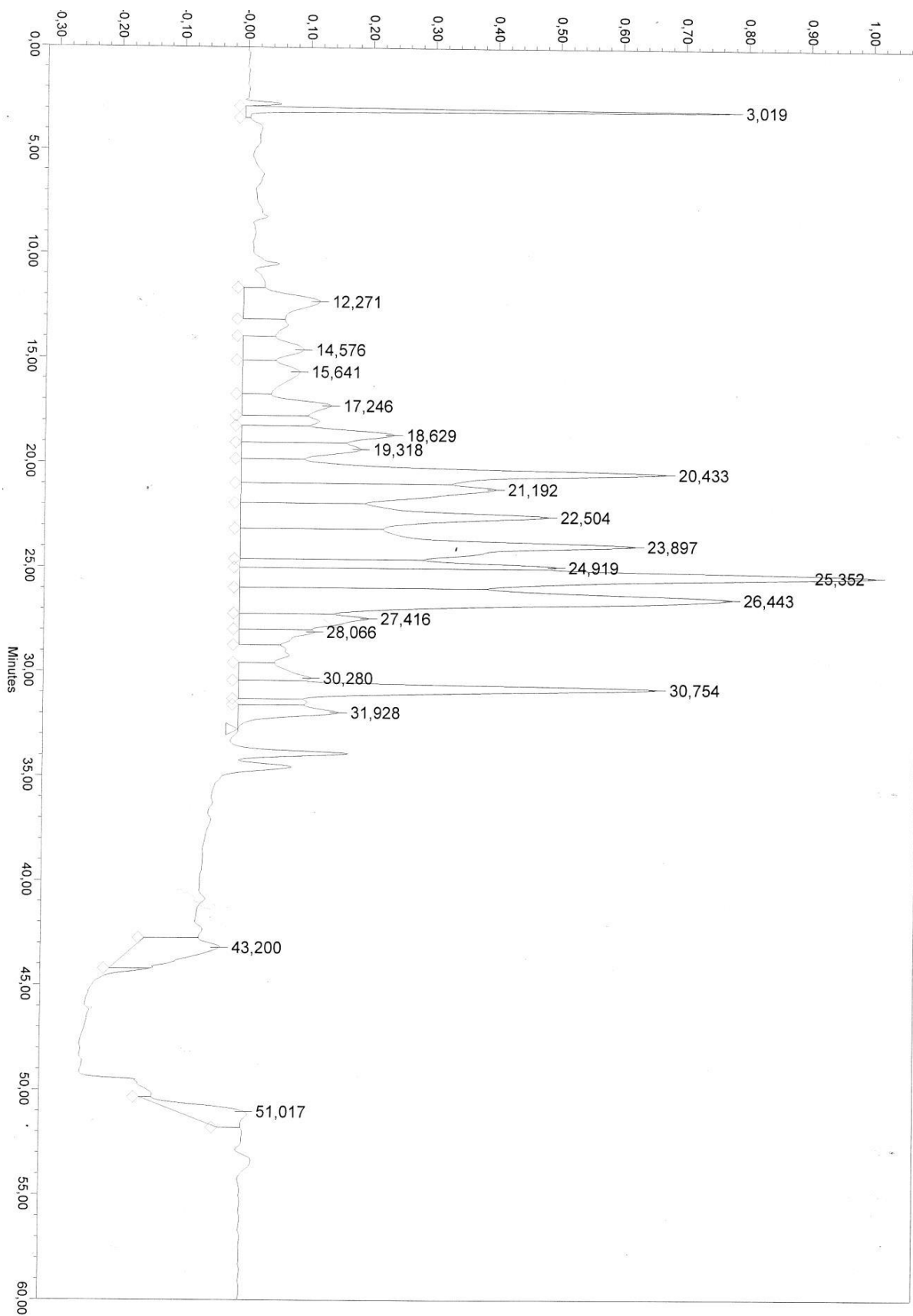
E



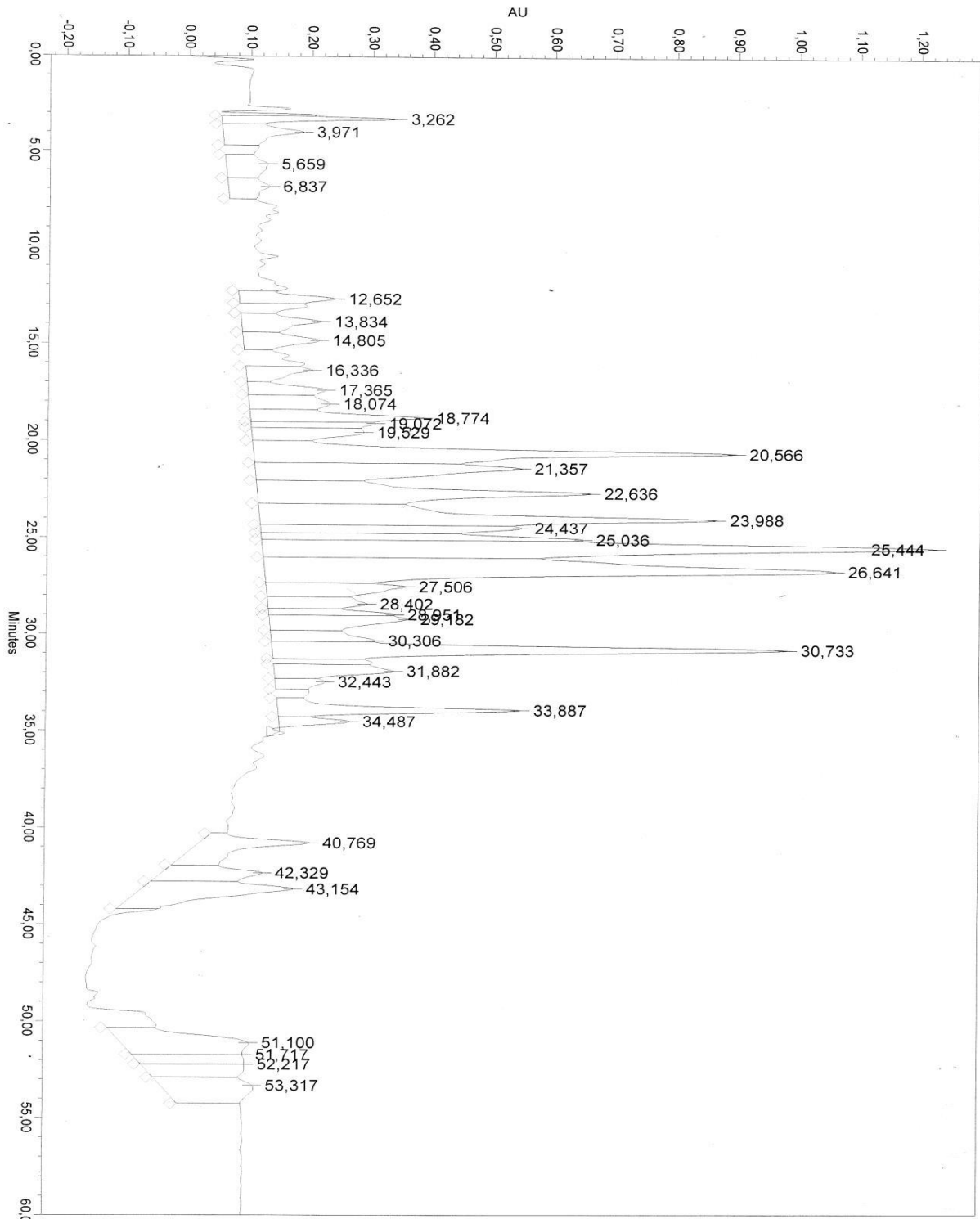
F



G



H



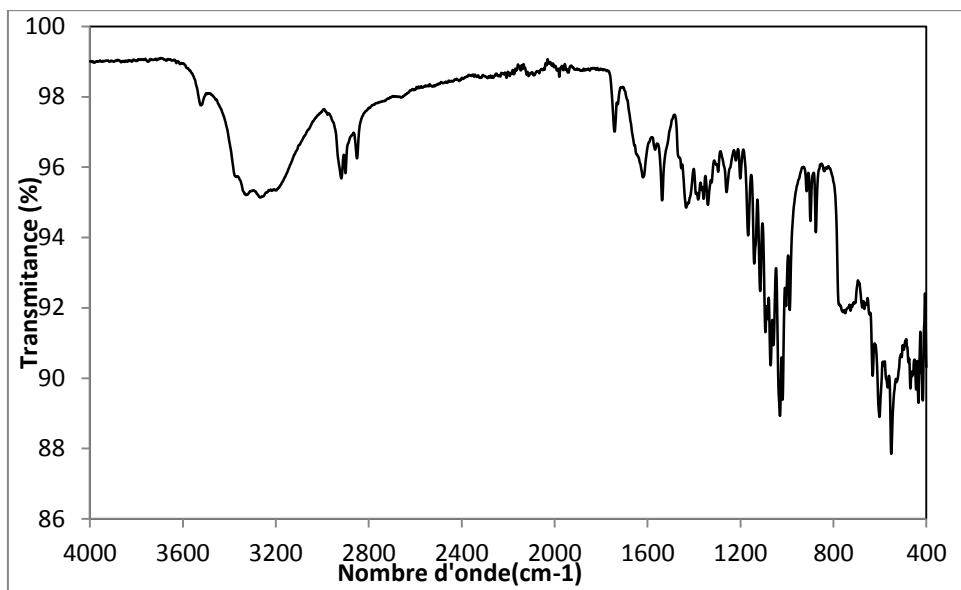
I

Figure 14: RP-HPLC chromatogrammes de la caséine cameline et ses hydrolysats peptiques
A : Caséine, **B:** Hydrolysat de 15 min, **C :** Hydrolysat de 30 min, **D :** Hydrolysat de 45 min,
E : Hydrolysat de 60 min, **F :** Hydrolysat de 90 min, **G :** Hydrolysat de 120 min, **H :**
Hydrolysat de 150 min, **I :** Hydrolysat de 180 min

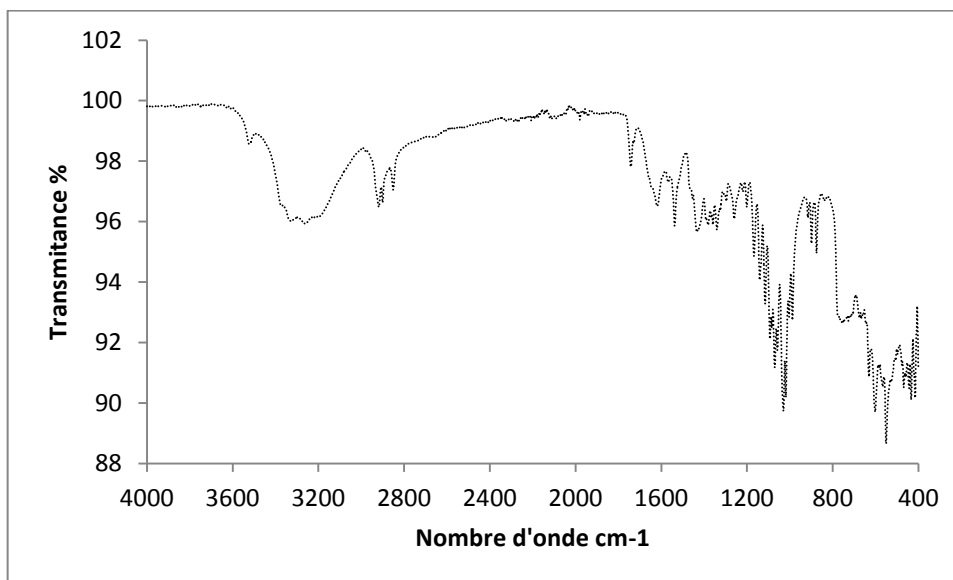
Avant hydrolyse, le nombre de pics entre 31 et 43 min, était inférieur, comparé à ceux obtenus après hydrolyse (**Fig.14, A**), de nouveaux pics apparaissent jusqu'à disparition totale du pic de la caséine β (**Fig.14, I**) ce qui se traduit par une apparition de nouveaux peptides. Une étude similaire a été réalisée par **Jrad et al .,(2014)**, où le chromatogramme de la caséine cameline complète, présentant des petits pics élués avant 60 min qui confirme que la fraction d'azote soluble de la caséine avant la digestion contenait quelques petits peptides alors qu'après hydrolyse, un certain nombre de pics sont élués entre 5 et 70 min, le pic de la caséine à 70 min a disparu en totalité montrant que les caséines étaient complètement hydrolysées en peptides. Selon **Parrot et al., (2003)**, la zone d'éluion 50 min est caractéristique des peptides ou protéines de grande taille et / ou hydrophobes. Après hydrolyse enzymatique, on peut noter l'apparition de nombreux pics s'éluant entre 20 et 60 minutes. Ces nouveaux pics étaient les résultats de la libération de peptides plus au moins hydrophobes. **Chang et al., (2013)** ont également mentionné que la β -CN bovine était hydrolysée plus rapidement que les autres caséines. **Al-Shamsi et al., (2018)** ont obtenus des fractions analysées par RP- HPLC des β -caséine et κ -caséine camelines, ces dernières disparaissaient complètement suite à l'hydrolyse par la papaïne tandis qu'une partie de la caséine α S1 demeurait intacte même après 6h d'hydrolyse.

II.4.3.Mesure par ATR-FTIR

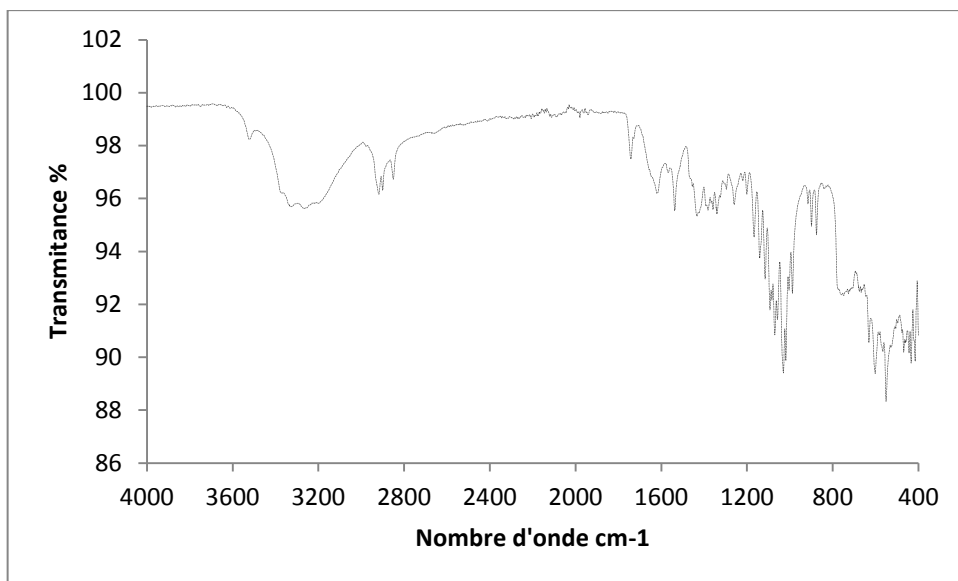
La caractérisation structurale de la caséine et ses hydrolysats a été analysée par FTIR-ATR, pour mettre en évidence la différence dans les structures secondaires dans les conformations des protéines. Le nombre d'onde 1624 est caractéristique de l'amide I en raison des elongations ν (C = O) et ν (C-N), tandis que celui de l'amide II, à 1539 cm^{-1} est relatif aux vibrations de déformation δ (N-H) (**Fig.15, A**). Les bandes d'amides des hydrolysats de 15, 30 et 45 min ne sont pas déplacées par effet de l'hydrolyse mais on observe une augmentation d'intensité de transmittance (**Fig. 15 B, C, D**). Après 60 et 180 min d'hydrolyse on observe un décalage de la bande amide I à 1629 et 1622 et celle de l'amide II à 1534 et 1538 respectivement (**Fig. 15 E, I**). Une autre région montre le déplacement de la bande de l'amide A à 3290 cm^{-1} de la caséine cameline (mode N – H étirement) vers 3294 cm^{-1} (**Fig.15, I**).



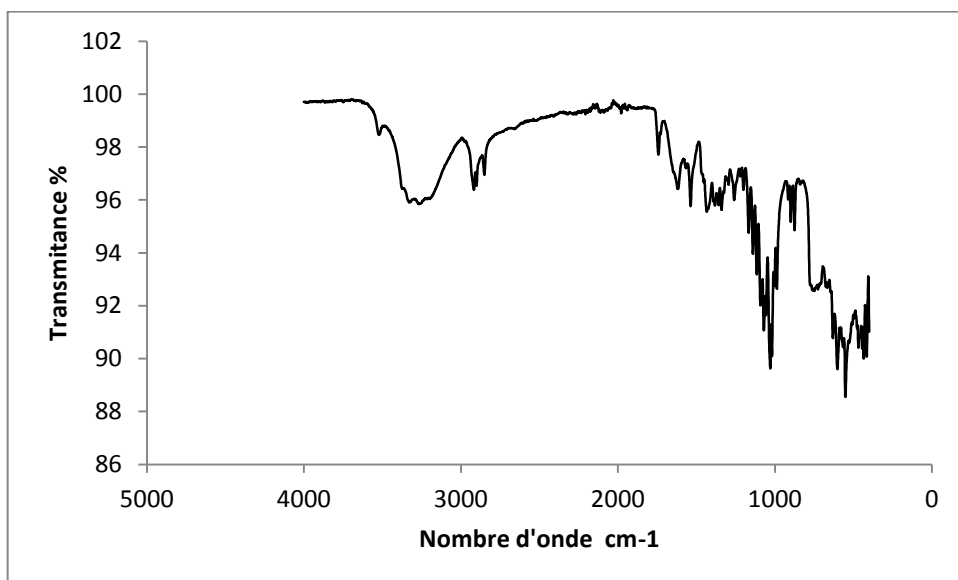
A



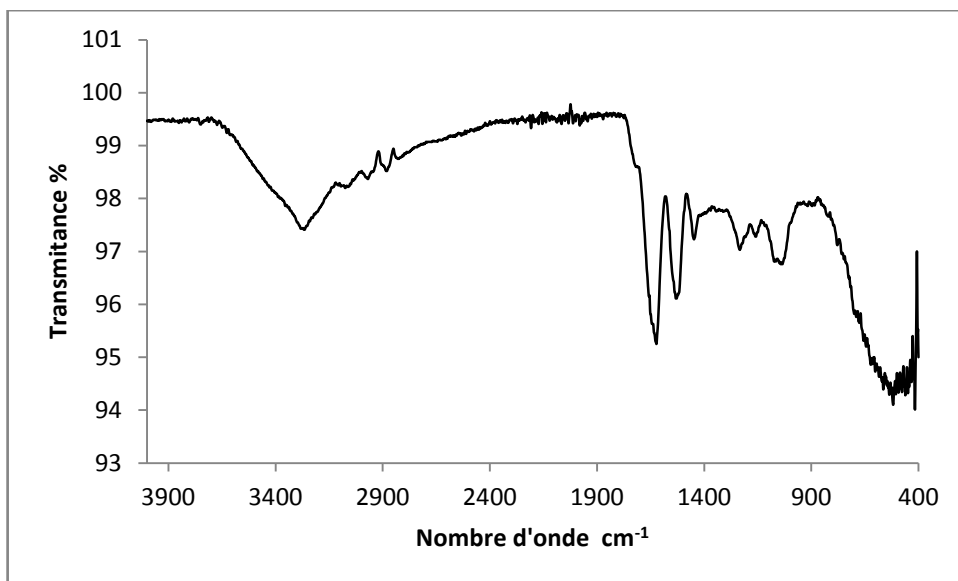
B



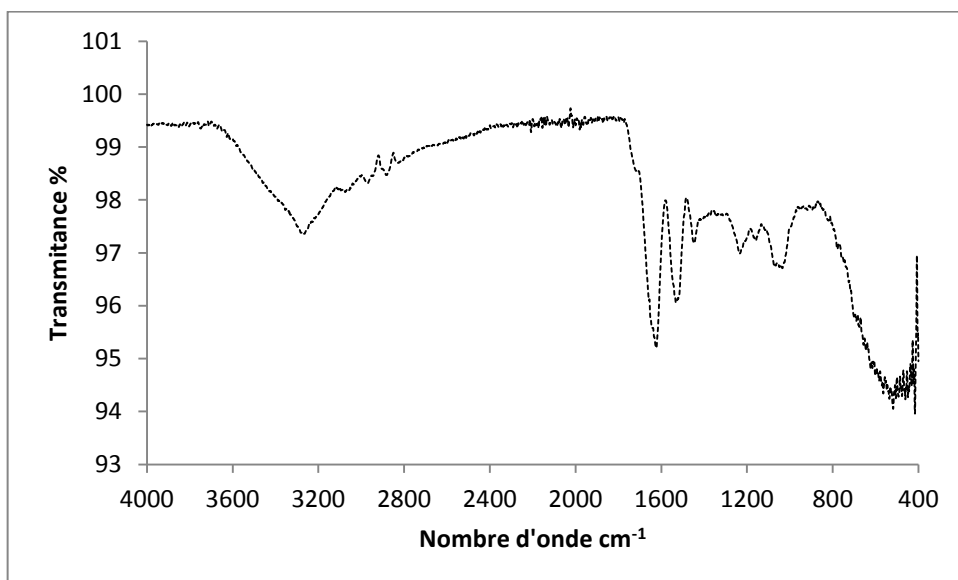
C



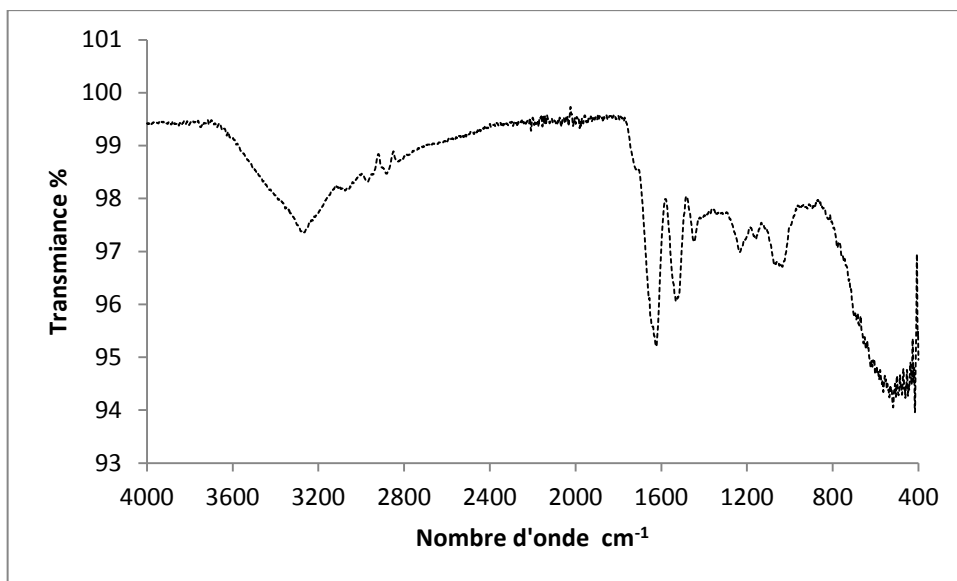
D



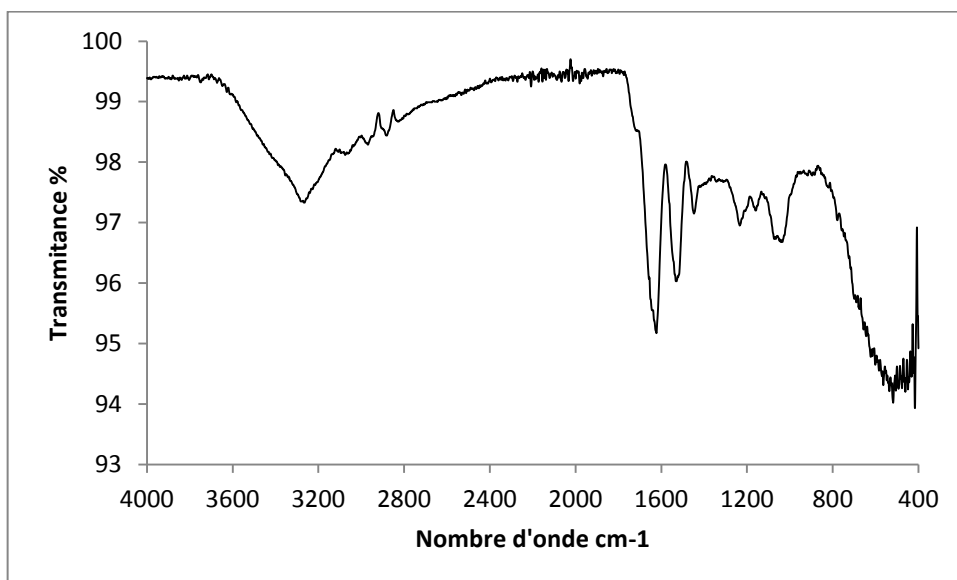
E



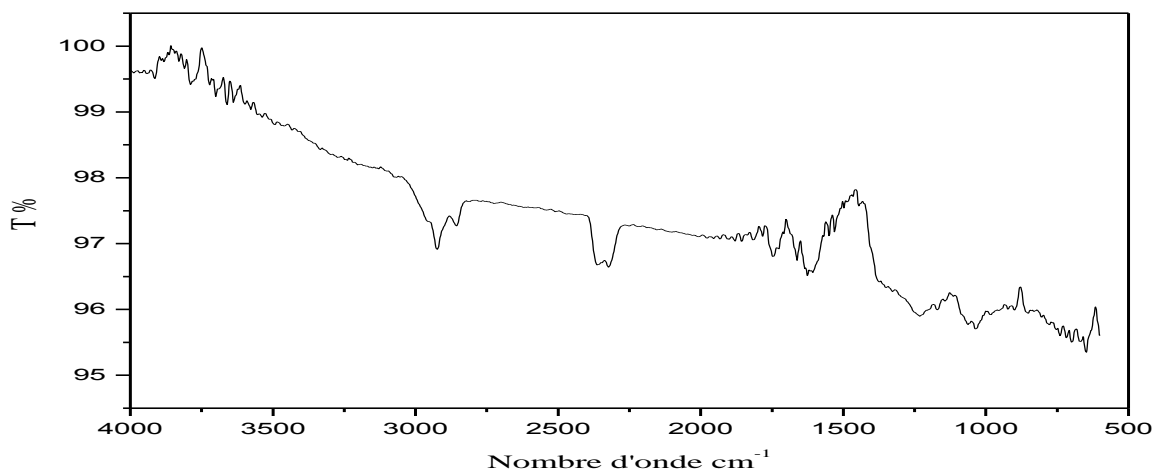
F



G



H

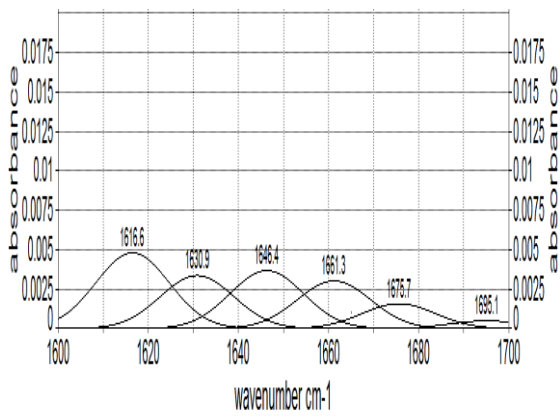


I

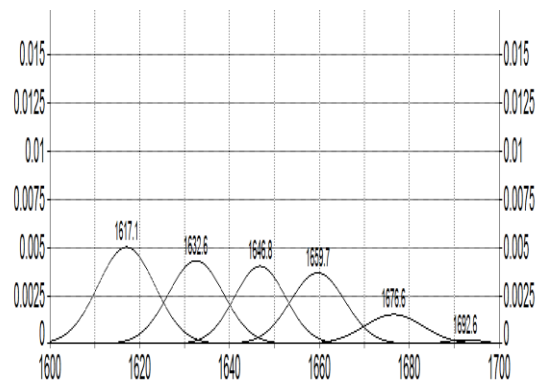
Figure 15 : Spectres FTIR-ATR de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques **A** : Caséine, **B** : Hydrolysats de 15 min, **C** : Hydrolysats de 30 min, **D** : Hydrolysats de 45 min, **E** : Hydrolysats de 60 min, **F** : Hydrolysats de 90 min, **G** : Hydrolysats de 120 min, **H** : Hydrolysats de 150min, **I** : Hydrolysats de 180 min

La déconvolution est une procédure simple, qui utilise la fonction Gaussienne pour déterminer le nombre de composants de l'amide I en ajustant des courbes non linéaires, Peakfit 4.12 est un logiciel utilisé pour déterminer le nombre et la position des vibrations d'anneaux aromatiques, feuillets β (en deux régions), structure pelote (random coil), et l'hélice α qui est la plus intense (**Chadefaux et al.,2009**). La région d'amide I est déconvolue en des bandes d'absorption qui se composent de six aires distinctes, pour la caséine cameline, les bandes sont localisées à 1617 cm^{-1} (anneaux aromatique ou agrégat), 1631 cm^{-1} (feuillelet β ou β -sheets), 1646.3 cm^{-1} (pelote ou random coils), 1661 cm^{-1} (l'hélice α ou α -helix), 1675 cm^{-1} (le deuxième pic du feuillelet β) et 1693 cm^{-1} (le coude ou turns) (**Fig.16, A**). Les aires de déconvolution sont comparées à celles des hydrolysats pepsiques (**Fig.16, B-I**).

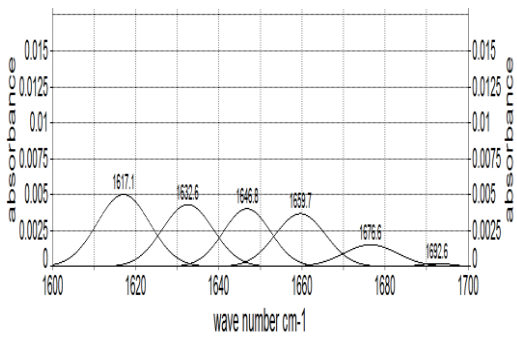
La structure secondaire de la caséine est répartie en en hélice α (17.95%), feuillets β (30.04%), coude β (1.8%), et pelote (22.10%) (**Tab VI**).



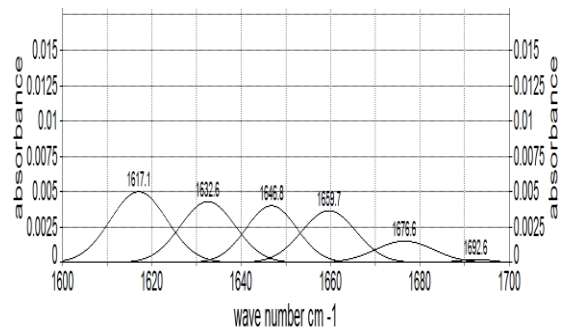
A



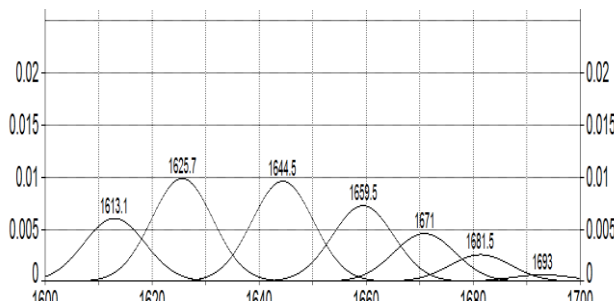
B



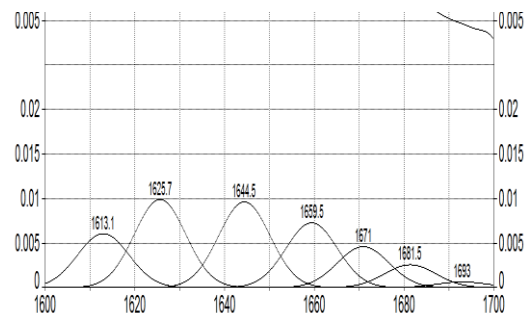
C



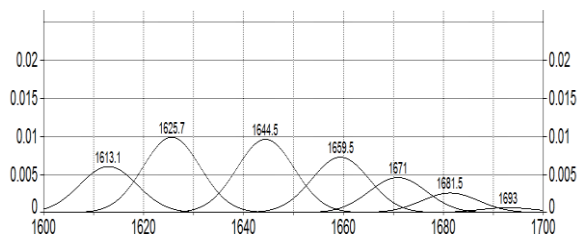
D



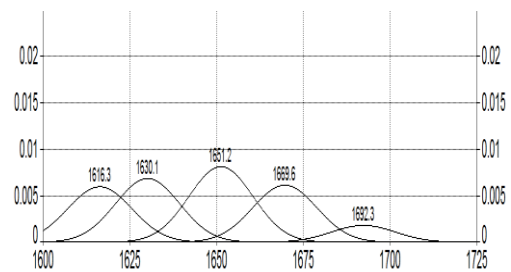
E



F



G



H

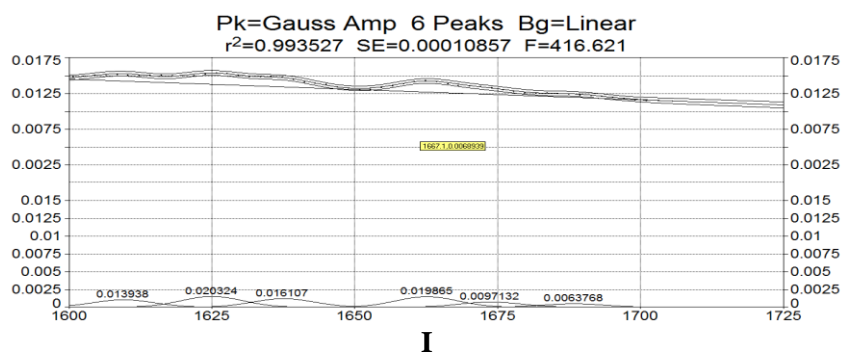


Figure 16 : Déconvolution de la bande d'amide I de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques (A : caséine ; B-I : hydrolysats de 15, 30, 45, 60, 90,120, 150 et 180 min).

Tableau VI : Pourcentage de changement de la structure secondaire de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques

	Hélice α	Feuillet β	Coude	Pelote
caséine	17.95	58.15	1.8	22.10
CNH (15)	17.99	57.58	2.16	21.96
CNH (30)	18.01	58.18	2.26	21.94
CNH (45)	17.86	57.65	2.8	21.69
CNH (60)	17.95	51.98	6.33	23.74
CNH (90)	17.95	51.98	6.33	23.74
CNNH(120)	17.89	52.14	6.32	23.65
CNH (150)	21.64	44.41	5.29	28.66
CNH (180)	23.21	50.59	7.38	18.82

D'après les résultats du tab VI, le pourcentage de la structure pelote est relativement stable, le pourcentage des coudes a augmenté de 1.8 à 7.38, pour la caséine et l'hydrolysat de 180 min respectivement. Une étude réalisée par **Wang et al., (2013 a)** sur des hydrolysats trypsiques de la caséine bovine révélait une augmentation du pourcentage de la structure coude de 24.78% (caséine) à 37.36% , après hydrolyse de 100 min tandis que la structure pelote était relativement stable. La structure secondaire contiendrait 7-10% et 13.2 % d'hélice α et 17 – 33%, et 17 % de structure β contenus dans la β et la α S1 caséines bovine, respectivement, (**Graham et al., 1984**). Les résidus susceptibles à l'hydrolyse se trouvent généralement sur les coudes (β turns) entre les domaines hydrophobes et polaires, les caséines β ouvertes et flexibles subissent une transition structurale des 20%–25% d'hélice polyproline II vers les

structures coude et pelote, localisés entre le N terminal du domaine polaire et le C terminal du domaine hydrophobe (Farrell *et al.*, 2001; Faizullin *et al.*, 2011).

II.5. Activités antioxydante et antiradicalaire

II.5.1. La capacité totale antioxydante (TAC): test du phosphomolybdate

Pour évaluer l'activité antioxydante des peptides générés au cours de l'hydrolyse pepsique, la réduction du phosphate Mo (VI) au phosphate Mo (V) traduite par la formation de couleur bleu verdâtre est mesurée à une absorbance à 695 nm en fonction du temps d'hydrolyse. Il a été noté une augmentation de l'absorbance en fonction du temps d'hydrolyse (Fig. 17). La caséine présente une absorbance moyenne de 0.323, qui passe au double soit 0.7 après 180 min d'hydrolyse. Le pouvoir réducteur amélioré des hydrolysats peut être lié à la disponibilité accrue des protons et électrons résultants de l'hydrolyse enzymatique (Luo *et al.*, 2014), et à la rupture des chaînes peptidiques, conduisant à la libération d'acides aminés (comme le tryptophane, la méthionine, la lysine, l'histidine et la tyrosine) doués d'activité antioxydante (Jamdar *et al.*, 2010).

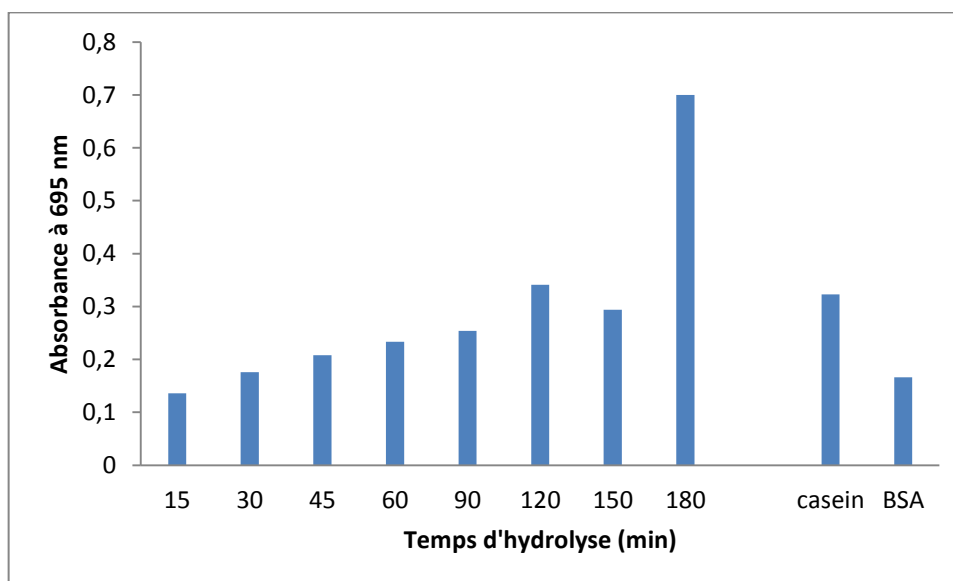


Figure 17 : Evaluation de l'activité antioxydante des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline par le test du phosphomolybdate exprimée en absorbance

II.5.2. Test de réduction du fer (reducing power)

Le pouvoir des hydrolysats pepsiques à réduire le fer ferrique du complexe ferrocyanide Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} a été suivi en fonction du temps (**Fig.18**). La caséine intacte a une faible absorbance (0.14), comparée à celle des hydrolysats. Au fur et mesure que le temps d'hydrolyse augmente, l'absorbance augmente jusqu'à 0.38 avec l'hydrolysats de 90 min puis diminue, ces résultats sont en accord avec ceux de **Sarabandi et al.,(2018)** qui ont constaté que les absorbances de la caséine bovine traitée avec l'alcalase, diminuaient de 0.59 à 0.52 entre 120 et 180 min d'hydrolyse. **Klompong et al.,(2007)** ont noté que les hydrolysats avec le degré d'hydrolyse le plus bas ont montré un pouvoir de réduction plus élevé par rapport aux hydrolysats avec un degré d'hydrolyse plus élevé, indiquant que le pouvoir réducteur des hydrolysats est associé au degré d'extension de l'hydrolyse. L'hydrolyse pepsique accélère la protonation et le mouvement d'électrons (**Cumby et al., 2008**). Cependant, les propriétés antioxydantes des hydrolysats de protéines sont régies par la taille, la structure, les séquences d'acides aminés et le degré d'hydrolyse (**Lahart et al., 2011**).

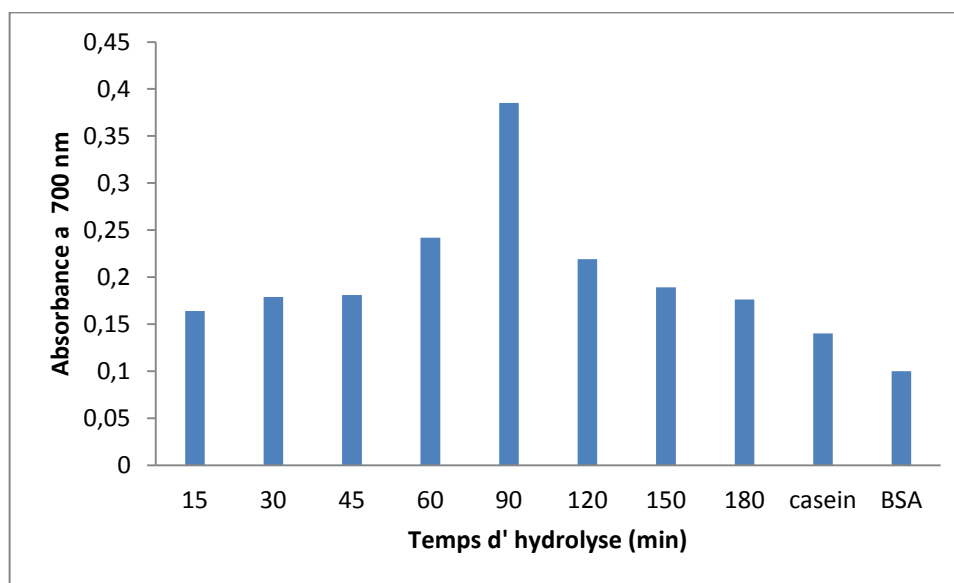


Figure 18 : Evaluation de l'activité antioxydante des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline par le test de réduction du fer exprimée en absorbance

II.5.3. Test de piégeage du radical ABTS ^{•+}

L'activité anti radicalaire de la caséine et de ses hydrolysats a été suivie en fonction de temps (**Fig.19**). La caséine cameline possède une activité anti radicalaire de 54,63% cette valeur passe à 60 % au début de l'hydrolyse, puis augmente au fur et à mesure que le temps d'hydrolyse augmente jusqu'à atteindre un plateau de 80%. **Salami et al., (2011)** ont obtenu une activité anti radicalaire élevée avec les hydrolysats de poids moléculaire de 3 à 5 kDa en utilisant la chymotrypsine. **Jrad et al., 2014** ont utilisé la pepsine et la papaine pour générer un hydrolysat de caséine cameline dont l'activité anti radicalaire est 2 fois plus élevée qu'avec celle obtenue avec l'hydrolysat des protéines du lait. L'hydrolyse accélère le transfert des protons et des électrons des composants lipophiles et hydrophiles des peptides (**You et al., 2010**). Les acides aminés donneurs sont Cys, Trp, Tyr, Met, Phe, His, Ile, Leu et Pro. Selon **Elias et al., (2005 ; 2008)** leur accessibilité et leur position joue un rôle important dans le piégeage des radicaux. Une autre étude menée par **Rao et al., (2020)** a démontré que les fractions issues d'hydrolyse par l'alcalase et la flavourzyme, qui contenaient en moins une Pro dans leur séquences, sont doués de pouvoir piègeur du radical ABTS élevé, notamment les fractions f(183-188) RDMPIQ de la β caséine, les f (98-104) HPHPHLS et la f(100-105) HPHLSF de la caséine κ .

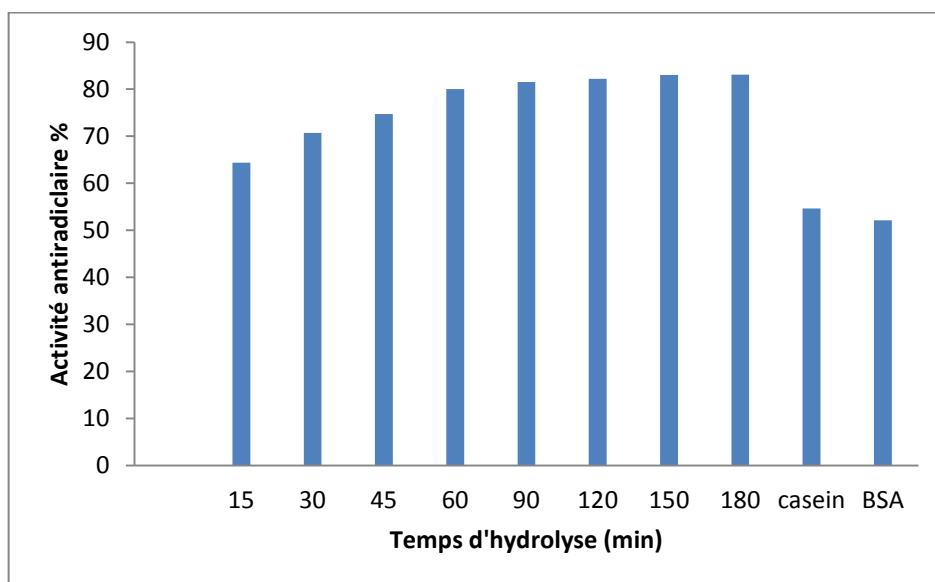


Figure 19 : Activité anti radicalaire exprimée en pourcentage d'inhibition du radical ABTS en présence des hydrolysats pepsiques

II.5.4. Test de piégeage du radical DPPH

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité (**Kedare et Singh, 2011**). Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent en entraînant sa décoloration qui est mesurable par spectrophotométrie, le pourcentage d'inhibition est fonction du temps d'hydrolyse (**Fig. 20**). L'inhibition de la caséine cameline est de 30%, elle est de 17,63% au début d'hydrolyse puis augmente jusqu'à 120 min avec une valeur de 33,97% puis décroît. Selon **Kumar et al., (2013)** l'inhibition de l'hydrolysate de caséine bovine de 15 min est de 24,53%, elle augmente jusqu'à 64,87% après 150 min d'hydrolyse puis diminue à 58,2% après 4h d'hydrolyse suggérant que plus le temps est long, plus l'effet des peptides issus du clivage peptique diminue. Une étude menée par **Luo et al., (2014)** a montré que plus le temps d'incubation est long, plus l'activité est grande. De plus l'activité des hydrolysats est supérieure à celle des caséines seulement après 1h d'hydrolyse avec la pancréatine. Cette activité semble diminuer après 6 h d'hydrolyse chymotripsique (**Kumar et al., 2016 c**). L'inhibition du radical DPPH, obtenue avec des hydrolysats générés par l'alcalase passe de 43,5% à 41,0%, entre 120 et 180 min d'hydrolyse (**Sarabandi et al., 2018**). Selon **Zhao et al., (2014)** la fraction des hydrolysats riches en acides aminés hydrophobes posséderait une activité anti radicalaire plus élevée. Les électrons des acides aminés donneurs tels que His, Phe, Tyr, Trp, semblent être impliqués dans cette activité (**Saiga et al., 2003 ; Kumar et al., 2013**). Le résidu le plus efficace serait le Trp selon certains auteurs (**Tsompo et al., 2011**). L'activité anti radicalaire des hydrolysats obtenue lors du piégeage du radical DPPH est moins élevée que celle obtenue avec le radical ABTS⁺, cela est expliqué par le fait que les radicaux générés ont une stœchiométrie différente et ont ainsi une stéréosélectivité différente avec des interactions distinctes avec les hydrolysats (**Zhu et al., 2008**).

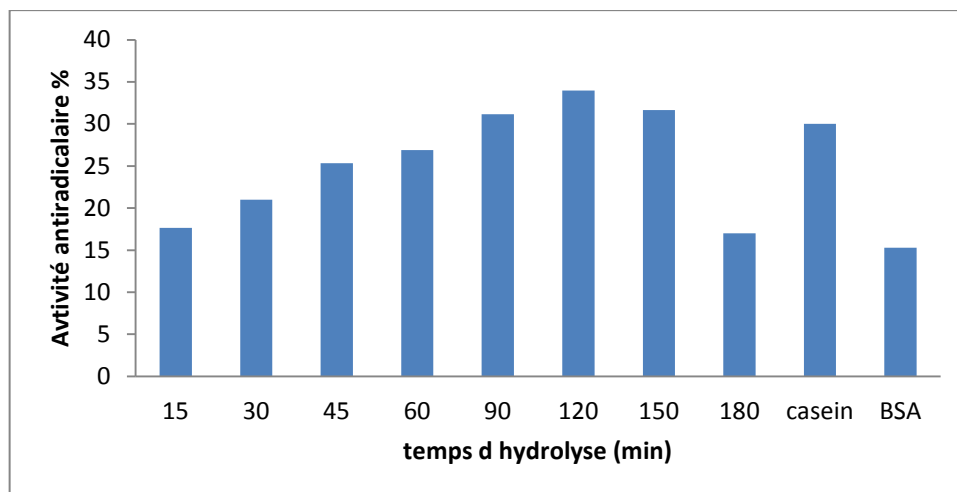


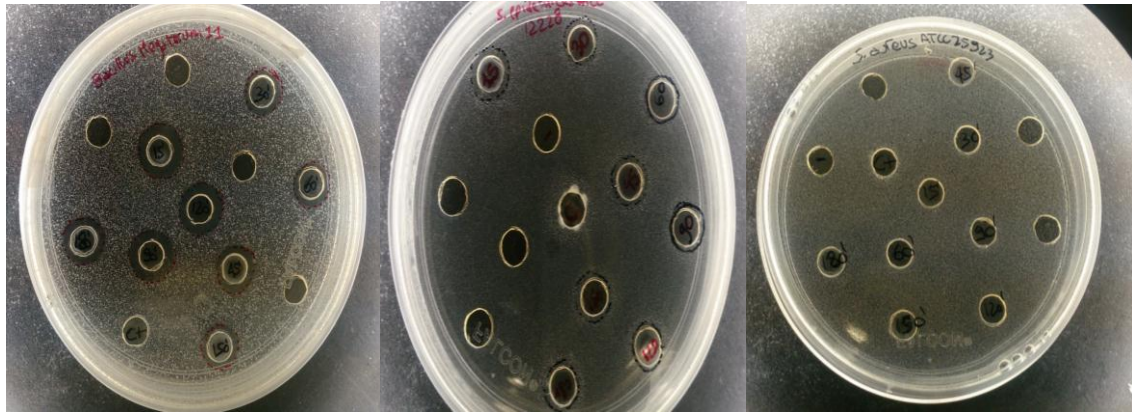
Figure 20 : Activité anti radicalaire exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH en présence des hydrolysats pepsiques

II.6. Activité antimicrobienne

II.6.1. Sensibilité des bactéries et levures à la caséine et ses hydrolysats pepsiques

L'activité antibactérienne et antifongique utilisant une concentration de 80 mg/mL de la caséine cameline et ses hydrolysats a été mise en évidence par la méthode de diffusion de puits de 6 mm de diamètre poinçonnés sur le milieu LB pour les bactéries ou WB pour les levures, en utilisant les souches bactériennes : *B.megaterium* BM 11, *S.epidermis* ATCC12228, *S.aureus* ATCC 25923 (Gram +) ; *E.coli* ATCC 25922, *P.syringae* pv *tabaci* 1918 NCPPB, *A.baumannii* ATCC 19606 (Gram-), ainsi que les levures : *C.parasilopsis* ATCC 22019, *C.albicans* ATCC 24433 (**Fig.21**). Les diamètres de zones d'inhibitions, après 24 h d'incubation ont été suivis avec les différents microorganismes (**Tab VII**).

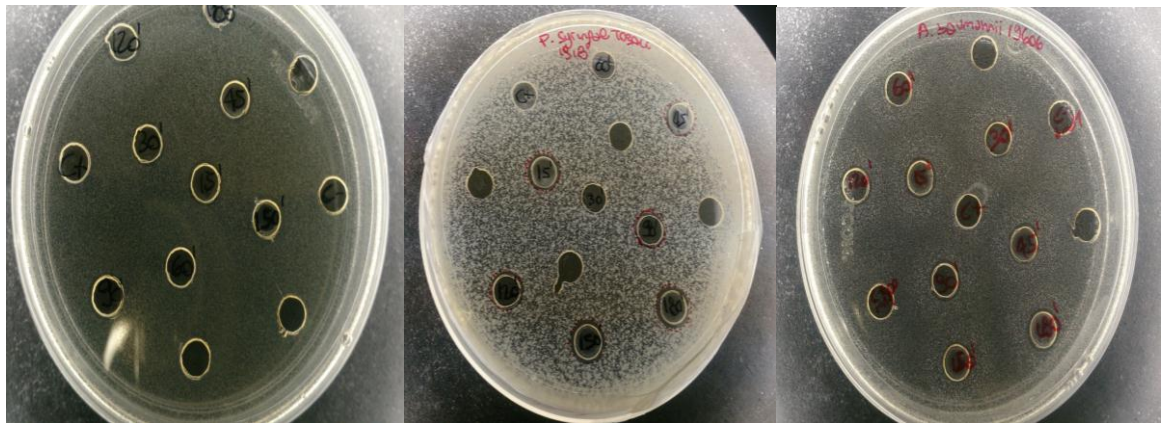
Les résultats obtenus montrent que la caséine n'exerce aucune activité inhibitrice sur toutes les souches bactériennes et fongiques testées, tandis que les hydrolysats pepsiques sont doués de cette activité avec les diamètres des zones d'inhibition variant entre 7.5 et 14.49 mm, excepté pour la souche *S.aureus* qui n'était pas sensible. Les souches fongiques étaient les plus sensibles à tous les hydrolysats. *C.parapsilopsis* a manifesté une sensibilité aux hydrolysats de 150 et 180 min avec des zones d'inhibition de diamètres de 14.42 et 14.49 mm respectivement, suivi par la souche *C.Albicans* avec une zone d'inhibition de 11.89 mm obtenue avec l'hydrolysat de 90 min. Il est à noter que la souche bactérienne *B.megaterium* était la plus sensible à la présence de l'hydrolysat de 90 min (11.18 mm de diamètre de zone d'inhibition).



B. megaterium BM 11

S. epidermis

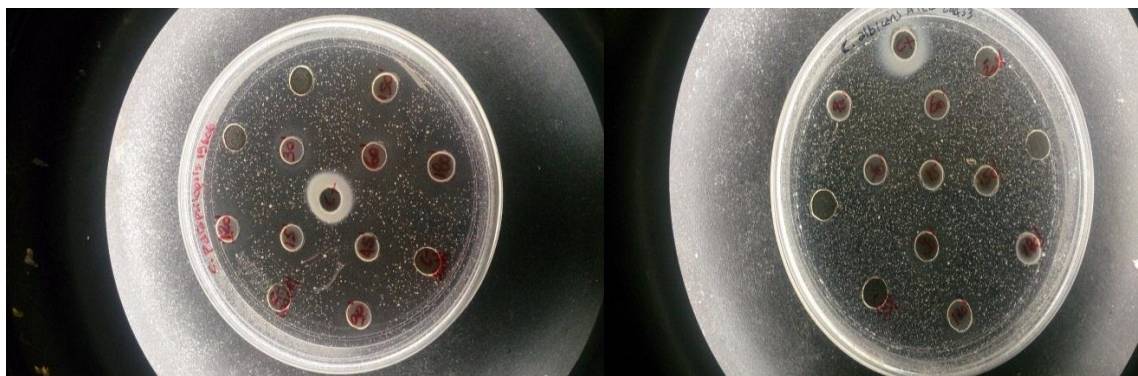
S. aureus



E. coli

P. syringae pv tabaci

A. baumannii



C. parasilopsis

C. albicans

Figure 21 : Activités antibactérienne et antifongique de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques

Tab VII : Diamètres de zones d'inhibition (mm) de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques sur différentes souches

	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilo</i>	<i>B.megateriu m</i>	<i>S.epidermis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.syringae</i>	<i>A.baumann</i>
Caséine	-	-	-	-	-	-	-	-
CNH 15	9.47	12.95	11.1	11	-	8.39	8.87	8.31
CNH 30	10.42	12.78	9.3	8.1	-	7.43	-	7.72
CNH 45	-	13.49	10.2	8.9	-	8.2	8.42	8.49
CNH 60	10.67	12.76	9.14	7.8	-	8.09	-	-
CNH 90	11.89	13.23	11.18	8.1	-	8.30	8.04	8.63
CNH120	10.39	13.51	10.9	7.5	-	8.47	8.19	8.18
CNH 150	-	14.42	9.24	9.19	-	-	8.90	-
CNH 180	-	14.49	9.87	8.1	-	-	8.87	8.21

Ces résultats concordent avec une étude menée par **Jrad et al., (2015)** où la caséine cameline n'exerçait aucun effet sur les bactéries Gram positif à une concentration de 20 mg/mL, tandis que les hydrolysats pepsiques inhibaient la croissance *Listeria innocua* LRGIA01, *Bacillus cereus* ATCC 11778, et *Staphylococcus aureus* nosoco 3011. Les auteurs ont même conclu que les hydrolysats pepsiques et pancréatique de la caséine cameline étaient actifs contre les souches Gram négatif seulement, en occurrence *S. typhimurium* (15 mm) et *E. coli* (20mm) (**Jrad et al., 2020**). **Abd-El-rahim, (2020)** a obtenu une activité antimicrobienne des hydrolydats pepsiques contre *S. pyogenes* (13 mm), *E. coli* (15 mm), et *A. fumigatus* (9 mm), par contre aucune activité n'était mise en évidence contre *A. flavus* et *A. niger*. Les fractions plus actives sont de faible poids moléculaire, à savoir (1-5) et (5- 10) kDa issues d'hydrolyse avec l'alcalase, et l' α -chymotrypsine, dont l'activité antimicrobienne sur *S. aureus* était de 18 mm, *E. coli* (17 mm) , *L. monocytogenes* (17 mm) et *B. cereus* (15mm), suggérant que la taille, la nature ionique et la concentration de ces peptides jouaient un rôle primordiale dans l'activité antimicrobienne (**Kumar et al., 2017**). L'activité antimicrobienne obtenue des peptides issus d'hydrolyse, serait supérieure à la somme des activités de la lactoferrine et des lysozymes (**Gobbetti et al., 2004**). Les premiers peptides issus de l'hydrolyse de caséine bovine qui ont un pouvoir anti microbien contre *S. aureus* , *S.pyogenes* et *Listeria*

monocytogenes à des concentrations de 0.1 – 1mg/mL étaient identifiés comme isracidin et la caseicin (**Lahov et Regelson, 1996**), ces derniers possèdent un caractère amphiphile cationique interagissent avec les membranes bactériennes chargées négativement par des liaisons électrostatiques. A une concentration critique, des pores toroïdaux se forment suite au contact des surfaces polaires des peptides anti microbiens AMPs avec la face polaire des phospholipides qui tapissent la membrane bactérienne, ces derniers s'inclinent en connectant les deux feuillets des molécules lipidiques de la bicouche phospholipidique induisant une distorsion de la membrane provoquant ainsi la déstabilisation membranaire puis mort des cellules (**Ludtke et al., 1994; Matsuzaki et al., 1995**). Un autre modèle dit planches de tonneau (barrel stave) où les peptides qui changent de conformation, sont insérés perpendiculairement à la surface de la bicouche phospholipidique formant un pore dont la surface hydrophobe interagit avec la phase hydrophobe lipidique tandis que le corps hydrophile des AMPs pointe à l'intérieur, l'entrée des peptides s'accélère et le diamètre du pore s'élargit, conduisant ainsi à la fuite des composants cytoplasmiques puis mort des bactéries. Lorsque les AMPs causent une perméabilité de la membrane bactérienne en la tapissant sans formation de pores, ce modèle est dit tapis (Carpet-like) (**Zhang et al., 2001**). La plupart des peptides antimicrobiens ont une similitude structurale : longueur de 26 acides aminés, une charge positive comprise entre 0 et 7, plus de 57% soit 15 des 26 acides sont hydrophobes non polaires, et présence des résidus Pro très proches de leur C terminal (**Walker et al., 2001**). Des ponts disulfures, stabilisent leur structure en hélice α et feuillet β , une fois perdus, l'activité antimicrobienne est réduite (**Fázio-Oliviera et al., 2006**).

II.7. Activité antivirale

II.7.1. Cytotoxicité de la caséine et ses hydrolysats sur les lignées cellulaires

L'activité cytotoxique a été évaluée après 72h de contact entre la caséine et ses hydrolysats sur les lignées cellulaires Vero et les A549. La caséine et ses hydrolysats à des concentrations de 0.035-112 $\mu\text{g/mL}$ favorisent la survie des cellules et leur prolifération (**Fig.22, A**) et (**Fig.23, A, B, C**). Un effet dose-réponse est nettement observé après 72 heures de contact entre les cellules Véro, les A549 et la caséine de même pour les hydrolysats où la concentration de 1120 $\mu\text{g/mL}$ est une dose cytotoxique pour les cellules utilisées (**Fig. 22, C**). Après préincubation avec le virus Cox B6, il ressort que l'activité antivirale dépend de la concentration des protéines, la multiplicité d'infection : 0.1 et 1 MOI équivalent à 10^{-4} et 10^{-5} respectivement, et la durée de l'incubation.

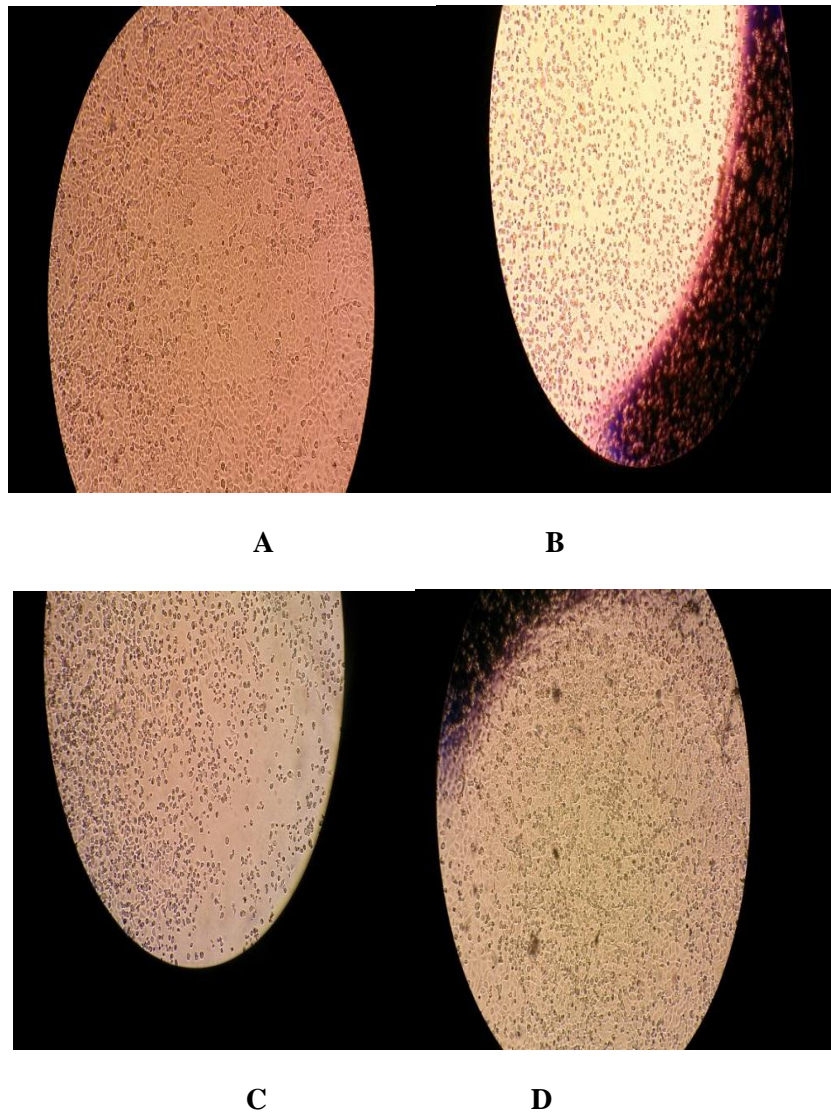
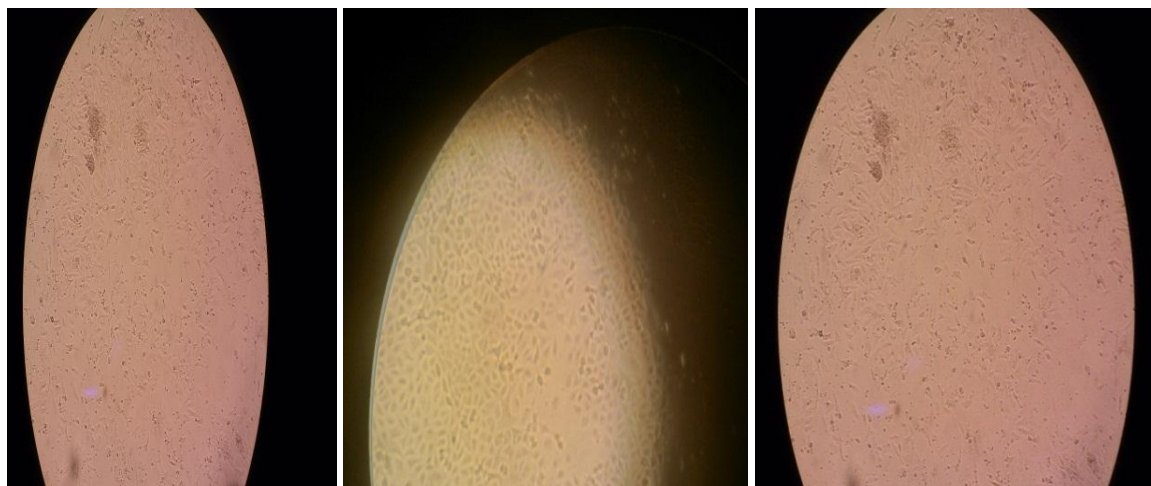


Figure 22 : Activité antivirale de l'hydrolysate 60 min de la caséine cameline utilisant les cellules Vero et CVB6

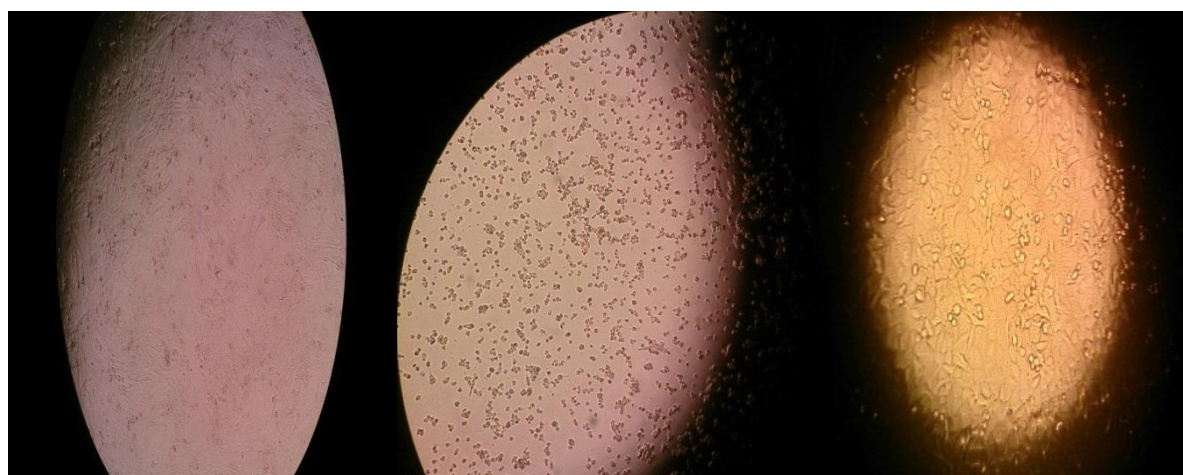
- A** : Cellules Vero + hydrolysate 60 min 112 μ g/mL (témoin négatif)
- B** : Cellules Vero + CVB6 1 MOI (100% ECP) (témoin positif)
- C** : Cellules Vero + hydrolysate 60 min 112 μ g/mL (effet cytotoxique)
- D** : Cellules Vero+ CVB6 (1 MOI) + hydrolysate 60 min 112 μ g/mL (0 % ECP)



A

B

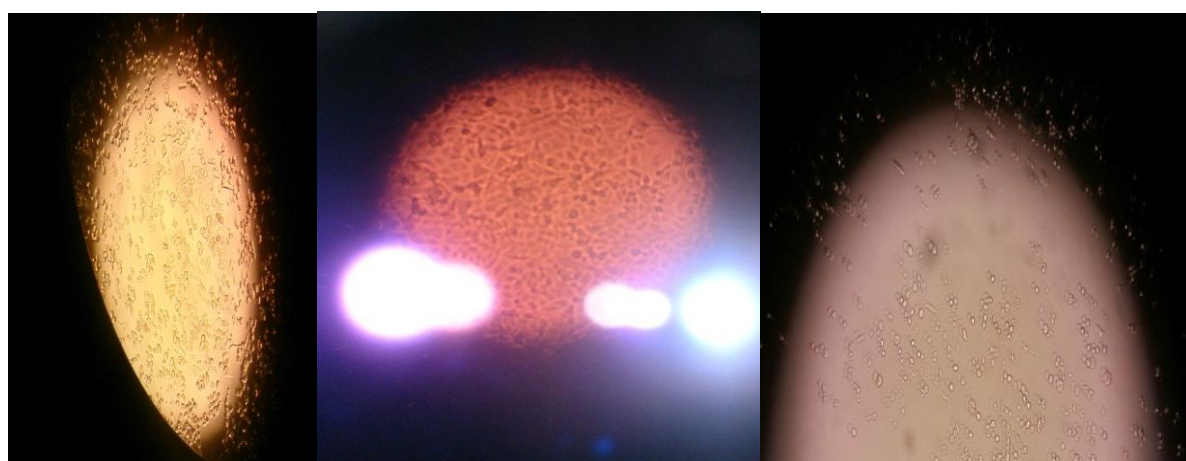
C



D

E

F



G

H

I

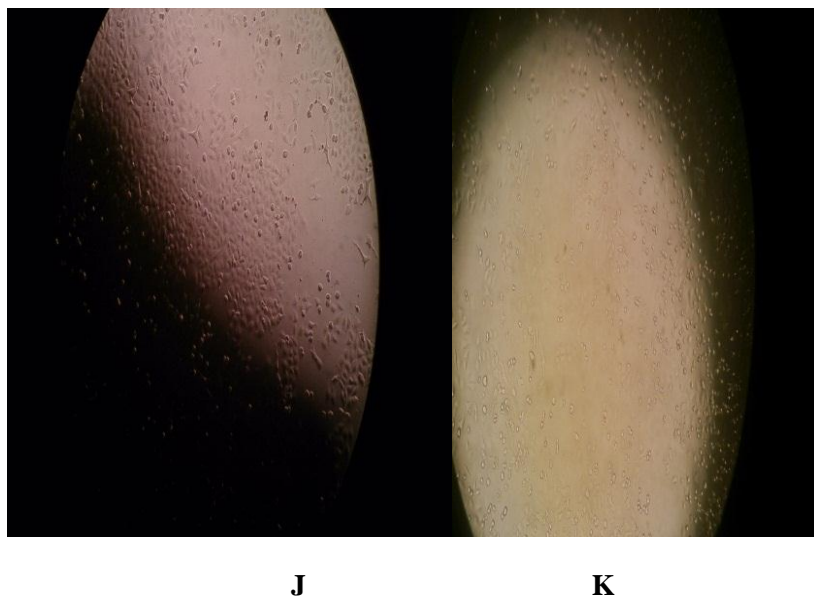


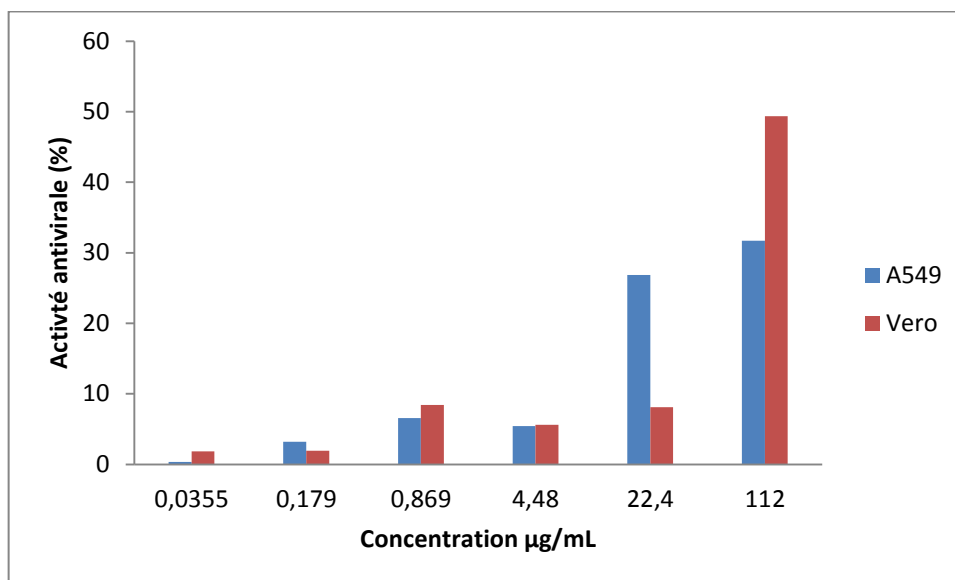
Figure 23 : Activité antivirale manifestée par la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques utilisant les cellules A549 et CVB6

- A** : Cellules A549 + caséine 112µg/mL
- B** : Cellules A549 + hydrolysats à 30 min 112µg/mL
- C** : Cellules A549 + hydrolysats à 60 min 112µg/mL.
- D** : Cellules A549 seules
- E** : Cellules A549 + CVB6 (1MOI) (100% ECP).
- F** : Cellules A549 + CVB6 (1 MOI) +caséine 112 µg/mL (59% d'ECP)
- G** : Cellules A549 + CVB6 (0.1 MOI) +caséine 112 µg/mL (95% ECP)
- H** : Cellules A549 + CVB6 (1 MOI) +hydrolysats 30 min 112 µg/mL (10% ECP)
- I** : CellulesA549 + CVB6 (0.1 MOI) +hydrolysats 30 min 112 µg/mL, (97.62 % ECP) .
- J** : Cellules A549 + CVB6 (1 MOI) +hydrolysats 60 min 112 µg/mL (47.4% ECP)
- K** : Cellules A549 + CVB6 (0.1 MOI) +hydrolysats 60 min 112 µg/mL (78.87 % ECP)

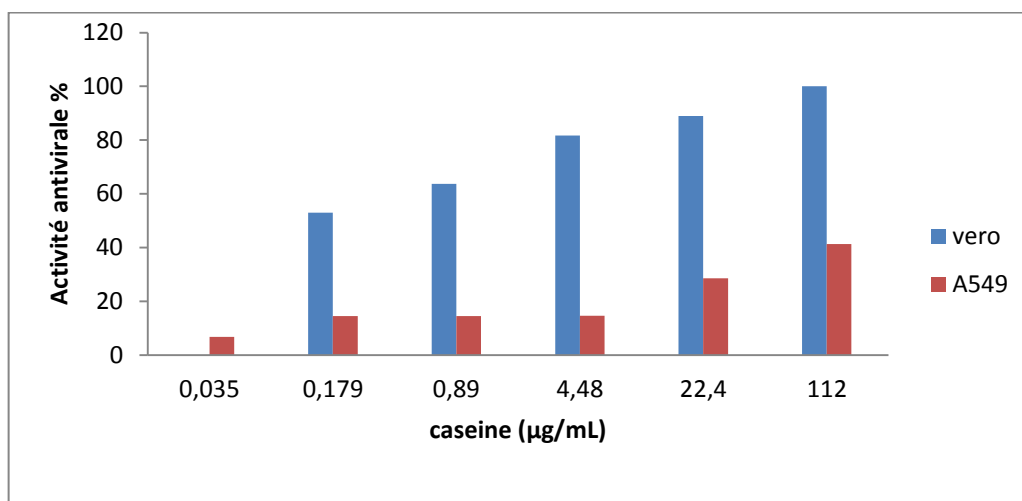
II.7.2. Activité antivirale de la caséine et ses hydrolysats

La caséine cameline a une concentration de 112µg/mL possède une activité antivirale élevée, soit 41.33 et 100% d'efficacité après incubation avec Cox B6 et 31.71 et 49.34% sans incubation avec le virus à une concentration de 1 MOI mais diminue jusqu'à 24.5 et 5.55% après incubation avec le virus et à 17,26 et 4.67 sans incubation avec celui-ci à 0.1 MOI, pour les cellules A549 et Vero respectivement (**Fig.24, 25**). L'hydrolysats de 30 min exhibe une activité antivirale, avec 90.52% d'efficacité contre Cox B6 à une concentration de 1 MOI après incubation et 23.04% sans incubation mais chute à 4.68% en non incubé, ND en incubé à 0.1 MOI avec les cellules A549 et nulles pour les cellules Vero (**Fig. 26**). L'efficacité de l'hydrolysats de 60 min à une concentration de 112µg/mL, est de 52.78 et

100% après incubation avec le virus contre 23% et 0.5% en non incubé à 1 MOI, mais diminue à 21.13 et 52.6 % en incubé et à 13.5% et 0% en non incubé avec le virus à 0.1 MOI avec les cellules A549 et Vero respectivement (**Fig. 27,28**). L'hydrolysats de 90 min montre une activité antivirale à une concentration de 112µg/mL atteignant les 100% pour les cellules Vero à 1 MOI et nulles pour les cellules A549 (**Fig. 29**). Les autres hydrolysats n'ont aucun effet significatif (**Annexe 4**).



A



B

Figure 24: Activité antivirale de la caséine cameline contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (1 MOI) ; **A** : non incubé, **B** : incubé

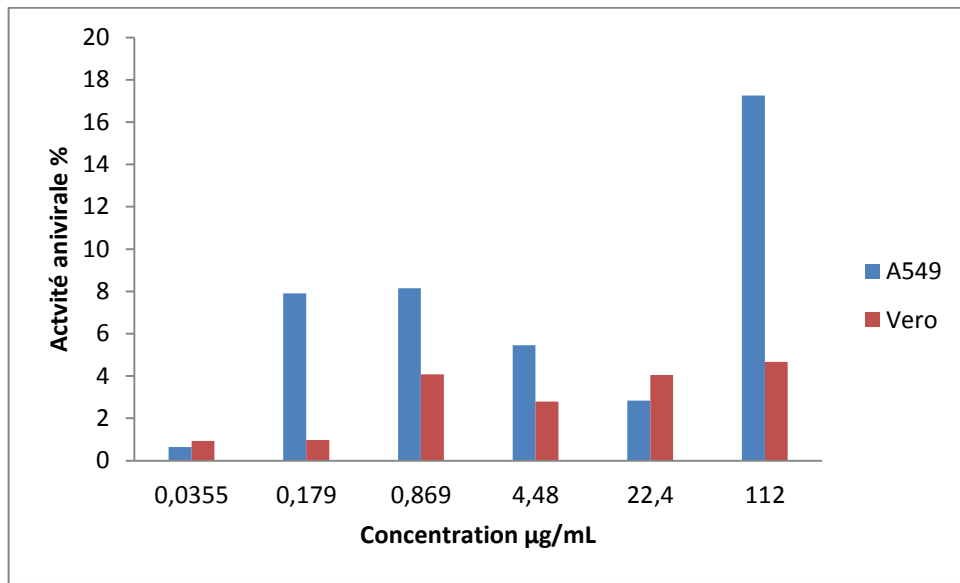
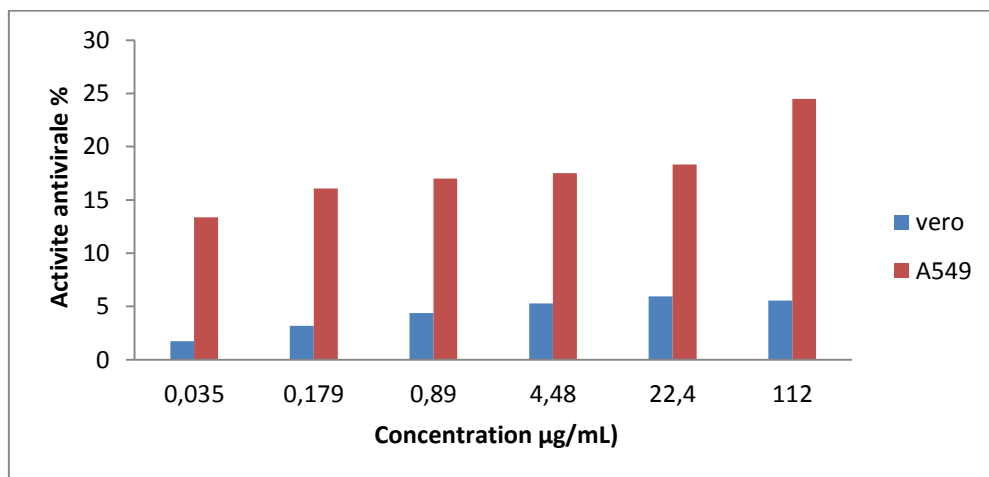
**A****B**

Figure 25: Activité antivirale de la caséine cameline contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 0.1 MOI ; **A** : non incubé, **B** : incubé

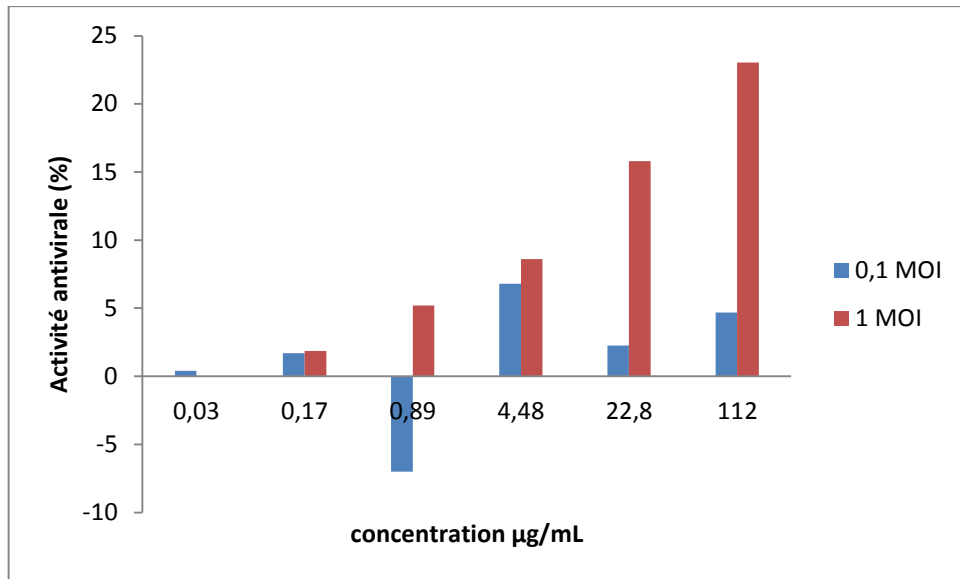
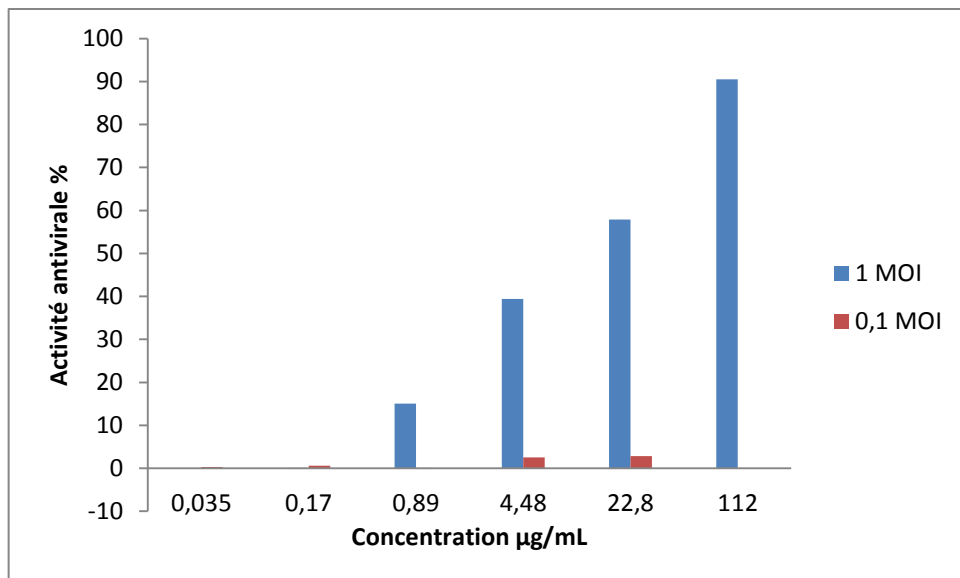
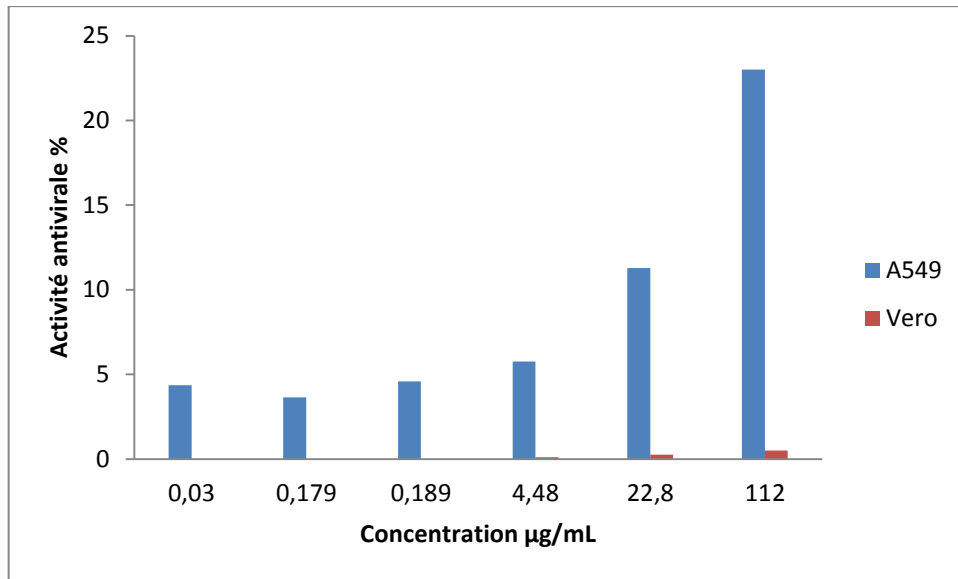
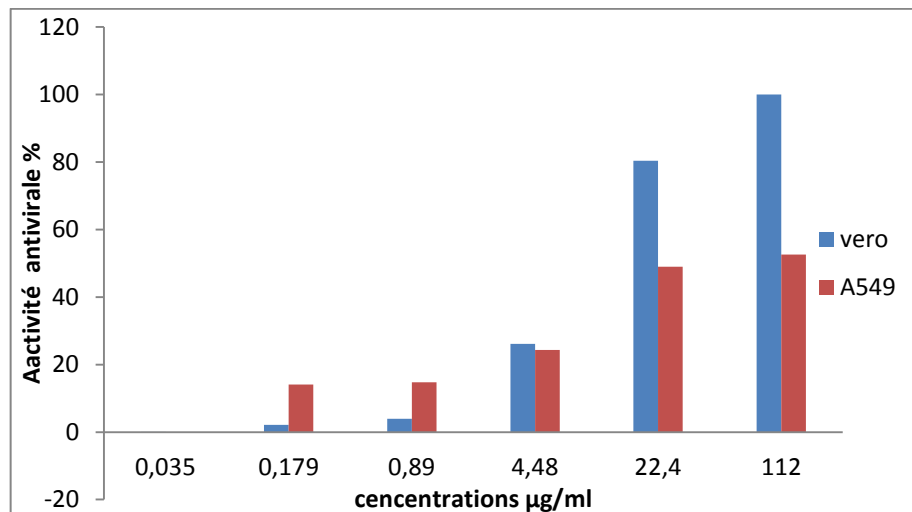
**A****B**

Figure 26: Activité Antivirale de l'hydrolysate (30 min) contre CVB6 infectant les cellules A549 (1 et 0.1 MOI) ; **A** : non incubé, **B** : incubé

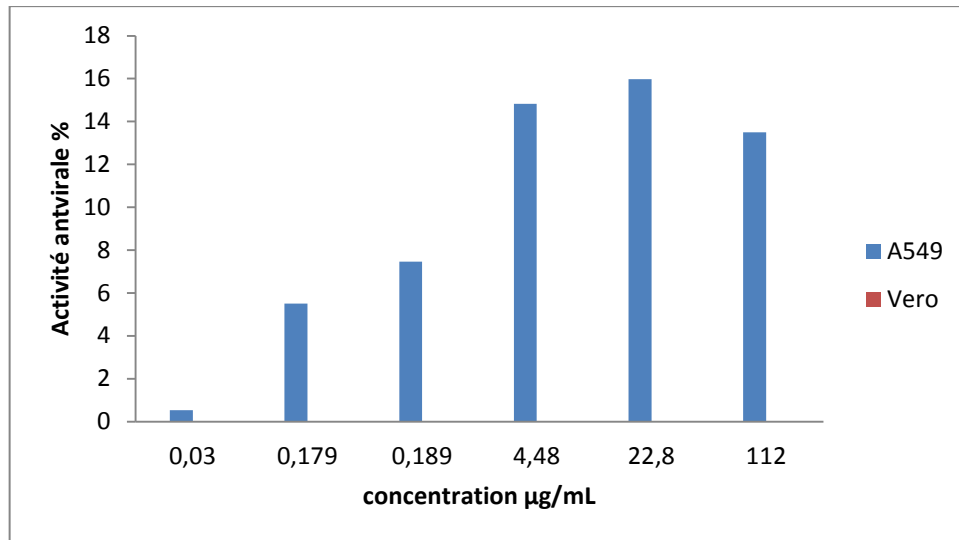


A

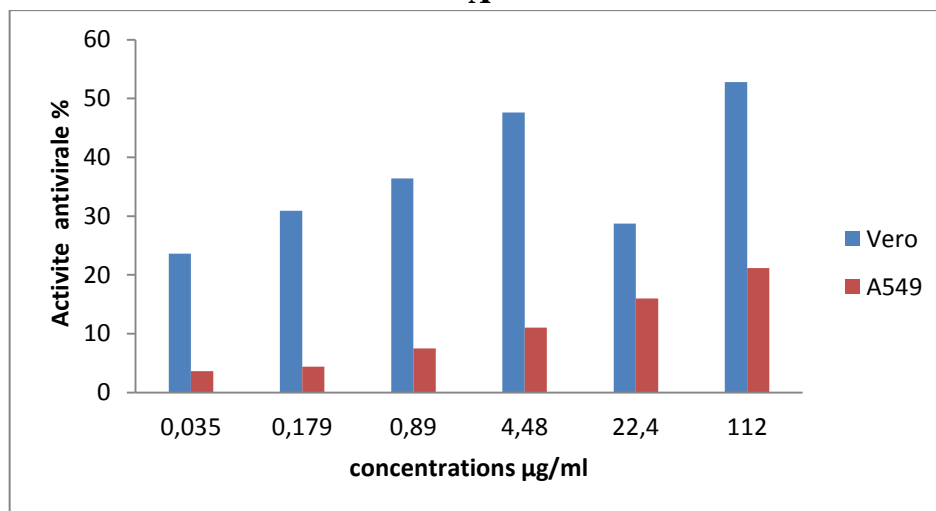


B

Figure 27: Activité Antivirale de l'hydrolysate (60 min) contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (1MOI) ; **A** :: non incubé, **B** : incubé



A



B

Figure 28: Activité Antivirale de l'hydrolysate (60 min) contre CVB6 infectant les cellules Vero et A549 (0.1MOI) ; **A** : non incubé, **B** : incubé

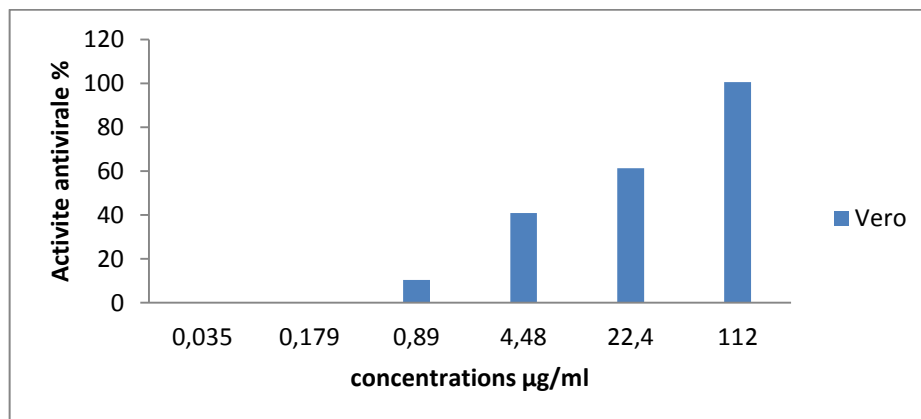


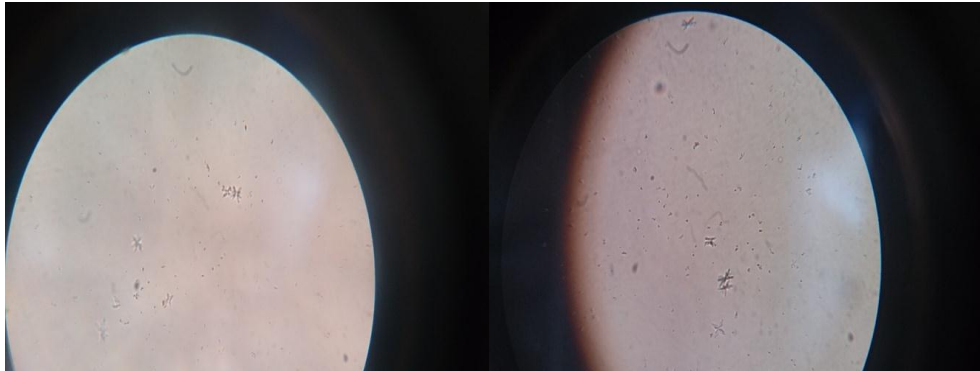
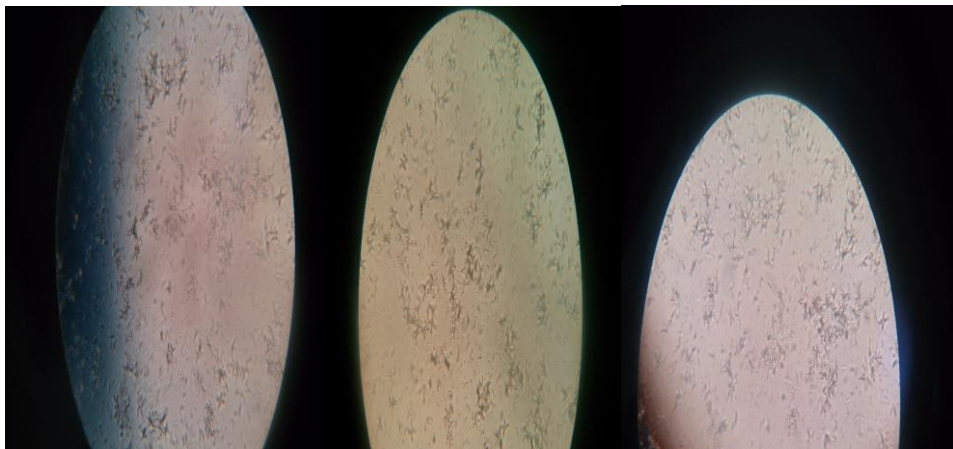
Figure 29 : Antivirale de l'hydrolysate de (90 min) contre CVB6, infectant les cellules Vero (1 MOI)

La plupart des protéines du lait, y compris la caséine, peuvent favoriser la croissance des cellules normales et cancéreuses. Une étude réalisée par **Almahdy et al., (2011)** précisait que la caséine cameline (2 mg/mL) induirait un effet cytotoxique de 30% sur les cellules HepG2 et HeLa mais pas sur les cellules PBMCs. Cependant elle ne pouvait pas bloquer l'entrée du virus de l'hépatite C, le HCV genotype-4 dans ces lignées. **Shariatikia et al., (2017)** ont étudié l'effet cytotoxique de la caséine cameline à 2 mg/mL sur les cellules MCF7, qui a atteint les 80%, le lait camelin induit des changements dans l'expression du gène apoptotique, Bax (up régulation), le gène anti-apoptotique, Bcl2, (down régulation) des niveaux du ARNm des tissus tumoraux des rats traités (**Badawi et al.,2018**). Une autres étude réalisée **Hasson et al., (2015)** sur l'effet cytotoxique du lait camelin lyophilisé sur les cellules cancéreuse du sein BT-474 et qui pouvait augmenter l'expression du marqueur du stress oxydatif, heme-oxygenase-1, et les voies apoptotiques par la ARNm caspase-3, des cellules BT-474 mais pas sur des lignées cellulaires non cancéreuses HCC1937 BL. Selon l'étude de **Bonuccelli et al., (2012)**, l' α -caséine bovine pouvait inhiber de manière significative la croissance et les métastases d'une lignée cellulaire de tumeur mammaire murine (cellules Met-1) et de deux lignées cellulaires de cancer du sein humain (cellules MCF10A-H-Ras et MDA-MB-231), par l'activation de la signalisation STAT1. L'hexa peptide PGPIP f (63-68) de la β -caséine bovine généré par la pepsine, a un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses ovariennes SKOV₃ en favorisant l'apoptose par la suppression de la voie BCL2 par contre il n'a aucun effet sur la prolifération des cellules hépatiques normale LO2 et les fibroblastes embryo murine (MEFs) sauf à une forte doses soit 3g/L (**Wang et al.,2013 b**). Une étude controversée de **Park et al., (2014)** stipule que la caséine bovine à une concentration de 1mg/mL favoriserait la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate LNCaP (166%) et PC3 (142%) par contre la prolifération des cellules normales prostatiques (RWPE-1), les (A549) et des cellules cancéreuses de l'estomac (SNU484), n'a pas été stimulée. **Homayouni-Tabrizi et al., (2016)** ont étudié l'effet cytotoxique des hydrolysats pepsiques et pancreatiques du lait camelin à une concentration de 1mg/mL mais conclu qu'ils n'ont aucun effet sur les HepG2. L'effet cytotoxique dépend des cellules utilisées qui se différencient par leur génétique, des comportements apoptotiques, viabilité cellulaire et des voies de signalisation différentes (**Chen et al., 2007 ;Dozmorov et al .,2009**). La β lactoglobuline estérifiée par l'éthanol et hydrolysée par la pepsine pendant 10h a une activité antivirale de 100% et contre le poliovirus type 1 (1.0 MOI) inoculé dans des cellules Vero, pendant 48h avec une IC50 de 20 μ g/mL et pas d'effet cytotoxique, pendant que la β lactoglobuline native n'avait aucun effet et de 100% contre le virus Coxsackie B6 (1 MOI) après incubation de 24h mais diminue à 20% après

incubation de 48h, cette activité diminue à 75% à 0.1 MOI. Ceci est expliqué par la multiplication des particules virales pendant l'extension du temps alors que la concentration de la β lactoglobuline diminue sous l'action des protéases des cellules Vero (**Sitohy et al., 2008**). Les auteurs ont conclu que l'activité antivirale de la β globuline estérifiée pourrait être due à sa charge nette positive, la compétition entre la protéine et la particule virale sur les récepteurs membranaires des cellules Vero et la perturbation de l'interaction ARN-protéine virale, d'où l'inhibition de la traduction des protéines virales. Avec CoxB6, le taux de réduction de l'ARN génomique viral a atteint 14%. D'autre part, cette activité est similaire à celle de la lactoferrine, qui interagit avec un large spectre viral, notamment les rotavirus et le poliovirus type 1, cette dernière a la capacité de se lier aux lipopolysaccharides, l'ADN et les glycosaminoglycane (**Baker, 2000**). **Redwan et Tabll (2007)** ont démontré que l'incubation des leucocytes humains PBMCs avec la lactoferrine du lait camelin puis infectée avec le VHC genotype 4 n'a pas empêché l'entrée du VHC dans les cellules, tandis que l'interaction directe entre le VHC et la lactoferrine cameline entraîne une inhibition complète de l'entrée du virus après sept jours d'incubation. Il a été rapporté que la pepsine clive les liaisons peptidiques impliquant des résidus d'acides aminés hydrophobes et aromatiques. La β -caséine cameline possède 46 sites de clivages potentiels (**Lopez- Expósito et al., 2007**). Les effets inhibiteurs antiviraux s'expliquent par l'entrée de molécules inhibitrices hydrophobes dans les cavités de liaison hydrophobes de la surface virale (**O'conel et al., 1995 ; Cox et al., 1996**), ce qui peut expliquer le blocage de l'entrée des cellules Cox B6 après 1h d'incubation par les hydrolysats et induire leur activité antivirale. Les Coxsackies virus déclenchent l'apoptose des cellules par activation de la FasL appelé aussi CD95L ou Apo-1L. ou ligand Fas protéine transmembranaire homotrimérique de la famille du facteur de nécrose tumoral qui se lie à son tour à son récepteur Fas qui déclenche ensuite une cascade de réactions : activation du signal caspase 8 puis caspase 3 menant à la fragmentation de l'ADN. (**Peischard et al., 2019**), les cellules Vero activent l'expression du mRNA du récepteur de mort Fas après 15 h suite à l'infection par le CDV-Lederle (**Del- Puerto et al., 2011**). Par contre l'expression du récepteur Fas chez les cellules A549 augmente d'une manière dose-dépendent après 6 h. (**Chang et al., 2014 b**), ce qui explique que l'expression et transcription étaient déjà activée au début de l'infection chez les cellules A549 et que l'activité de la caséine était seulement de 41% (A549) contre 100% (Vero) de même avec l'hydrolysat de 60 min avec une activité de 52,6% avec les A549 contre 100% (Vero) à 1 MOI.

II.8. Activité antilithiasique

La formation de cristaux a été suivie après incubation de 24h à pH 5 (**Fig.30**), La forme insoluble calcium oxalate monohydraté (COM) commençait déjà à se développer, au début (**Fig.30, A, B**), le PBS 2 mM utilisé comme témoin négatif n'a pas d'effet sur la formation de cristaux par contre la caséine a un effet inhibiteur (**Fig. 30, F, G, H**) et (**Fig. 31**) comparée aux hydrolysats qui sont dépourvus d'effet antilithiasique (**Fig. 32**).

**A****B****C****D****E**



F

G

H

Figure 30 : Formation de cristaux type COM ; **A, B** :avant incubation **C,D,E** : après 24h d'incubation, **F ,G, H** : incubé avec du PBS (2 mM).

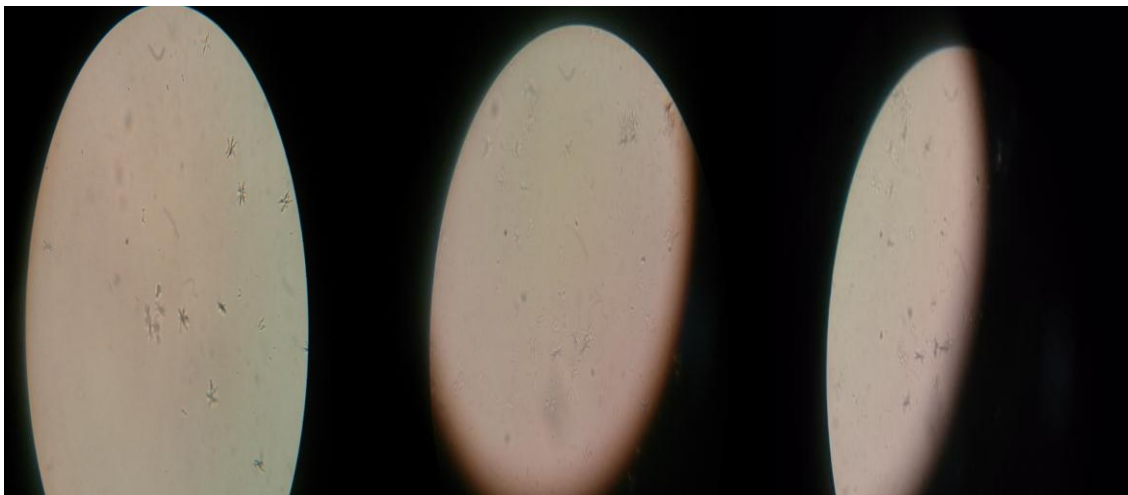
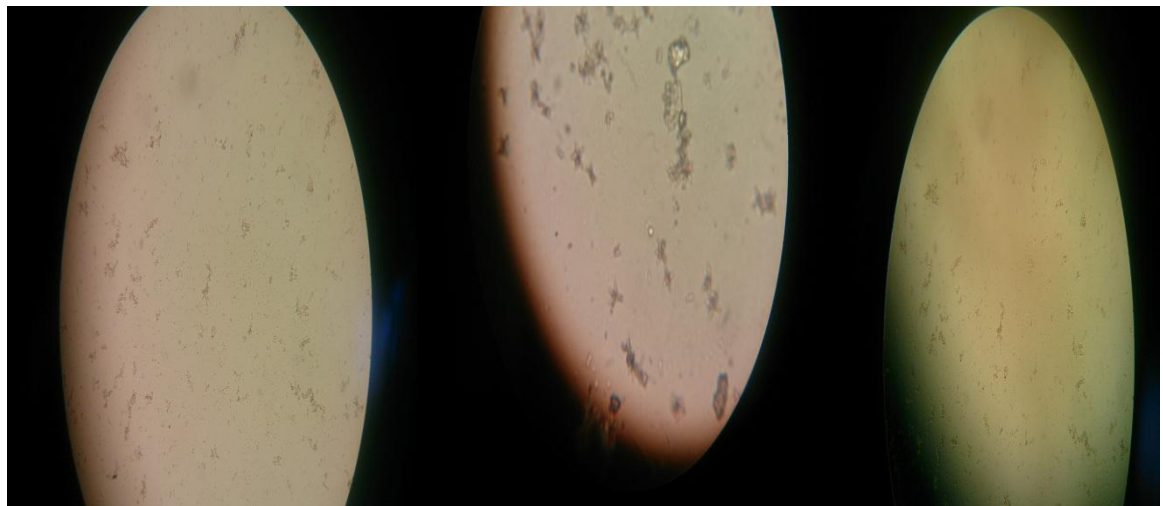


Figure 31 : Diminution de formation de cristaux après ajout de caséine cameline



A

B

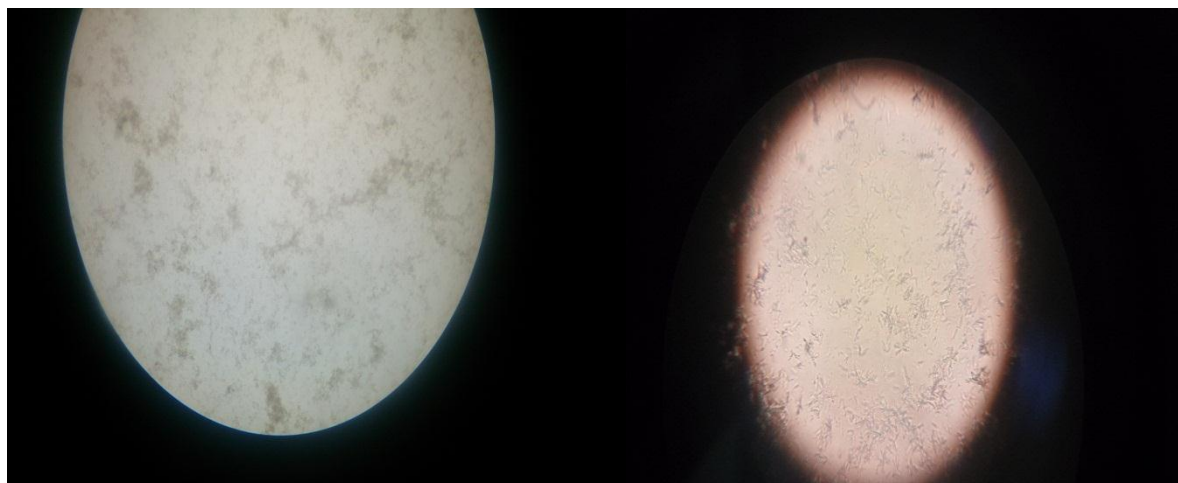
C



D

E

F



G

H

Figure 32 : Effet de l'ajout des hydrolysats sur la formation des cristaux

* A - H : hydrolysats de 15, 30, 45, 60, 90, 120,150 et 180 min.

La lithiase calcique représente plus de 80 % des lithiases urinaires. Les autres types de lithiase urinaire sont les calculs d'acide urique (10 %), les calculs infectieux (5 %) et des calculs rares (cystine, xanthine, médicamenteuses...) (**Champy et al., 2018**). La physiopathologie de la lithiase rénal est due à la sursaturation urinaire en sels lithogéniques (calcium, oxalate, urate), et au déficit des inhibiteurs de lithogénèse comme le citrate et la uromoduline appelée aussi protéine de Tamm Horsfall étant donné ses propriétés d'agrégation, elle pourrait jouer un rôle important dans la réabsorption de l'eau et des électrolytes (**Ernandez et al., 2013**). Les protéines acides riches en acide aspartique telle que l'ostéopontine inhibent la nucléation la croissance et l'agrégation des calculs (**Basavaraj et al., 2007**). Ce qui explique le pouvoir antilithiasique de la caséine cameline qui est riche en acide glutamique, ce dernier est l'acide aminé non essentiel prédominant 303 mg/g, suivi par la Pro 73 mg/g et l'acide aspartique 69 mg/g contre 218, 96 et 62 pour la caséine bovine respectivement (**Rafiq et al., 2016**).

**Conclusion
et perspectives**

Conclusion et perspectives

Le lait de chamelle collecté à la région de Laghouat, est un aliment complet, compte tenu de ses principaux paramètres physico-chimiques, il est particulièrement riche en lactose, matière grasse, protéines, et en vitamine C. La caséine cameline est le composant majeur des protéines dont la précipitation nécessite un pH plus acide (4.3) après écrémage du lait. Pour potentialiser son effet, l'hydrolyse pepsique allant de 15 à 180 min est réalisée.

Plusieurs aspects ont été visés par ce travail, le premier était d'évaluer l'activité antioxydante par spectrophotométrie de la caséine cameline et ses hydrolysats pepsiques. Le second était la mise en évidence du pouvoir antibactérien, antifongique, antiviral manifesté par la caséine et ses hydrolysats, un autre aspect était traité, il s'agit de l'effet antilithiasique.

Cette étude nous a permis de :

- Effectuer une étude physicochimique du lait camelin cru
- Précipiter la caséine et l'hydrolyser par la pepsine.
- Caractériser la caséine et hydrolysats par méthodes spectrales : RP-HPLC, ATR-FTIR.
- Evaluer les activités antioxydantes par les méthodes : la réduction du fer, le test molybdate et les méthodes du piégeage des radicaux libres en occurrence l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique ABTS•+, et du 2,2- diphenyl picryl-1- hydrazyl (DPPH).
- La mise en évidence d'activités antibactérienne et antifongique a révélé, une sensibilité des levures il s'agit de *C.parasilopsis* ATCC 22019, et *C.albicans* ATCC24433, une résistance de certaines souches bactériennes (*S.aureus* ATCC 25923), et paradoxalement une forte sensibilité d'autres souches *B.megaterium* BM 11, les autres partiellement en occurrence *S.epidermis* ATCC12228, *E.coli* ATCC 25922, *P.syringae* pv *tabaci* 1918 NCPPB, *A.baumannii* ATCC 19606. Une autre activité a été aussi étudiée, il s'agit de l'activité anti virale utilisant les cellules Vero et A549 infectées par le virus Cocksackie B6, en incubant les échantillons avec celui-ci, on a pu démontrer la présence de diverses molécules soit des peptides bioactifs libérés par hydrolyse à activité biologique différentes. Les résultats obtenus peuvent être attribués à la présence d'acides aminés enchainés dans des séquences riches en Pro, Trp, Phe,etc.

L'hydrolysats de 60 min s'est révélé le meilleur produit antiviral après la caséine tandis que les hydrolysats de 150 et 180 min ont un meilleur pouvoir antifongique, Il est probable que les fragments de ces hydrolysats contiennent en moins une Pro dans leurs séquences.....

Pour mieux valoriser la caséine cameline, et ses hydrolysats, on propose :

- L'identification des séquences peptidiques dans chaque hydrolysats, après isolement des fractions actives par des techniques de séparation adéquates,
- L'utilisation d'autres enzymes ou bien les combiner à fin de potentialiser les activités biologiques,
- L'optimisation de la possibilité d'employer ces hydrolysats dans les nouvelles formes thérapeutiques comme l'encapsulation.
- L'utilisation d'autres sources de protéines plus disponibles et facilement régénérées.

Références bibliographiques

Références bibliographies

A

- Abbas S., Ashraf H., Nazir A., Sarfraz L. (2013).** Physico-Chemical Analysis and Composition of Camel Milk. *International Research*, 2, 85-98.
- Abdel-Hamid M., Goda H.A., De-Gobba C., Jenssen H., and Osman, A. (2016).** Antibacterial activity of papain hydrolysed camel whey and its fractions. *International Dairy Journal*, 61, 91-98.
- Abd-El-Rahim A. M. (2020).** Antioxidant and Antimicrobial Activities of Enzymatic Hydrolysates of Camel's Milk Whey Protein and Casein. *J. of Food and Dairy Sci*, 11(2), 45-50
- Abu-Tarboush H.M. (1996).** Comparison of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *J. Dairy sci*, 79, 366-371.
- Adamou S., Bourennan N., Haddabi F., et Hamidouche S. (2005).** Quel rôle pour les fermes pilotes dans la préservation des ressources génétiques en Algérie? Série de documents travail n°126, ICRA, 79 p.
- Adoui F. (2014).** Peptides antimicrobiens : préparation à partir de protéines laitières, Thèse de doctorat en sciences alimentaires, institut de la nutrition, de l'alimentation et technologie agro-alimentaire INATAA, Constantine, Algérie.
- Agrawal R.P., Saran S., Sharma P., Gupta R., Kochar D.K., Sahani M.S. (2007).** Effect of camel milk on residual β -cell function in recent onset type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 77, 494-495.
- Ague K.M. (1998).** Etude de la filière du lait de chamelle (*Camelus dromedarius*) en Mauritanie. Thèse de docteur vétérinaire de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie, Université Cheikh Anta Diop (UCAD). Dakar, Senegal.
- Ageyi D., and Danquah M. (2011).** Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29 (3), 272-277.
- Ahmed A .S., El-Bassiony T., Elmalt L.M., Ibrahim H R. (2015).** Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk protein. *Food Research International*, 74, 80-88.
- Al-Haj O.A and Al-Kanhal H.A. (2010).** Compositional technological and nutritional aspects of dromedary camel milk - A review. *Int. Dairy J*, 20, 811-821.
- Alloui-Lombarkia O., Ghennam E.H., Bacha A et Abdeddaim M. (2007).** Caractéristiques physicochimiques du lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Rech. Rech. ruminants*, 14.
- Alluwaimi A.M. (2007).** The Etiology of Mycobacterium Avium Subspecies Paratuberculosis in Crohn's Disease. *Saudi Med J*, 28, 1479-1484.

Almahdy O., EL-Fakharany E.M., EL-Dabaa E., Ng T.B., Redwan E.M.(2011). Examination of the Activity of Camel Milk Casein against Hepatitis C Virus (Genotype-4a) and Its Apoptotic Potential in Hepatoma and HeLa Cell Lines, *Hepat Mon.* , 11(9),724-730.

Almi-Sebbane D., Adt I, Degraeve P, Jardin J, Bettler E, Terreux R, Oulahal N, Mati A.(2018). Casesidin-like anti-bacterial peptides in peptidic hydrolysate of camel milk casein. *International dairy journal*, 86,49-56.

Al-Shamsi K.A., Mudgil P., Hassan H.M., Maqsood S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in vitro and in food model systems. *J Dairy Sci*, 101(1) ,47-60.

Anonyme-1. (2006). Evolution des effectifs du cheptel de 1990 à 2005. Direction des statistiques Agricoles, Ministère de l'Agriculture, Algérie.

Anonyme -2. (2020). https://web.expasy.org/peptide_cutter/ operated by SIB Swiss Institute of Bioinformatics.

Aravodis E. (2005). Antioxidant potential of African medicinal plants; African journal of biotechnology, 4(2),128-133.

Attia H., and Kherouatou N. (2001). Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *J .Ind.Microbiol Biotechnol*, 26,263–270.

B

Badawi A.A., El –Magd M.A., Al-Sadra S.A.(2018). Therapeutic Effect of Camel Milk and Its Exosomes on MCF7 Cells In Vitro and In Vivo. *Integr Cancer ther*, 17(4),1235-1246.

Baker E.N .(2000). Lactoferrin three-dimensional structure: a framework for interpreting functions in K Shimazaki (Eds) Lactoferrin: Structure, Function and Applications .Elsevier Science, Amsterdam, 3–15.

Banga-Mboko H., Godeau J.M., Drion P.V., El- Amiri B., Drion V., Perenyi Z., Sousa N.M. ., Beckers J.F. (2002). Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc.1. Historique, physiopathologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Ann. Méd. Vét*, 146, 339-346.

Basavaraj D.R., Biyani C.S., Browning A.J. ,Cartledge J.J.(2007). The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones .EAU-EBU Update Series, 5(3) ,126-136.

Ben-Aissa R. (1989). Le dromadaire en Algérie. CIHEAM-IAMZ, Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens n° 2. p. 19-28.

Bengoumi M., Faye B., et Tressol J.C. (1994). Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.

- Birkemo G.A. , Sullivan O.O., Ross R.P. Hill C.(2009).** Antimicrobial activity of two peptides caseicin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *J Appl Microbiol*, 106 (1), 233-40.
- Bocquet E.G.H. (2006).** Isolement du pepsinogène équin. Thèse de doctorat vétérinaire. La faculté de médecine de Creteil. Ecole nationale veterinaire d'Alfort. 90p
- Bonuccelli G., Castello-Cros R., Capozza F., Martinez-Outschoorn U.E., Lin Z., Tsirigos A., et al.(2012).** The milk protein α -casein functions as a tumor suppressor via activation of STAT1 signaling, effectively preventing breast cancer tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*,11, 3972–3982.
- Bouhaddaoui S., Chabir R., Errachidi F., El –Ghadraoui L., El Khalfi B.,and Benjelloun M.(2019).** Study of the Biochemical Biodiversity of Camel Milk.*The Scientific World Journal*,7.
- Boudjenah-Haroun S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques Université Mouloud Mammeri De Tizi Ouzou.
- Bounous G. (2000).** Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Research*, 20, 4785-4792.
- Bourdanne A. (1998).** L'élevage du dromadaire au Mali: approche socio-économique et culturelle. Thèse de Docteur vétérinaire. Ecole Inter-états Des Sciences Et Médecine Vétérinaires De Dakar. Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Mali, 95p.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., and Berset C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol* ,28 , 25–30.
- Buonopane G.J., Kilara A., Smith J.S., McCarthy R.D. (1992)** .Effect of skim milk supplementation on blood cholesterol concentration, blood pressure, and triglycerides in a free-living human population. *J Am Coll Nutr*, 11,56–67.

C

- Cayot P., Lorient D. (1998).** Structure et technofonctions des protéines du lait, Lavoisier Editeur / tec et doc, France ,6p.
- Cervato G., Cazzola R., Cestaro B. (1999).** Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International J. Food Sci. Nutr*, 50, 291-6.
- Chadefaux C., Le Hô A.S., Bellot-Gurlet L.,Reiche I .(2009).**Curve-fitting Micro-ATR-FTIR studies of the amide I and II bands of type I collagen in archaeological bone materials. *E Preservation Sciences(e-PS)*, 6, 129-137.

- Champy C., Traxer O., Mozer P. (2018).** Lithiase urinaire. Néphrologie ,8^{ème} édition Institute des textes et manuscrits modernes.Item N°262). http://cuen.fr/manuel/IMG/pdf/22-nephrologie_8e-edition_chap22.pdf
- Chang K., Seol H., Jeong G., Oh H., Park Y., Perrin C., and Ham S. (2013).** Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science*, 96, 5544-5555.
- Chang O.K., Ahoefa Ablavi Awussi A.A., Annie Dary A, et al. (2014 a).** Use of a free form of the *Streptococcus thermophilus* cell envelope protease PrtS as a tool to produce bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 38(2),104-115.
- Chang W., Lin E., Tsai M., Huang M., Kuo P.(2014 b).**"Isolinderalactone inhibits proliferation of A549 human non-small cell lung cancer cells by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase and inducing a Fas receptor and soluble Fas ligand-mediated apoptotic pathway". *Molecular Medicine Reports*, 9(5), 1653-1659.
- Chatterton D.E.W., Smithers, G., Roupas, P., and Brodkorb, A. (2006).** Bioactivity of p-lactoglobulin and α -lactalbumin-technological implication for processing. *International Dairy Journal*, 16, 1229-1240.
- Chen K.C., Peng C.C., Peng R.Y., Su C.H., Chiang H.S., Yan J.H., et al. (2007).** Unique formosan mushroom *Antrodia camphorata* differentially inhibits androgen-responsive LNCaP and -independent PC-3 prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 57, 111-21.
- Cherifi Y. A., Gaouar S.B.S., Guastamacchia R., El-Bahrawy K.A., Mohammed Aly Abushady A., Sharaf AA., Harek D., Lacalandra G.M., Saïdi-Mehtar N., and Elena Ciani E .(2017).**Weak Genetic Structure in Northern African Dromedary Camels Reflects Their Unique Evolutionary History, *PLoS One*, 12,1.
- Cheung H.S., Wang F. I., Ondetti M. A., Sabo E. F. and Cushman D. W. (1980).** Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J. Biol. Chem*, 225, 401-407.
- Clausen M.R., Skibsted L.H. and Stagsted J.(2009).** Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *J. Agric. Food Chem*, 57, 2912-9.
- Colbert E. H .(1935).** Siwalk mammals in the American museum of Nature History. *Transaction of the American Philosophical Society*, 26, 1-401.
- Comhair S.A.A., Erzerum S.C.(2002).** Antioxidant response to oxydant-mediated lung diseases. *Am Physiol Lung cCell mMol Physiol*, 283:246-255.
- Contreras M.M., Sevilla M.A., Monroy-Ruiz J., Amigo L, Gómez-Sala B, Ramos M., Recio I. (2011).** Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. *International Dairy Journal*, 21, 470-476.

Correra A. (2006). Dynamique de l'utilisation des ressources fourragères par les dromadaires des pasteurs nomades du parc national du banc d'Arguin (Mauritanie) .Thèse de doctorat en écologie et gestion de la biodiversité. Muséum national d'histoire naturelle .Paris, France.

Cox S., Buontempo P.J., Wright-Minogue J., de Martino J.L., Skelton A.M., Ferrari E. (1996). Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogues: *In vitro* and in vivo studies. *Antiviral Res*, 32, 71-79.

Cumby N., Zhong Y., Nacz M., Shahidi F.(2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem* , 109 (1),144–148.

D

Dagleish D.G., Spagnuolo P.A. and Goff H.D. (2004).A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. *International Dairy Journal*, 14, 1025-1031.

Del- Puerto H.L., Martins A.S., Braz G.F., Alves F., Heinemann M.B., Rajão D.S., Araújo F.C., Martins S.F., Nascimento D.R., Leite R.C., Vasconcelos A.C.(2011). Vero cells infected with the Lederle strain of canine distemper virus have increased Fas receptor signaling expression at 15 h post-infection. *Genet Mol Res*, 10(4), 2527-33.

Desmier T. (2016).Les antioxydants de nos jours: definition et applications. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Limoges.France.

Devaux C., Osman I.O., Million M., Raoult D.(2020).Coxiella burnetii in Dromedary Camels (*Camelus dromedarius*) : a possible threat of humans and livestock in north Africa and the Near and Middle east.*Front. Vet.Sci*,7,558481.

De -Wit J.N. (1989). Fonctionnal properties of whey proteins. In: Development in dairy chemistry- Functional milk proteins. Editor Fox P.F., Londres: Elsevier Applied Science, 285-321p.

Dilmi- Bouras A. (2008). Filière lait : Exemple de l'Algerie, Séminaire international: Filière lait : Productions et Biotechnologies le 02 et 03 décembre, Chlef , Algerie.

Dozmorov M.G., Hurst R.E., Culkin D.J., Kropp B.P., Frank M.B., Osban J., et al.(2009). Unique patterns of molecular profiling be-tween human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. *Prostate*,69, 1077-90.

Dziuba B., Dziuba M.(2014) Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 13(1), 5-25.

E

El-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P. and Assaf R.(1992).Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective protein. *J. Dairy Res*, 59, 169-175.

El - Agamy E.I., Abou – Shloue Z.I., Abdel –Kader Y.I.(1997). A comparative study of milk proteins from different species. II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships. Proceeding of the 3rd Alexandria Conference of Food Sc. Tech, March 1-3; Alexandria, Egypt. In: Young WP. Ed. Wiley and Sons, 440 -162.

El- Agamy E.I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food chemistry*, 68,227-232.

El-Hatmi H., Levieux A. and Levieux D. (2006). Camel (*Camelus dromedarius*) immunoglobulin G, α - lactalbumin, serum albumin and lactoferrin in colostrum and milk during the early post partum period. *J. Dairy Res*, 73, 1-6.

Elias R.J., Mc-Clements D.J., and Decker E.A .(2005) .Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53,10248–10253.

Elias R.J., Kellerby S.S and Decker E.A .(2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* ,48, 430–441.

Ellegård K.H., Gammelgård-Larsen C., Sørensen E.S., Fedosov S.(1999). Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *Int Dairy J*, 9 (9), 639–52.

El-Rashdi M.R and Tball A.(2007).Camel lactoferrin markedly inhibits *hepatitis C* virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes.*J Immunology assay and immunochemistry*, 28,267-277.

Ernandez T., Stoermann Chopard C., Bonny O., Iselin C., Martin P.Y., Jaeger P.(2013). Approche pratique de la lithiase rénale : duo entre généralistes et spécialistes. *Rev Med Suisse* ,9, 456-461.

F

Faizullin D.A., Konnova T.A., Haertle T., Zuev YF .(2013). Self- Assembly and Secondary Structure of Beta Casein. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 399(4), 366–372.

Farah Z., and Bachmann M.R.(1987). Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42 , 689- 692.

Farah Z., and Rüegg M.W. (1989). The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstruct*, 8 ,211-116.

Farah Z., Rettenmaier R. et Atkins D. (1992). Vitamin content of camel milk. *Internat. J. Vitam. Nutr. Res*, 62, 30-33.

Farah Z.(1993). Composition and characteristics of camel milk. *J. Dairy. Res*, 60, 603-626.

Farah Z. (2011) .Camel milk, in Encyclopedia of Dairy Sciences, 2nd ed Editor –in- chief ,512-517p.

Farrell H.M. Jr., Wickham E.D., Unruh J.J., Qi P.X., and Hoagland P.D. (2001). Secondary structural studies of bovine caseins: Temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. *Food Hydrocoll*, 15,341–354.

Faye B. et Mulato O.C. (1991). Facteurs de variation des paramètres protéo-énergétiques,enzymatiques et minérales chez le dromadaire de Djibouti. *Rev. Elev. Méd. Vét. des Pays Trop*, 44, 325-334.

Faye B., Konuspayeva, G., Loisean, G. (2010). Variability of urea concentration in camel milk in Kazakhstan, *Dairy Science and Technology*, 90, 707-713.

Faye B. (2014). The Camel today: assets and potentials. *Anthropozoologica* ,49 (2), 167-176.

Fázio -Oliveira V. J., Bulet P., Miranda 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.

Feliachi K. (2003). Points focal algérien pour les ressources génétiques. Rapport National sur les ressources génétiques animales: Algerie ,29-30 p.

FitzGerald R.J., and Meisel H.(1999). Lactokinins: Whey protein-derived ACE inhibitory peptides. *Nahrung* , 43(3),165-7.

G

Galali Y, Al-Dmoor H.M (2019) .Miraculous Properties of Camel Milk and Perspective of Modern Science. *J Fam Med Dis Prev* ,5,095.

Gherrissi D.E., Monaco D., Bouzebda Z., Bouzebda-Afri F., Gouar S.B.S., Ciani E.(2020).Camels herds' reproductive performance in Algeria : Objectives and thresholds in extreme arid conditions. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(7),482-491.

Gnan S.O., Sheriba A.M. (1986). Composition of Libyan camel milk. *J Dairy Technol*, 41(1), 33–35.

Gobbetti M., Minervini F., and Rizzello C. G. (2004). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactivepeptides. *International Journal of Dairy Technology*,57, 173–88.

Graham E.R.B., Malcolm G.N, and. McKen-zie H.A.(1984).On the isolation and conformation of bovine β -casein A1.*Int.J.Biol.Macromol*,6,155

Gul W., Farooq N., Anees D., Khan U., Rehan F. (2015) .Camel Milk: A Boon to Mankind. *Int .J. Res. Stud .Bio.sci* ,3, 23-29.

H

Habib H. M., Ibrahim W.H., Schneider-Stock R., and Hassan H.M.(2013). Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities. *Food Chem*, 141, 148-152.

Haddadin M.S., Gammoh S.I., Robinson R.K .(2008) .Seasonal Variations in the Chemical Composition of Camel Milk in Jordan. *J. Dairy. Res*, 75 (1), 8-12.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P.(2007).Le stress oxidant, *Rev Med Liege*, 62 (10) , 628-638.

Hamad E. M., Abdel-Rahim E.A., and Romeih E.A.(2011). Beneficial effect of camel milk on liver and kidneys function in diabetic Sprague-Dawley rats. *Int. J. Dairy Sci*, 6, 190-197.

Hasson S.S., Al-Busaidi J.Z., Al-Qarni Z.A., Rajapakse S., Al-Bahlani S., Idris M.A., Sallam T.A.(2015). *In Vitro* Apoptosis Triggering in the BT-474 Human Breast Cancer Cell Line by Lyophilised Camel's Milk. *Asian Pac J Cancer Prev*,16 (15),6651-61

Hjort- af -Ornäs.A. (1988). Sustainable subsistence in arid lands: the case of camel rearing. Dans Hjort af Ornäs (éd.), *Camels in development*. SIAS, Uppsala, Suède.

Holt C.(1992). Structure and stability of bovine casein micelle. *Adv. Prot. Chem.* 43, 63.

Homayouni-Tabrizi M., Shabestarin H., Asoodeh A., and Soltani M. (2016). Identification of two novel antioxidant peptides from camel milk using digestive proteases: Impact on expression gene of superoxide dismutase (SOD) in hepatocellular carcinoma cell line. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 22, 187-195.

Huang S.M., Chen K.N., Chen Y.P., Hong W.S. and Chen M.J.(2010). Immunomodulatory properties of the milk whey products obtained by enzymatic and microbial hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1061-1067.

Hwang J.Y., Shyu Y.S., and Hsu C.K.(2009). Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream. *LWT- Food Sc. Tech*, 42 (1), 312–318.

I

J

Jackson J.G., Lien E.L., White S.J., Bruns N.J., and Kuhlman C.F. (1998). Major carotenoids in human milk: longitudinal and diurnal patterns. *Nutr. Biochem.* 9, 2–7.

Jacquot A. (2007). Etude de l'activité immunomodulante de peptides issus des protéines du lactosérum bovin. Mémoire présenté dans le cadre de programme de maîtrise en sciences et technologie des aliments. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université Laval. Québec. Canada

Jamdar S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar M.D., Juan F., Yardi, V., Sharma A.(2010). Influence of 713 degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of 714 peanut protein hydrolysate. *Food Chem.* 121, 178–184.

Jameson G.B., Adams J.J., and Creamer L.K. (2002). Flexibility, functionality and hydrophobicity of bovine β -lactoglobulin. *International Dairy Journal*, 12, 319-329.

Jeyaragavan T.(2001).Effect of genetic variants on hydrolysis of β -casein by chymosin and pepsin monitoring. Thesis submitted to the faculty of graduate studies and research in partial fulfillment of the requirement of the degree of masters of science McGill university, Monreal, Canada, 33- 34 p.

Jolles P., Alais C., Jolles j. (1962). Amino acid composition of K-casein and terminal amino acids Of K-casein and para K-casein. *Archive of Biochem. And Biophysics*,98 (1), 56- 57.

Jollés P., and Caen J.P. (1991). Parallels between milk clotting and blood clotting: opportunities for milk-derived products. *Trends Food Sci Technol.*2,42-43.

Jouan, P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. Edition INRA, Paris, 127 p.

Jrad Z., Girardet J.M., Adt I., Oulahal N., Degraeve P., Khorchani T., El -Hatmi H.(2014).Antioxidant activity of camel milk casein before and after *in vitro* simulated enzymatic digestion. *Mljekarstvo*, 64 (4), 287-294.

Jrad Z., El -Hatmi H., Adt I., Khorchani T., Degraeve P., et al.(2015). Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria*, 44 (4), 609-616

Jrad Z., Oussaief O., Khorchani T., El Hatmi H.(2020). Microbial and enzymatic hydrolysis of dromedary whey proteins and caseins: techno-functional, radical scavenging, antimicrobial properties and incorporation in beverage formulation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14,1.

K

Kamoun M. (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Option Médit*, 13, 81-103.

Kappeler S., Farah Z. and Puhan Z. (1998). Sequence Analysis of Camelus dromedaries milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65, 206-222.

Kappeler S.(1998). Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph.D.Diss. ETH No. 12947, Zurich, 12 p.

- Kappeler S., Ackerman M., Farah Z., and Puhan Z. (1999).** Sequence analysis of camel (Camelus dromedaries) lactoferrine. *international Dairy journal*, 9, 481-486.
- Kappeler S., Farah Z., and Puhan, Z. (2003).** 5'-Flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal of Dairy Science*, 86, 498-508.
- Karaki H., Doi K., Sugano S., Uchiwa H., Sugai R., Murakami U., and Takemoto S. (1990)** .Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol*, 96, 367-371.
- Kaskous S. (2016).** Importance of camel milk for human health. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(3), 158-163.
- Kaskous S. (2019).** Camel Milk Composition, Udder Health and Effect of Different Storage Times and Temperatures on Raw Milk Quality Using Camel Milking Machine "StimuLactor". *Agriculture and Food Sciences Research* , 6, 2, 172-181.
- Kayser H., and Meisel, H. (1996).** Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Letters*, 383, 18-20.
- Kedare S.B., Singh R.P. (2011).** Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*, 48(4), 412-422.
- Khaskheli M., Arain M.A., Chaudhry S., Soomro A.H., Qureshi T.A. (2005)** .Physico-chemical quality of camel milk. *J .Agric .Soc .Sci*, 2, 164–166.
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F. (2007).** Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem*, 102, 1317–1327.
- Kohler-Rollefson I.U. (1991).** Camelus dromedarius, *Mammalian Species* , 375, 2.
- Konuspayeva G., (2007).** Variabilité physico-chimique et biochimique du lait des grands camelides (*Camelus bactrianus*, *camelus dromedaries* et hybrides) au Kazakhstan. Thèse de doctorat, université de Montpellier II. France, 255p.
- Konuspayeva G., Faye B., and Loiseau G. (2009)** .The composition of camel milk: a meta analysis of the literature data. *J .of. F. Comp. and Anal*, 22, 95-101.
- Korashy H.M., Maayah Z.H, Abd-Allah A.R., El-Kadi A.O.S., and Alheider A.A. (2012).** Camel milk triggers apoptotic signaling pathways in human hepatoma HepG2 and breast cancer MCF7 cell lines through transcriptional mechanism. *J. Biomed. Biotechnol* , 593195.
- Korhonen H., Pihlanto A. (2003).** Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des*, 9(16), 1297-308.

Kula J., Dechasa T. (2016). Chemical Composition and Medicinal Values of Camel Milk *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 4 (4), 13-25.

kumar S., Teotia U.V.S., Sanghi A.(2013) .antioxidative property of cow milk caseinates hydrolyzed with different proteases *.Int j pharm pharm sci*, 5 (2), 418-422.

Kumar D., Chatli M.K., Raghvendar S., Mehta N., Kumar P. (2016 a). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Rumin Res* 139,20–25.

Kumar D., Chatli M.K., Raghvendar S., Mehta N., Kumar P .(2016 b).Effects of incorporation of camel milk casein hydrolysate on quality, oxidative and microbial stability of goat meat emulsion during refrigerated ($4 \pm 1_C$) storage. *Small Rumin Res*, 144, 149–157.

Kumar D., Chatli M.K., Raghvendar S., Mehta N., Kumar P.(2016 c). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties *.Dairy Sci. and Technol*, 96,391–404.

Kumar D., Chatli M.K., Raghvendar S., Mehta N., Kumar P. (2017) . Antioxidant and antimicrobial activity of ultra-filtered fractions of camel milk protein hydrolysates under in-vitro condition. *Indian Journal of Animal Sciences*, 87 (11),1391–1395.

L

Laemmli U.K. (1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

Lahart N., O’Callaghan Y., Aherne A.S., O’Sullivan D., FitzGerald R. J., and O’Brien, N. M. (2011). Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: Evaluation using the human Jurkat T cell line. *International Dairy Journal*, 21, 777–782.

Lahov E., and Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food. Chem.Toxicol*, 34, 131–145.

Lapointe-vignola C.(2002). Science et technologie du lait transformation du lait. Fondation de technologie laitière du quebec. Presses inter Polytechnique, 54- 600 p.

LARES :Laboratoire d’Analyse Régionale et d’Expertise Sociale.(2015). Capitalisation d’expériences de collecte et de mise en marché du lait local par des organisations d’éleveurs pastoraux et agropastoraux. Expériences de la Mauritanie. 14p

Leonil J. (2000).Valeur santé des protéines laitières : Peptides à activité biologique. *Commission Bovine* ,INRA,15-18p.

Li H., Papadopoulos V. (1998). Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition/interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology* ,139,4991–4997.

Linn J G.(1988).Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows
National Research Council (US) Committee on Technological Options to Improve the
Nutritional Attributes of Animal Products.Washington (DC): National Academies Press (US).

Lopez- Expósito I., Quirós A., Amigo L., Recio I. (2007). Casein hydrolysates as a source of
antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides *Lait*, 87, 241-249.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.(1951). Protein measurement with
folin-phenol reagent. *Jr Biol Chemistry*,193 (1), 265-275.

Ludtke S. J., He K., Heller W.T., Harroun T.A., Yang L., and Huang H.W.(1996).
Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, 35, 13723-8.

Luo Y., Pan K., Zhong Q.(2014). Physical, chemical and biochemical properties of casein
hydrolyzed by three proteases: Partial characterizations .*Food Chemistry* ,155 , 146–154.

M

Makhlouf M., Montaigne E. et Tessa A. (2015). La politique laitière algérienne : entre
sécurité alimentaire et soutien différentiel de la consommation, *NEW MEDIT*, 14 (1), 12-23.

Makinen-Kijunen S. and Palosne, T. (1992) .A sensitive enzyme-linked immunosorbent
assay for determination of bovine beta-lactoglobulin in infant feeding formulas and human
milk, *Allergy*, 47, 347-352.

Mal G., SuchitraSena D., Jain V.K., Sahani M.S. (2006) .Therapeutic value of camel milk
as a nutritional supplement for multiple drug resistant (MDR) tuberculosis patients. *Isr J Vet
Med* , 61(3–4),88–94

**Marino V. M., Schadt I., Terra S.L., Manenti M., Caccamo M., Licitra G., Carpino S
(2012).**Influence of season and pasture feeding on the content of α -tocopherol and β -carotene
in milk from Holstein, Brown Swiss and Modicana cows in *Sicily Dairy Sci.and Technol*,
92,501–513.

Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N., and Suzuki H. (1985) .Angiotensin
I-converting enzyme inhibitor derived from and enzymatic hydrolysate of casein. Isolation and
bradykinin-potentiating activity on the uterus of the ileum of rats. *Agric.Biol. Chem*, 49,
1405-1409.

Maruyama S., Mitachi H., Tanaka H., Tomizuka N., and Suzuki H. (1987) .Studies of
the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme
inhibitors derived from casein. *Agric. Biol. Chem* ,51, 1581-1586.

Marx V. (2005). Watching peptides grow up. *Chem Eng News* ,83(11),17–24.

Matharu B.S. (1966). Camel care. *Indian Farming*, 19, 16-22.

Matsuzaki K., Murase O., and Miyajima K. (1995). Kinetics of pore formation by an
antimicrobial peptide, magainin 2, in phospholipid bilayers. *Biochemistry* , 34(39), 12553-9.

Mehaia M.A., and Al-Kanhal M.A. (1992). Taurine and free amino acids in milk camel, goat, cow and man. *Milchwissenschaft*, 47, 351-353.

Mehaia M.A. (1994): Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. *Food Chem*, 50, 153-155.

Meisel H., and Frister H. (1989). Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein, *J Dairy Res*, 56, 343-349.

Mercier J.C., brignon G ., Ribadeau- Dumas B.(1973) . Structure primaire de la caséine k bovine séquence complète. *Eur.j biochem* ,35, 222-235.

Milardovic S., Ivekovic D., Rumenjak V., Bozidar S.G. (2005). Use of DPPH./DPPH redox couple for biamperometric determination of antioxidant activity. *Electroanalysis*,17(20),1847–1853.

Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., GopinathanV., Milner A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates .*Clin Sci .(Lond)* ,84(4),407-12

Mohamed M.A., and Larsson-Raznikiewicz M. (1989). Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, 44 (5), 278-280.

Mohamed H.E., Mousa H.M., Beynen A.C.(2005). Ascorbic acid concentrations in milk from Sudanese camels. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nut*, 89,35-37.

Mohanty D.P., Mohapatra S., Misra S. (2016).Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 577–583.

Morfin F., et Frobert E. (2008).Evaluation d la sensibilité des virus herpès simplex à l'acyclovir. Laboratoire de virologie. Lyon, France.

Mukassa Mugerwa E. (1985).Le chameau (*Camelus dromedarius*) : Étude bibliographique. CIPEA, Addis-Abeba,2p.

Mullaicharam A. R. (2014). A review on medicinal properties of camel milk. *World J. Pharm. Sci*, 2(3), 237-242.

N

Nguyen S. D., Jeong T. S., Kim M. R., Sok D.E.(2009). Broad-spectrum antioxidant peptides derived from His residue-containing sequences present in human paraoxonase 1.*Free Radical Research*, 40, 349-358.

O

Ochoa T.J., and Cleary T.G. (2009). Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* ,91,30–34.

Ochirkhuyag B., Chobert J.M., Dagalarrondo M., Choiset Y. and Haertle T. (1997). Characterization of caseins from Mongolian yak , Khainak and Bactrian camel. *Lait*, 77, 601-613.

O’Connell J.F. , Albin R., Blum D., Grint P., Schwartz J. (1995). Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogues: *In vitro* and *in vivo* studies. In: Rotbart HA (Ed.), Human enterovirus infections. Washington, DC, USA: ASM Press, 419- 434p.

Ould- Soule A. (2003). Profil fourrager Mauritanie. FAO. 15p.

P

Parrot S., Degraeve P., Curia C and Martial-Gros A. (2003). *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Nahrung Food* , 47, 87-94.

Park S.W., Kim J.Y., Kim Y.S., Lee S.J., Lee S.D., Chung M.K.(2014). A milk protein, casein, as a proliferation promoting factor in prostate cancer cells. *World J Mens Health*, 32 (2),76-82.

Peischard S., Ho H.T., Theiss C., Strutz-Seeböhm N., Seeböhm G.(2019). A Kidnapping Story: How Coxsackievirus B3 and Its Host Cell Interact. *Cell Physiol Biochem*, 53(1) ,121-140.

Peyre –de- Fabregues B. (1989).Le Dromadaire dans son milieu naturel. *Revue d’Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42 (1), 127-132.

Prieto P., Pineda M., and Aguilar M.(1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem* ,269 (2),337-341.

Q

R

Rafiq S., Huma N., Pasha I., Sameen A., Mukhtar O., Khan M.I. (2016). Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australas J Anim Sci*, 29 (7) ,1022-8.

Ramet J.P.(1993). La technologie des fromages au lait de dromadaire, Etude FAO production et santé animale, 2-125p.

Ramdaoui A., Obad I. (1998) .Caractérisation physico-chimique et microbiologique du lait de dromadaire, et étude de sa stabilité thermique. Mémoire de 3cycle présenté pour obtenir le grade d’Ingenieur d’Etat en Industries Agricoles et alimentaires. ENSAIA. .Nancy, France:

Rao D.R., Chawan C.B., Pulusani S.R. (1981) .Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rates. *J .Food. Sci* ,46,1339–1341.

Rao T.S., Kale N.R. and Dalvi S.P. (1987). Kinetics and mechanism of the oxidation of L-ascorbic acid by 2,6-dichlorophenol-indophenol in aqueous solution. *React Kinet Catal Lett* 34, 179–184.

Rao P.S., Bajaj R., and Mann, B. (2020). Impact of sequential enzymatic hydrolysis on antioxidant activity and peptide profile of casein hydrolysate. *J Food Sci Technol* ,57, 4562–4575 .

Redwan E. R. M. and Tabll. A. (2007). Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *J. Immunoassay Immunochem.* 28 (3), 267-77.

Renner E., Renz-Schauen A.,Drathen M.,Jelen S.(1989). Einfluss der Lichtintensität auf die Qualität pasteurisierter Milch in klaren und gefärbten Glasflaschen.*Dtseh Molk Ztg*, 110, 1006-1008.

S

Saiga A., Tanabe S., and Nishimiura T. (2003) .Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem*, 51, 3661–3667.

Salami M., Yousefi R., Ehsani M.R., Dalgalarondo M., Chobert J.-M., Haertlé T., Razavi S.H., Saboury A.A., Niasari-Naslaji A., Moosavi-Movahedi A.A. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal* ,18, 1097-1102.

Salami M., Moosavi-Movahedi A.A., Moosavi-Movahedi F., Ehsani M.R., Yousefi R., Fahadi M., Niasari-Naslaji A., Saboury A.A., Chobert J.M.,Haertlé T. (2011). Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research* ,78, 471-487.

Sarabandi K., Mahoonak A.S., Hamishekar H., Ghorbani M., Jafari S.M. (2018).Microencapsulation of casein hydrolysates: physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of food engineering*, 273,86,95.

Sboui A., Khorchani T., Djegham M., et Belhadj O. (2009) .Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science*, 05(2), 293 – 304.

Sepulvida P., Marciniszun J., Iane Liu J.R. et Tang D.J. (1975). Primary structure of porcine pepsin III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsine.*The journal of biological Chemistry*, 250(13),5082-5088.

Shariatikia M, Behbahani M, Mohabatkar H. (2017). Anticancer activity of cow, sheep, goat, mare, donkey and camel milks and their caseins and whey proteins and in silico comparison of the caseins. *Mol. Biol .Res .Commun*, 6(2),57-64.

Shuangquan H. T., Tsuda H., and Taku, M. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130 B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. *Journal of Science and Food Agriculture*, 88, 2688-2692.

Siboukeur O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut national agronomique EL Harrach-Alger (Algérie).

Sindayikengera S. and Xia W. (2005). Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45, 645-656.

Singh R., Gorakh Mal G.D., Evendra Kumar D., Patil N.V., Pathak K.M.L. (2017) .Camel Milk: An Important Natural Adjuvant. *Agric Res* , 6(4),327–340.

Sitohy M., Dalgalarondo M., Nowoczin M., Besse B., Billaudel S., and al.(2008).The effect of bovine whey proteins on the ability of poliovirus and coxsackie virus to infect Vero cell culture. *Inter Dairy J*, 18 (6), 658- 668.

Souki H. (2009). Les stratégies industrielles et la construction de la filière lait en Algérie : portée et limites. Revue campus N°15, faculté de sciences de gestion, université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 3-15p.

Srinivas S., and Prakash, V. (2010) .Bioactive peptides from bovine milk alpha-casein: Isolation, characterization and multifunctional properties., *Int. J. Pept. Res. Ther*, 16, 7-15.

Stahl T., Sallman H.I., Duehlmeier R., Wernery U. (2006). Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrum. *J Camel Pract Res*, 13 (1), 53–57.

Sun H., and Jenssen H. (2012).Milk Derived Peptides with Immune Stimulating Antiviral Properties. milk protein. Walter L .Hurley edition. *Intech open*, 47- 48p.

T

Tayefi-Nasrabadi H., Hosseinpour-Feizi M.A. and Mohasseli M.(2011).Thermodynamic Analysis of Lactoperoxidase activity in camel milk.International Conference on Life Science and Technology.*IPCBE*, 3, p 4-6.

Thongboonkred V., Semangoen T ., Chutipongtanate S.(2006).factors determining types and morphologies of calcium oxalate crystals molar concentration, buffering, pH sterring and temperature. *clinica chimica acta* ,367, 120-31.

Tsopmo A., Romanowski A., Banda L., Lavoie J.C., Jenssen H., Friel J.K. (2011). Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry* ,126, 1138-1143

U

V

Vassou D., Bakogeorgou E., Kampa M., Dimitriou H., Hatzoglou, A., and Castanas, E. (2008). Opioids modulate constitutive B-lymphocyte secretion. *Int Immunopharmacol* ,8, 634-644.

Vladesco R., et Prahoveanu H. (1939). Le lait et la vitamine c, en Roumanie. Le Lait, INRA Editions, 19(188),798-805.

W

Walker J.R., Roth J.R. and Altman E.(2001). An in vivo study of novel bioactive peptides that inhibit the growth of *Escherichia coli*. *J. Peptide Res*, 58, 380–388.

Wang J, Su Y., Jia F. and Jin H.(2013 a).Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chem. Cent. J*, 7, 62.

Wang W., Gu F., Wei C., et al.. (2013 b).“PGPIP, a therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting BCL2,” *PLoS One*, 8, 4.

Wangoh J., Farah Z. and Puhon Z. (1998). Iso-electric focusing of camel milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 617-621.

Willoughby S.D.(2013). Bio active peptides: Their Role in Protein Synthesis and Human Performance Enhancement Related to Recovery and Lean Body .Mass Gains iSatori, Inc.: A Research Summary” ,Exercise and Biochemical Nutrition Laboratory; Baylor University, Waco, TX.

Wilson R.T.(1984).The camel. Longman International. Education.London, 223p.

Wilson R.T. (1998). Camels: The Tropical Agriculturalist: Camels. Macmilan Education Ltd. London and Basingstoke.134p.

X

Y

Yagil R. and Etzion Z. (1980). Effect of drought conditions on the quality of camel milk.*J. Dairy. Res*, 47, 159-166.

Yagil R. (1985). The desert came: Comparative physiological adaptation. Comparative animal nutrition, Karger, Basel,Suisse,163- 164 p.

Yagil R. (2013). Camel Milk And Its Unique Anti-Diarrheal Properties. *Isr Med Assoc J* ,15, 35-36.

Yamamoto N., Akino A., and Takano T. (1994) .Antihypertensiveeffect of the peptides derived from casein by an extracellularproteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci*, 77, 917-922.

You L., Zhao M., Regenstein J.M., and Ren J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 120, 810–816.

Z

Zhang L., Rozek A. and Hancock R.E.W. (2001) .Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* 276, 35714-35722.

Zhao I.H., Fu Y., Yue N . (2014). *In vitro* cytoprotection of modified casein hydrolysates by pepsin reaction on rat hepatocyte cells. *CyTA -Journal of Food*, 12(1),40-47.

Zhu Y., Fan J., Cheng Y, and Li L.(2008). Improvement of the anti-oxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. *Food Contr*, 19,654–661.

Zimecki M., and Kruzel, M.L. (2007). Milk-derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*, 6, 89-106.

Annexes

Annexes**Annexe1 : Dosage du Lactose****Solution aqueuse d'hexacyanoferrate (II) de potassium (2mL)**

- K₄Fe (CN)₆, 3 H₂O..... 15 g
- Eau distillée.....100 mL

Solution aqueuse d'acétate de zinc (2mL)

- Zn (CH₃COO)₂, 2 H₂O.....30 g
- Eau distillée100 mL

Solution cuivrique (20 mL)

- CuSO₄, 5 H₂O..... 40 g
- H₂SO₄ ρ 20 = 1,83 g/mL 2 mL
- eau distillée.....1000 mL

Solution tartro-alkaline (20 mL)

- Na K (H₄C₄O₆), 4 H₂O..... 200 g
- NaOH..... 150 g
- eau distillée..... 1000 mL

Solution ferrique

- Fe₂(SO₄)..... 350 g
- H₂SO₄ ρ 20 = 1,83 g/mL..... 200 g
- eau distillée1000 mL.

Solution de permanganate de potassium 0,1 N**Annexe 2 :****Préparation des solutions de la méthode de Lowry**

Solution A	Na ₂ CO ₃ 10g	Dans NaOH 0.1N (500 mL)
Solution B	2 mL de CuSO ₄ (0.32g/100 mL)	2mL de tartrate double de K et Na (1g/100 mL)
Solution C	50 mL de solution A	Dans 1mL de solution B

Gamme étalon

Dissoudre 0,05g de BSA dans 500 ml d'eau.

Préparation de dilution à partir de la solution mère 100 µg/ml :

Eau distillée (mL)	Volume de la solution BSA (mL)	Conc finale
0	100µg/ml	100 µg/mL
8	2	20 µg/mL
6	4	40 µg/mL
4	6	60 µg/mL
2	8	80 µg/mL

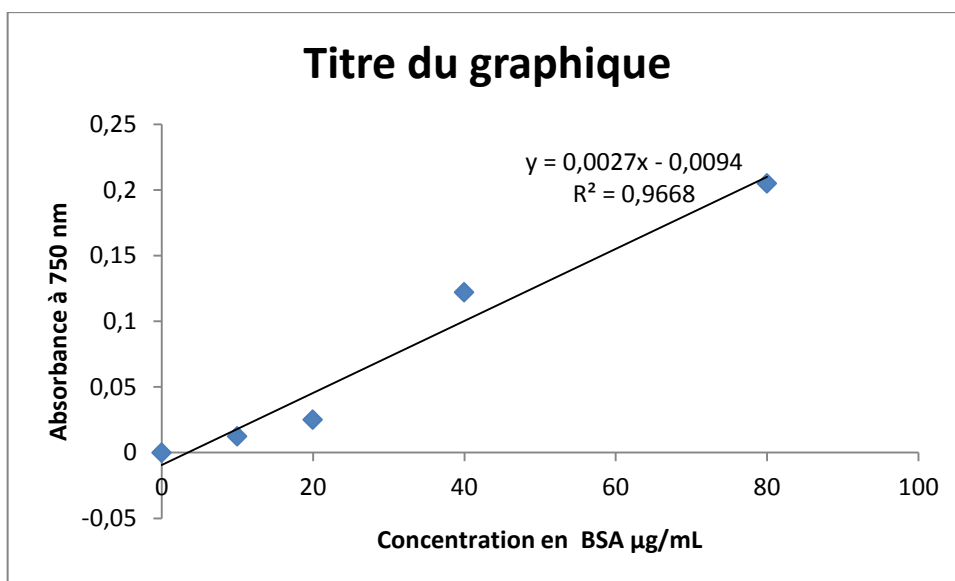


Figure 01 : Courbe d'étalonnage du BSA par la méthode de Lowry

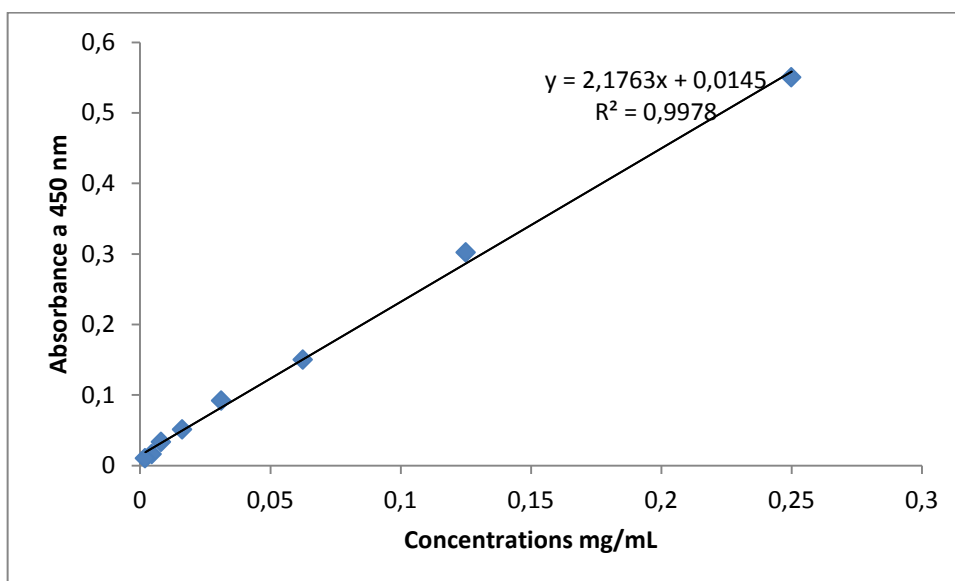


Figure 02 : Courbe d'étalonnage du β carotène pour dosage des caroténoïdes

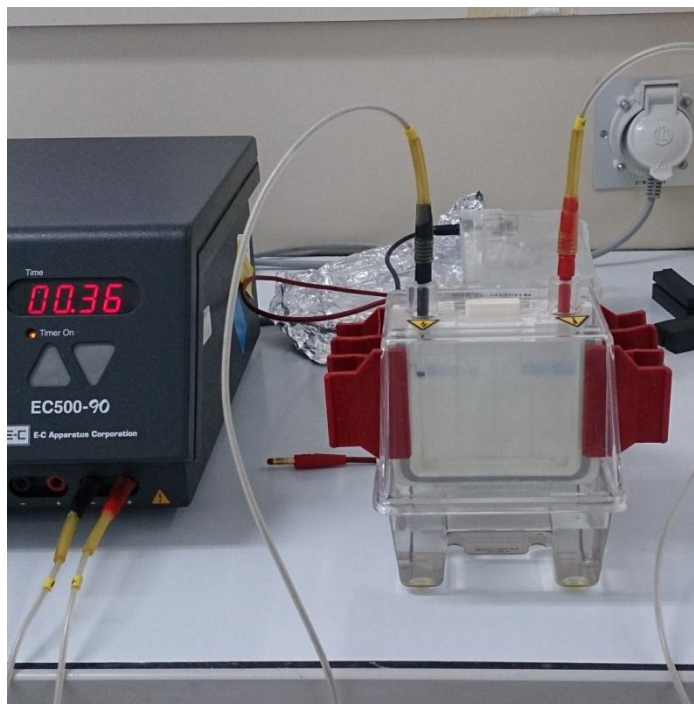
Annexe 3 :

Figure 03 : Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260)

Solution de coloration

Bleu de Coomassie	0.2g
Methanol.....	90 mL
Acide acetique	20 mL
Eau	90 mL

Solution de décoloration

Methanol	90 mL
Acide acetique.....	10 mL
Glycerol	10 mL
Eau	90 mL

Annexe 4**1. Préparation du milieu de culture DMEM 2%**

Dans un flacon de 1L de DMEM ajouter:

50 ml Tryptose phosphate

2 ml pénicilline-streptomycine

20 ml de SVF

Faire le contrôle de stérilité sur Bouillon Trypto-caséine soja

Thioglycolate

Gélose Sabouraud

2.Préparation du milieu de culture DMEM 10%

Dans un flacon de 1L de DMEM ajouter :

100 ml Tryptose phosphate

2 ml pénicilline-streptomycine

100 ml de SVF

Faire le contrôle de stérilité sur Bouillon Trypto-caséine soja

Thioglycolate

Gélose Sabouraud

Activité antivirale (%) de la caséine et ses hydrolysats incubé avec le virus





Cox B6

µg/mL	AA% on Cox B6			
	0.1 MOI	1 MOI (avec Vero)	0.1 MOI	1 MOI (avec A549)
Caséine				
0.035	1.75	0	13.3	6.79
0.179	3.18	53	16.08	14.46
0.89	4.37	63.7	17	14.5
4.48	5.29	81.7	17.5	14.68
22.4	5.93	89	18.34	28.52
112	5.55	100	24.5	41.33

Hydrolysate 15 min				
0.035	0	0	0	0
0.179	0	0	0	0
0.89	0	0	0	0
4.48	0	0	0	0
22.4	0	0	0	0
112	0	0	0	0
Hydrolysate 30 min				
0.035	0	0	0.3	0
0.179	0	0	0.64	0.03
0.89	0	0	0.03	15.06
4.48	0	0	2.53	39.4
22.4	0	0	2.84	57.9
112	0	0.28	ND	90.52
Hydrolysate 45 min	ND	ND	ND	ND
Hydrolysate 60 min				
0.035	23.58	0.001	3.6	0
0.179	30.88	2.11	4.4	14.07
0.89	36.4	3.9	7.5	14.8
4.48	47.61	26.17	11.00	24.37
22.4	28.7	80.4	16	49
112	52.78	100	21.13	52.6
Hydrolysate 90 min				
0.035	0	0	0	1.17
0.179	0	0	0	0
0.89	0	10.4	0	0
4.48	0	40.9	0	0
22.4	0	61.3	0	0
112	0	100.5	-1	0
Hydrolysate 120 min				
0.035	0	0	0	3.9
0.179	0	0	6	4.4
0.89	0	0	5.67	5
4.48	0	0	5.47	3.22
22.4	0	0	4.55	3.027
112	0	0	7.27	3.38
Hydrolysate 150 min				
0.035	0	0	0.05	0.21
0.179	0	0	0.1	0.035
0.89	0	0	0.051	0.058
4.48			0.043	0.4
22.4	0	0	0.013	0.013
112	0	0	0.069	0.077

Hydrolysate 180 min				
0.035	-3.6	-0.98	0.051	0.02
0.179	0	-2	0.1	
0.035				
0.89	0.38	-3.6	0.045	
0.05				
4.48	3.72	-3.7	0.05	0.4
22.4	5.79	-1.3	0.013	0.014
112	6.01	6.3	0.06	0.06

IN VITRO ANTIOXIDANT AND ANTIVIRAL ACTIVITY OF CAMEL MILK CASEIN HYDROLYSATES

 Farah Ben Abbas^{1,2},  Rachid Belhattab^{1,3*},
 Mohamed Seghier⁴,  Dahbia Leila Anes-Boualhal⁴

¹Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas Setif1 University, 19000, Setif, Algeria

²Department of Engineering Process, Pharmaceutical Engineering Process, Faculty of Technology, Ferhat Abbas Setif1 University, 19000, Setif, Algeria


³Department of Biochemistry, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas Setif1 University, 19000, Setif, Algeria,

⁴ Enterovirus Laboratory, OMS National Referenced Laboratory, Pasteur Institute, Algiers, Algeria

*Corresponding Author:
E-mail: rbelhat@yahoo.fr

(Received 19st September 2020; accepted 06th January 2021)

ABSTRACT. Camel milk casein and its hydrolysates obtained by pepsin enzyme action for 5 to 180 min, were assessed for antioxidant activities using 2, 2- diphenyl picryl-1- hydrazyl (DPPH), ferric reducing power, total antioxidant capacity (TAC) and β -carotene/linoleic acid bleaching tests. The antiviral effect against Coxsackie virus (Cox B6) was conducted *in vitro* by using A 549 and Vero cell lines. Coxsackie virus (Cox B6) was first interacted with casein and its hydrolysates at different concentrations, and then mixed with the different cell types. The viable cells were revealed by colorimetric method using neutral red. Results obtained suggest that pepsin camel milk casein hydrolysates can be exploited as a source of antioxidant compounds, and inhibit Coxsackie infection in both cell lines.

Keywords: Camel milk casein, pepsin hydrolysates, antioxidant, Coxsackie virus, Vero, A549. 

INTRODUCTION

Dromedary camel milk proteins composition is 3 to 3.9%, it contains two main groups: whey and casein, the second one constitutes 52 to 87% of total milk proteins, with main fractions: β casein (65%) followed by α S1 casein (21%) [1].

Within the protein sequence, peptides are inactive and require enzymatic proteolysis. Once released from the proteins precursor they become bioactive, and will have a positive impact on body, the beneficial health effects may be classified as antioxidative, antimicrobial, antithrombotic, antihypertensive or immunomodulatory [2, 3].

Oxidative stress refers to elevated intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), with free radicals including the superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals (OH^\cdot), they are derived either from normal essential metabolic processes in the human body or from external sources such as exposure to X-rays, ozone, cigarette smoking, air pollutants, and industrial chemicals [4]. They also react

with proteins, hormones, enzyme molecules and even DNA, leading to damage cell membranes and the development of cancers. Antioxidants prevent free radical formation by scavenging them or by promoting their decomposition. In addition to natural antioxidants based on polyphenols, peptides that can utilize free radicals are identified in various hydrolysates of milk proteins [5], in order to replace synthetic antioxidants (butylated hydroxytoluene BHT, butylated hydroxyanisole BHA, propyl gallate...) used in food industry for extending the storage period of end products, but recently reported to be dangerous and imposing human health risks.

Among risks, tumor in human, whose many reports ascribed the link of viral infections with cancer [6]. Coxsackie viruses are RNA viruses belonging to the family picornaviridae and the genus enterovirus, divided into two groups A and B, at least 6 serotypes of group B are recognized (Coxsackie virus B) tend to infect heart, pleura, pancreas and liver causing pleurodynia, myocarditis and hepatitis; they are also causing non-specific febrile illnesses and upper respiratory tract disease [7]. Enteroviruses grow at a wide pH range (3- 10). After initial replication in the oropharynx, enteroviruses survive the acidic environment of the stomach [8, 9].

The aim of this work was to provide more information on the peptic camel milk casein hydrolysates antioxidant activity and to explore antiviral activity against Cox B6 on both African green monkey kidney cells (Vero cells) and adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells (A549 cells).

MATERIALS AND METHODS

Vero and A549 cells, Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) and Cox B6 were obtained from the National Referenced Laboratory, Pasteur Institute, Algiers, Algeria.

Fetal calf serum (FCS), DPPH, pepsin, ferric chloride, potassium ferricyanide, SDS, coomassie blue, TEMED, tween 40 were purchased from Sigma-Aldrich and ferrous sulfate, ammonium persulfate, sulfuric acid, sodium phosphate, ammonium molybdate, ammonium per sulphate and methanol were of analytical grade.

Sampling

Samples were collected in the morning from healthy female camels in a local farm at Laghouat region (Algeria) in bottles, and kept on ice during transportation to the laboratory and then stored at 4°C.

Casein preparation

Casein samples were prepared as follows: camel milk was defatted by centrifugation (3500×g, 20 min) at 4°C, then filtered. The filtrate was diluted with distilled water and pH was adjusted to 4.3 by the addition of 1M HCl, then centrifuged (5000×g, 30 min, 20 °C). The precipitated casein was separated from whey and washed with distilled water to remove any residue, then neutralized by 1M NaOH, precipitated again at pH 4.3 and washed, afterwards spread on filter paper, dried after removing water and lyophilized.

To estimate the concentration of casein, the Lowry protein assay was performed.

Casein hydrolysis

Camel milk casein was treated with pepsin according to the method of Parrot et al. [10]. A casein solution was prepared (20 mg/mL), pH adjusted to 2.0 with 1M HCl, then

a 1g/L pepsin solution in 0.01M HCl was added to casein at enzyme/substrate ratio 1:200 (w: w). Camel casein was hydrolyzed by pepsin for 15, 30, 45, 60, 90, 120,150 and 180min at 37°C in water bath. The enzymatic hydrolysis was stopped by heating the reaction volume at 85°C for 5 min.

SDS PAGE analysis

SDS PAGE was performed on polyacrylamide gel system described by Laemmli [11]: 4.8% w/v polyacrylamide stacking gel at pH 6.8 and 17% polyacrylamide separation gel at pH 8.8. Samples were diluted in sample buffer containing stacking gel buffer, 10% SDS, β -mercaptoethanol then were heated at 95°C for 5 min.

10 μ l of samples with 2 mg/mL protein was loaded onto the gel for electrophoresis at 200 V at 25mA constant current. After running the electrophoresis unit, proteins are fixed with 12% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) for 30 min and then stained with 0.2 g of R-250 Coomassie brilliant blue dissolved 45 min in a mixture of methanol/acetic acid/water (90:20:90, v/v/v), followed by destaining in methanol/acetic acid/glycerol/water (90:10:10:90, v/v/v/v).

Antioxidant activity evaluation

Reducing power assay

The reducing power was determined according to the method described by Hwang et al. [12]. The hydrolysate aliquot (0.5 mL) was mixed with 0.5 mL 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 0.5 mL of 1.0 % potassium ferricyanide ($K_3Fe(CN)_6$) and then incubated in a water bath at 50°C for 20 min. After cooling down, 0.5 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture to stop the reaction, then the mixture was centrifuged at 1500 g for 10 min. The supernatant (1 mL) was mixed with 1 mL distilled water and 0.2 mL 0.1% ferric chloride $FeCl_3$, and the absorbance was measured at 670 nm after setting in the dark at room temperature for 10 min. The control is included by replacing the sample volume by equal volume of solvent.

Free radical scavenging activity

Antioxidant activity was measured using 2, 2-Diphenyl- 1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging assay as described by Brand-Williams et al. [13] where a fixed volume of each hydrolysate (0.1mL) was mixed with 3.9 mL of 6.10^{-5} M of methanol DPPH solution, *the mixture* was allowed to stand in the *dark* at room temperature for 30 min, the absorbance was read at 515 nm. The control was prepared by replacing the sample with distilled water.

The free radical scavenging activity (inhibition %) was calculated from following equation:

$$\text{Scavenging activity (inhibition \%)} = \frac{\text{abs}_{\text{control}} - \text{abs}_{\text{sample}}}{\text{abs}_{\text{control}}} * 100$$

Blank sample and reference standard consist of methanol and BSA respectively.

Total antioxidant capacity (TAC)

Determination of antioxidant capacity, through the formation of phosphomolybdenum complex is performed as described by Prieto et al. [14]. 0.1 mL of sample (20 mg) solution

is combined with 1 mL of reagent (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). The aqueous solutions are incubated in a boiling water bath at 95 °C for 90 min. After cooling, the absorbance is measured at 695 nm against blank.

β-carotene/linoleic acid bleaching test

The method is assed according to Wanasundra et al. [15]. Briefly 1 mL of chloroformic solution of β carotene was pipetted into round bottom flask and 20μl of linoleic acid, 200 mg of tween 40 emulsifer were added. After removing chloroform by rotary evaporator at 40°C, 50 mL of oxygenated water was added to flask and shaken, aliquots of 5 mL of the emulsion were added to 0.5 mL of each sample, and immediately placed in water bath at 50°C. The absorbance was read against blank at different time intervals for 120 min at 470 nm.

Antiviral activity of hydrolysates against Cox B6

The antiviral activity was assayed against Coxsackie virus, the multiplications of infection (MOI) were 0.1 and 1 MOI, using monocellular layers 50000 for Vero and 30000 for A549 cells per well in 96 well microplates for 72h. 100μl from each hydrolysate concentrations (0.035-120 μg/mL) were added to 40μl of virus suspension and 100μl of DMEM containing 7 and 10% FCS for A549 and Vero cells respectively, after incubation 1h at 37°C. Cellular suspension was added, and plates were incubated at 37°C in 5% CO₂. At the end of the period of 72h, viable cells were revealed by neutral red and estimated by reading the absorbance at 540 nm using plate reader [16]. The percentage of antiviral activity is calculated as followed:

$$AA = \frac{OD_s - OD_v}{OD_c - OD_v}$$

OD_s is the optical density of the cells infected by virus and protected by the hydrolysates. OD_v is the optical density of the cells infected by virus.

OD_c is the optical density of the cells protected by the hydrolysates and not infected by virus

Statistical analysis

All the tests were performed in triplicate and the graph was plotted with mean value.

RESULTS

Casein was isolated from acidified defatted milk. For determining the total level of protein in a solution, the *Lowry* protein assay was performed and the camel milk casein concentration was found 30.81g.L⁻¹.

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE)

Molecular weight of casein and its pepsin hydrolysates were compared to molecular standard (Fig. 1).



Fig.1. SDS page of camel milk casein and its pepsin hydrolysates at different hydrolysis time **M**: molecular weight marker, peptic hydrolysate at 60min (**A**) peptic hydrolysate at 90min (**B**), peptic hydrolysate at 120min (**C**).

Reducing power assay

Antioxidant peptides produced by pepsin hydrolysis of camel milk casein have reducing power. The absorbance increases up to 90 min (Fig.2).

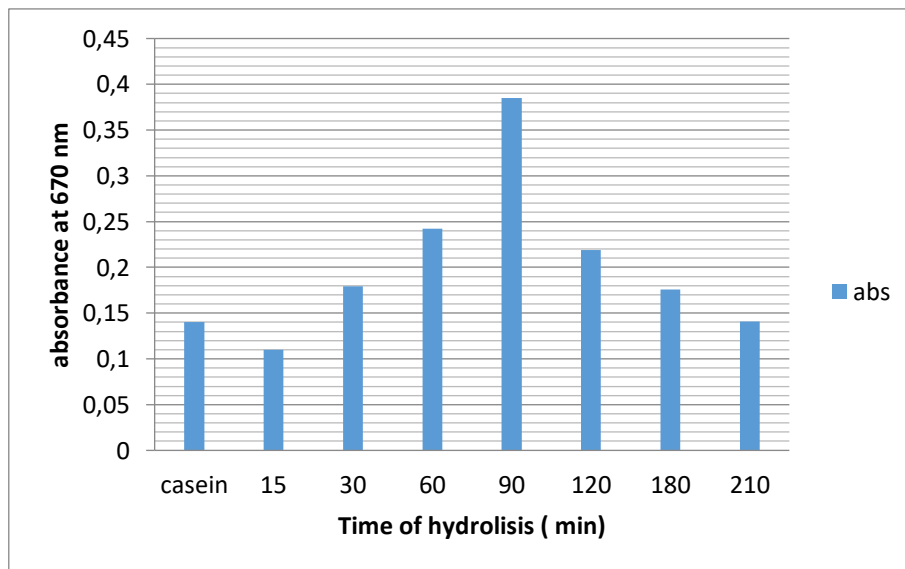


Fig. 2. Dependence of reducing power of hydrolysis products of casein with pepsin of various time of hydrolysis.

DPPH free radical scavenging activity

Scavenging activity of camel casein hydrolysates are determined using DPPH radicals (Fig 3). The antioxidant activity goes increasing to 120 min and after that decreases. Increasing the degree of hydrolysis of casein leads to decrease in activating effect of peptides.

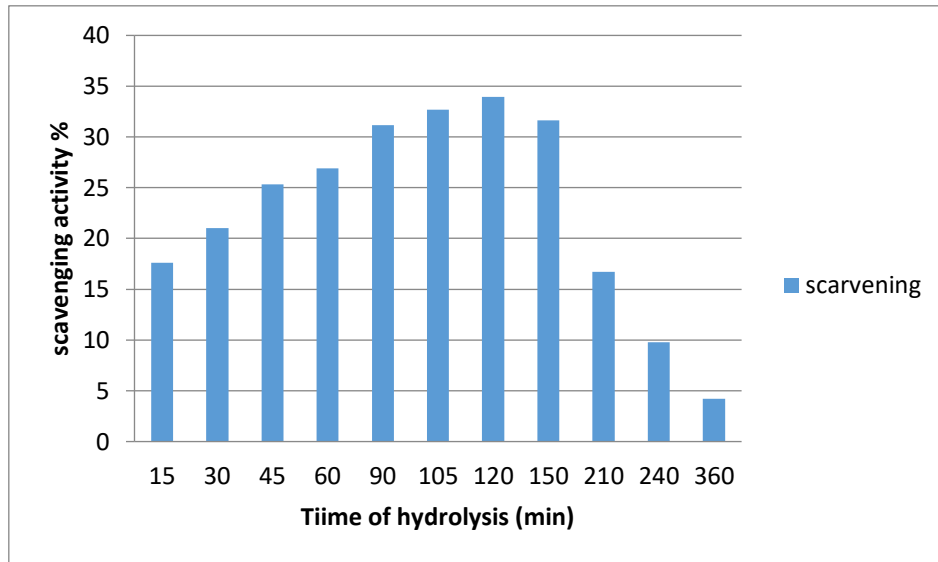


Fig. 3. Free radical scavenging activity DPPH activity of casein hydrolysates by pepsin at different time of hydrolysis

Total antioxidant capacity (TAC)

To evaluate the total antioxidant capacity of peptide generated from hydrolysis, the reduction of phosphate Mo (VI) to phosphate Mo (V) by the sample and subsequent formation of a bluish green colored phosphate/Mo (V) complex at acid pH. The absorbance goes increasing till 180 min of hydrolysis (Fig.4).

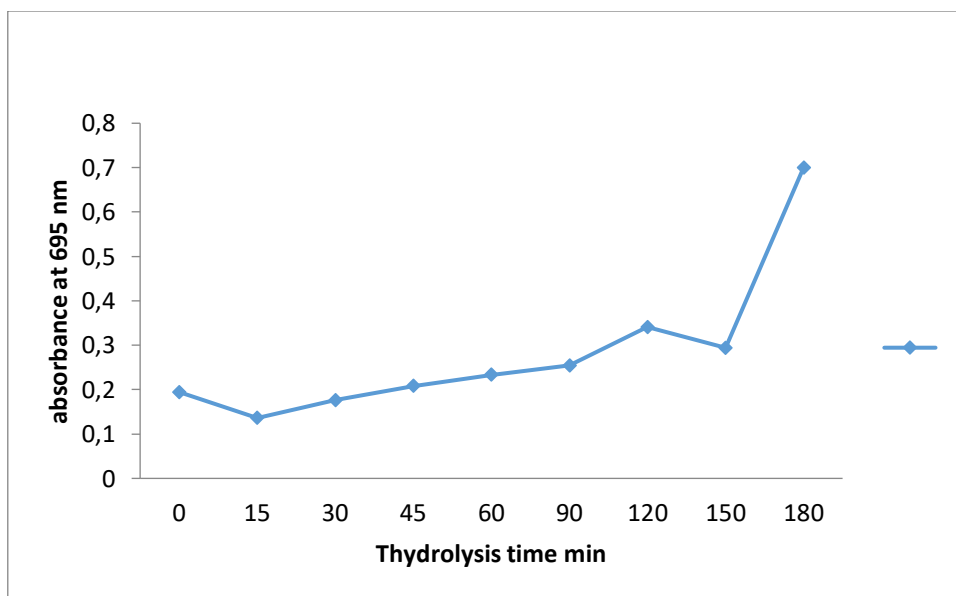


Fig. 4. Dependence of the absorbance on the time of hydrolysis in phosphomolibdenum essay

β-carotene/ linoleic acid bleaching test

The comparative absorbances of the hydrolysates at different time intervals till 120 min as described in the procedure of this assay indicates that hydrolysates of 120 and 90 shows higher values (Fig 5).

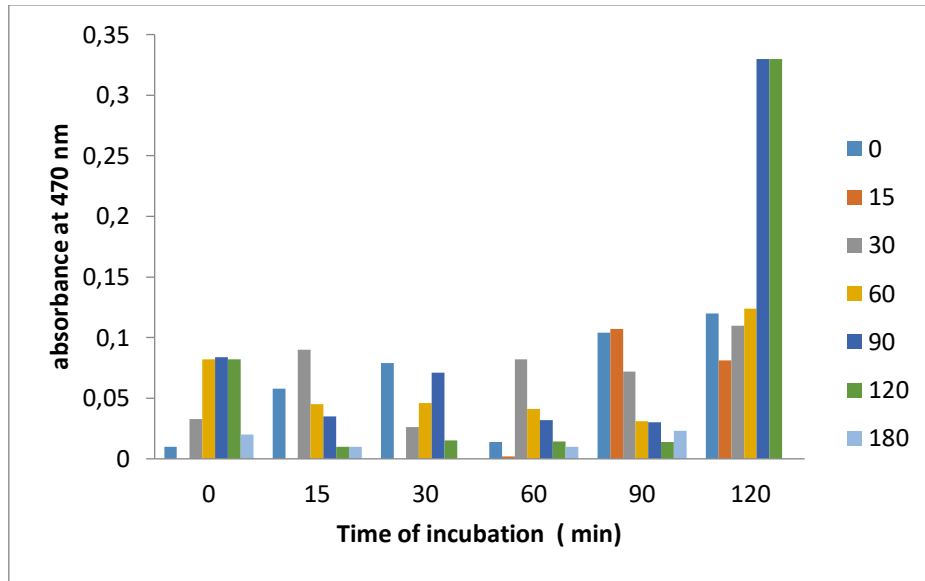


Fig. 5. Bleach ability of β carotene in linoleic acid system at different time intervals

Antiviral activity against Cox B6

The antiviral activity of camel milk casein hydrolysates against Cox B6 results are shown in Fig 6-11.

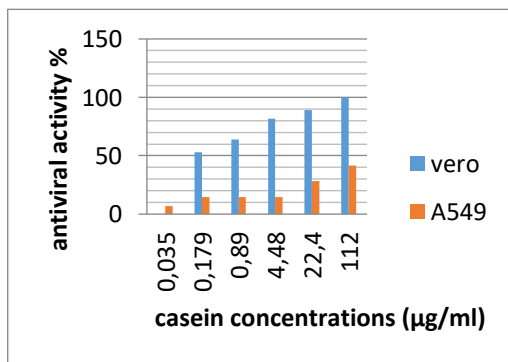


Fig. 6. Antiviral activity of casein, incubated with Cox B6 1 MOI

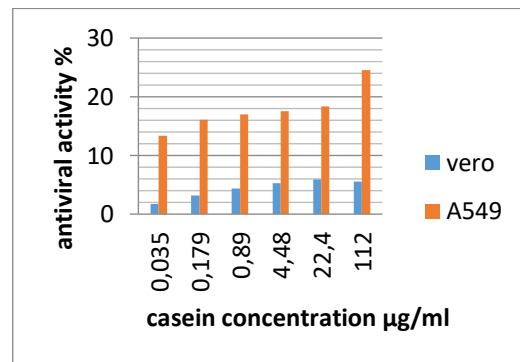


Fig. 7. Antiviral activity of casein, incubated with Cox B6 0.1 MOI

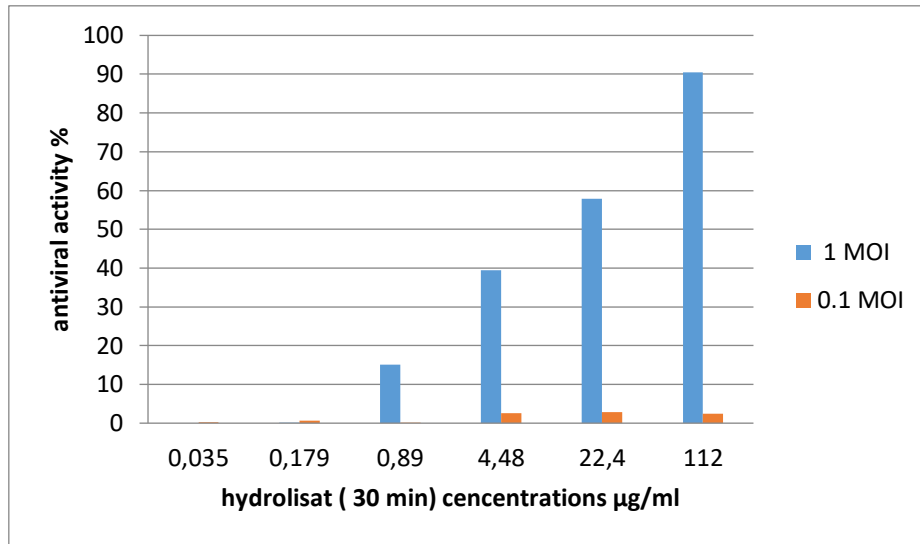


Fig. 8. Antiviral activity of casein hydrolysate (30 min) ,incubated with Cox B6 (1MOI) effect on A549 cell

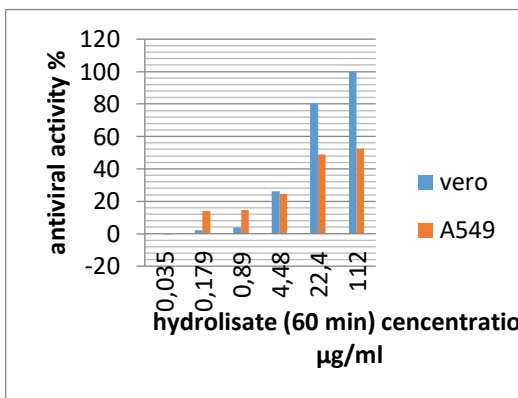


Fig. 9. Antiviral activity of hydrolysate at 60 min incubated with Cox B6 1MOI

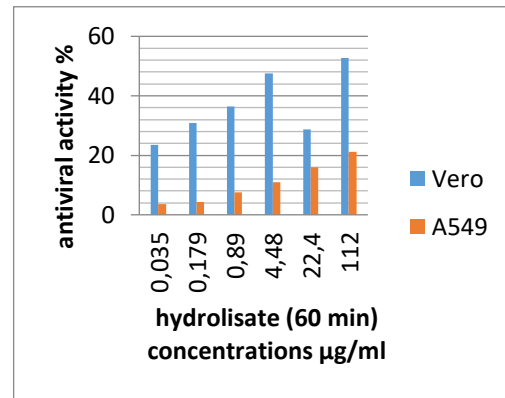


Fig. 10. Antiviral activity of hydrolysate at 60 min incubated with Cox B6 0.1 MOI

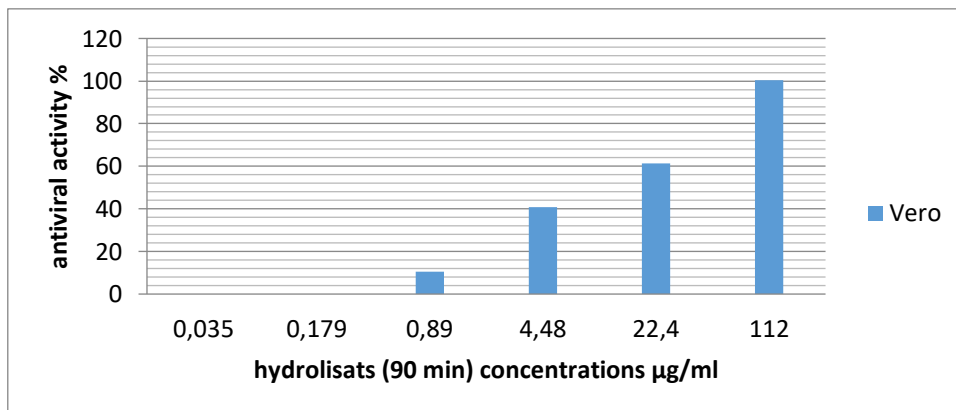


Fig. 11. Antiviral activity of hydrolysate at 90 min incubated with Cox B6 (1 MOI)

DISCUSSION

Fat was removed from camel milk and, after precipitation by acidification the casein obtained was isolated, the bands in SDS-page give an estimation of molecular weight of casein approximately 28 kDa, it was reported that camel milk casein has a weight of α s1-CN and β - CN 33 and 29.5 kDa respectively [17], another study mentioned 31, 25, and 27 kDa for α s1 -, α s2 - and β - casein respectively [18], after hydrolysis bands of smaller molecular weight are visible.

The time hydrolysis goes up to 180 minutes, the biological activity of peptides depends on the protein substrate, enzyme specificity, and hydrolysis conditions.

Reducing power assay

This method is based on the principle of increase in the absorbance of the reaction mixtures. Increase in the absorbance indicates an increase in the reducing power. In this method, antioxidant compound forms a colored complex which is measured at 670 nm.

The presence of deductants in peptic camel milk hydrolysate up to 90 min, causes the reduction of the Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form. Therefore, the Fe^{2+} can be monitored by measuring the formation of blue at 695 nm. For the pepsin treatment hydrolysate produced by 90 min hydrolysis, the greatest reducing power is expedited. The peptide cleavages increase the availability of protons and electrons resulting from enzymatic hydrolysis. [19].

DPPH free radical scavenging activity

The DPPH activity of camel milk casein hydrolysates has been used to evaluate its antioxidant activity, relatively high DPPH scavenging activity was observed with different enzymes at a longer incubation time where the α chymotrypsine at 2h of hydrolysis produced hydrolysates which had significantly higher antioxidant activity up to 6 h [20]. The antioxidant activity increased significantly with the progress in hydrolysis time up to 120 min where the higher activity is about 33.97 %, then decreases. Relationship between hydrolysis time which act like electron donor and DPPH activity could be established where scavenging activity of pepsin hydrolysates may be a result of its higher enzymatic activity.

β -carotene/ linoleic acid bleaching test

The of β carotene /linoleic acid bleaching test is usually used to detect antioxidants like phenolics, in this study, casein hydrolysates showed antioxidant property, up to 120 min of incubation, the hydrolysates have an inhibitory activity against linoleic acid auto oxidation,

Its antioxidant activity is due to increased accessibility to hydrophobic targets [21]. In fact, hydrophobic amino acids in the camel milk casein hydrolysates, which have higher affinity to the lipid phase than hydrophilic amino acids, can scavenge lipid-derived radicals [22].

Total antioxidant capacity (TAC)

This assay is a quantitative method to investigate the reduction reaction rate among antioxidant. It involves in thermally generating auto oxidation during prolonged

incubation period at high temperature, electron transfer occurs in this assay which depends upon the structure of the antioxidant [14].

Antiviral activity against Cox B6

Camel milk casein and its hydrolysate of 60 min have an antiviral activity in both Vero and A549 cell line, while its hydrolysate of 30 min shows an antiviral activity in A549 cell line only. Hydrolysate of 90 min also inhibits the infection of Vero cell line by Cox B6 but not A549 (data not shown).

The antiviral activity of camel milk hydrolysates has been investigated against the ability of Cox B6 to infect Vero and A549 cells. The time of incubation with virus, the concentration of the hydrolysates and the viral load (MOI) determine the amplitude of antiviral activity.

The concentration of 112 $\mu\text{g/mL}$ of casein has the highest antiviral activity, with 41.33 and 100% efficiency against Cox B6 at concentration of 1MOI but decreases to 24.5 and 5.55% at 0.1 MOI, in A549 and Vero cells, respectively.

Hydrolysates with antiviral activity are 30, 60 and 90 min of hydrolysis, after that no activity was observed (data not shown). The camel milk casein hydrolysate of 30 min exhibits an antiviral activity, with 90.52% efficiency against Cox B6 at a concentration of 1 MOI and only 2% at 0.1 MOI in A549 cell line only, while the efficiency of hydrolysate of 60 min (112 $\mu\text{g/mL}$) is 52.78 and 100% at 1 MOI, and 21.13 and 52.6 % at 0.1 MOI in A549 and Vero cells respectively, also the 90 min hydrolysate shows a high antiviral activity at a concentration of 112 $\mu\text{g/mL}$ with Vero cell only attending 100%.at 1MOI. Sitohy et al., [23] conclude that antiviral activity of esterified whey protein could be due to the perturbation of viral RNA- protein interaction, hence inhibition of the translation of viral proteins. With Cox B6 the level of reduction of viral genomic RNA reached 14%. Also, it was reported that pepsin cleaves peptide bonds involving hydrophobic and aromatic amino acids residues. Camel β -Casein has 46 possible potential cleavages [24]. Antiviral inhibitory effects are explained by the entry of hydrophobic inhibitory molecules in the hydrophobic binding cavities of the viral surface [25, 26], which may explain the blockage of Cox B6 cell entry after 1h of incubation by the hydrolysates and induce their antiviral activity in our study.

CONCLUSION

On the basis of the results obtained in the present study it can be concluded that camel milk casein hydrolysates presenting antioxidant activity were produced through hydrolysis with pepsin, had different structures based on SDS-PAGE, especially hydrolysates of 60, 90 min.

Antioxidant properties measured using DPPH free radical scavenging, reducing power, total antioxidant capacity and β carotene/ linoleic bleaching test were improved after hydrolysis of camel milk casein. These compounds are able to protect Vero and A549 from harmful viral infection (Cox B6). The results suggest the presence of biologically active peptide fractions, which may be worth for further investigation. Further work using other hydrolysis enzymes and animal models will be needed to conclude valuable information.

Acknowledgements. Authors are grateful to Algeria Ministry of Higher Education and Research and the Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique DGRSDT and for Pasteur Institute of Algiers for their help and the facilities provided.

REFERENCES

- [1] Al Haj, O. A., Al Kanhal, H.A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk – review: *Inter. Dairy J.*, 20 (11), 811.
- [2] FitzGerald R.J, Meisel H. (2000). Milk protein- derived peptide inhibitors of angiotensin-I- converting enzyme. *Br. J. Nutr.* 84, Suppl. 1, S33-S37
- [3] Korhonen H., Pihlanto A. (2003). Food- derived bioactive peptides opportunities for designing future food. *IDF Bull.*, 9, 1297- 1308.
- [4] Bagchi K., Puri S. (1998). Free radicals and antioxidants in health and disease, *East Med. Health J.*, 4: 350–60
- [5] Pihlanto A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Inter. Dairy J.*, 16, 1306- 1314.
- [6] Mc Laughlin-Drubin M.E., Carl Munger K. (2008). Viruses associated with human cancer. *Biochim Biophys Acta.*, 1782 (3), 127-150.
- [7] Lim B.K., Ju E.S., Lao D.H., Yun S.H., Lee Y.J., Kim D.K. (2013). Development of enterovirus diagnostics assay system for diagnostic of viral myocarditis in human, *Microbial Immune*, 57(4), 281- 287.
- [8] Jiang P., Liu Y., Ma H.C., Paul A.V. Wimmer E. (2014). Picornavirus Morphogenesis, *Microbiol. Mol Biol Rev.*, 78 (3), 418- 437.
- [9] Papadopoulos N.G., Sanderson G., Hunter J. (1999). Rhinoviruses replicate effectively at lower airway temperature. *J. Med. Virol.*, , 58 (1), 100- 104.
- [10] Parrot S., Degraeve P., Curia C., Martial-Gros A. (2003). *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: Analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, *Nahrung/ Food* , 47, 87- 94.
- [11] Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680–685.
- [12] Hwang J.Y., Shyu Y.S., Hsu C.K. (2009). Grape wine lees improves the rheological and adds antioxidant properties to ice cream, *LWT- Food Sc. Tech.*, 42 (1), 312.
- [13] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- [14] Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E, *Anal. Biochem.*, 269 (2), 337- 341.
- [15] Wanasundara U., Amarowicz R., Shahidi F. (1994). Isolation and identification of an antioxydative component in canola meal. *J. Food Chem.*, 42, 1285- .
- [16] Oliveira J.C.R., Montes de Oca H., Duarte M.M., Diniz C.R. (2002). Toxicity of South American snake venoms measured by an in vitro cell culture assay, *Toxicol.*, 40, 321-325.
- [17] El- Agamy E.I., Abou- Shloue Z.I., Abdel- Kader Y.I. (1997). A comparative study of milk proteins from different species II. Electrophoretic patterns, molecular characterization, amino acid composition and immunological relationships, Proceeding 3rd Alexandria Conf. Food Sci. Tech., Alexandria, Egypt, pp.67- 87.
- [18] Larsson- Raznikiewicz, M., Mohamed M.A. (1986). Analysis of casein content in camel (*Camelus dromedarius*) milk, *Swed. J. Agric. Res.*, 16 (1), 13-18.

- [19] Cumby N., Zhong Y., Naczki M., Shahidi F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates, *Food Chem.*, 109 (1), 144-148.
- [20] Devendra K., Manish K.C., Raghvendar S., Nitin M., Pavan K. (2016). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Sci. Technol.*, 96, 391- 404.
- [21] Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein, *J. Agric. Food Chem.*, 46, 49- 53.
- [22] Pownall T.L., Udenigwe C.C., Aluko R.E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions, *J. Agric. Food Chem.*, 58(8), 4712- 4718.
- [23] Sitohy M., Dalgalarrrondo M., Nowoczin M., Besse B., Billaudel S., Haertlé T. Chobert J.M. (2008). The effect of bovine whey proteins on the ability of poliovirus and coxsackie virus to infect Vero cell culture, *Inter. Dairy J.*, 18 (6), 658- 668.
- [24] Lopez- Expósito I., Quirós A., Amigo L., Recio I. (2007). Casein hydrolysates as a source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides *Lait*, 87, 241-249.
- [25] Cox S., Buontempo P.J., Wright-Minogue J., de Martino J.L., Skelton A. M., Ferrari E. (1996). Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogues: *In vitro* and *in vivo* studies, *Antiviral Res.*, , 32, 71-79 .
- [26] O'Connell J.F., Albin R., Blum D., Grint P., Schwartz J. (1995). Antipicornavirus activity of SCH 47802 and analogues: *In vitro* and *in vivo* studies. In: Rotbart HA (Ed.), *Human enterovirus infections*. Washington, DC, USA: ASM Press, pp: 419- 434.

يعتبر حليب الإبل من العناصر الغذائية الأساسية للبدو الرحل، وتشمل فوائده القدرة على تعزيز نمو الجسم، الوقاية من مرض السكري، تعزيز المناعة والدورة الدموية وتخفيف الحساسية. الهدف من هذه الدراسة هو تقدير التركيب الكيميائي الفيزيائي لحليب الإبل الذي تم جمعه في أبريل، في منطقة الأغواط، والتحقق من خصائص مضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات والنشاط المضاد للحصى للبروتين الرئيسي في حليب الإبل وهو الكازين: وكذلك تلك الخاصة بنواتج الاماهة بالببسيين التي تم الحصول عليها خلال فترة زمنية تتراوح من 0 إلى 180 دقيقة. يحتوي الحليب الذي تم جمعه على درجة حموضة مقدارها 6.32 ± 0.1 ، حمض Dornic بمقدار 17.1 ± 1 °D، ومحتوى الدهون 28 ± 1 غ / لتر مع محتوى نيتروجين بنسبة 4.3 ± 0.01 ، يحتوي على مصّل اللبن 7.9 غ / لتر و 34.08 غ / لتر من الكازين، الرماد 9 غ / لتر. مادة جافة 13 ± 0.5 ، مضادات الأكسدة مثل الكاروتينات 0.16 مغ / لتر مما يفسر اللون الأبيض للحليب، بينما فيتامين C، يبدو أنه يتجاوز 25.25 مغ / لتر. أظهرت الهجرة الكهربائية بواسطة الترسيب الكهربائي SDS-PAGE، وجود شريط بالقرب من 28 kDa وكلما طالت مدة التحلل المائي زادت الهجرة الكهربائية للمكونات. مكنت تقنية RP-HPLC من ظهور معول فردي خاص بالكازين في الدقيقة 43.10، والذي تنخفض شدته مع زيادة زمن التحلل المائي. أظهر التغيير في البنية الثانوية المحصل عليه بفك حزام الاميد بطريقة ATR-FTIR ارتفاع نسب الكوع: الكازين 1.8% و 7.38% بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليه بعد 180 دقيقة. أجريت أربع تحاليل لتقييم النشاط المضاد للأكسدة منها طريقة 2,2'-azinobis (ABTS) (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)، 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)، وكانت النتائج 54.63% و 30% للكازين وتتراوح من 17% و 83.1% بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليه بعد 180 دقيقة من التحلل على الترتيب. فيما يتعلق بالقدرة المضادة للأكسدة لطريقة الفسفوموليبدنيوم و ارجاع الحديد، تراوح الامتصاص من 0.164 الى 0.176 و من 0.136 الى 0.7 بالنسبة لنواتج الاماهة المحصل عليها من 15 الى 180 دقيقة على التوالي. نشاط مضاد للميكروبات الكازين ليس له تأثير على *S. aureus* ATCC 25923، *E. coli* ATCC 25922، *C. albicans* ATCC 25922، *A. baumannii* ATCC 19606، *C. parasilopsis* ATCC 22019، *S. epidermis* ATCC 12228، *P. syringae* pv *tobaci* 1918 NCPPB، *S. aureus* ATCC 24433 بينما أظهرت جميع و نواتج الاماهة تأثيراً مثبطاً على الكائنات الحية الدقيقة باستثناء *S. aureus*، وذلك بتركيز 80 مغ / مل. أجري النشاط المضاد لفيروس كوكسكاي ب6 في الزجاج وتم تقدير كمية الخلايا الحية Vero A549 بعد اضافة الفيروس المعامل مسبقاً بالكازين و نواتج الاماهة المحصل عليها بعد 72 ساعة. أظهرت العينات نشاط سمي خلوي بتركيز 120 ميكروغرام / مل. ابدت الكازين و ناتج الاماهة المحصل عليه بعد 60 دقيقة قدرة على حماية كلتي الخلايا من الاصابة بالفيروس 1MOI بتركيز 112 ميكروغرام / مل بمعدل 100%. في حين كان لناتج تحلل اماهة 90 تأثير على خلايا Vero. تم تقدير النشاط المضاد لتشكيل الحصى الكلوي حيث كان للكازين القدرة على منع تشكل الرواسب عكس نواتج التحلل.

كلمات مفتاحية: كازين الإبل، نواتج الاماهة بالببسيين، النشاط المضاد للأكسدة، نشاط مضاد للميكروبات، النشاط المضاد للفيروسات، نشاط مضاد للحصى.

Résumé

Le lait de chamelle est un nutriment de base des nomades, ses avantages comprennent sa capacité à favoriser la croissance du corps, prévenir le diabète, stimuler l'immunité et la circulation sanguine et atténuer les réactions allergiques. Cette présente étude a pour objectif d'estimer la composition physicochimique du lait de chamelle collecté en mois d'Avril, dans la région de Laghouat et d'investiguer le potentiel antioxydant, antimicrobien et antilithiasique de la protéine majeure du lait camelin qui est la caséine : ainsi que celui de ses hydrolysats peptiques obtenus sur un intervalle de temps allant de 0 à 180 min d'hydrolyse. Le lait collecté présente un pH acide de 6.32 ± 0.1 avec une acidité Dornic de 17.1 ± 1 °D, la matière grasse représente 28 ± 1 g/L avec un taux de matière azotée de $4.3 \pm 0.01\%$ dont une teneur du lactosérum de 7.9 g/L et 34.08 g/L de caséine, les cendres sont à 9 ± 0.1 g/L quant au taux de matière sèche, il revient à $13 \pm 0.5\%$. Le taux d'antioxydants tels que les caroténoïdes est faible 0.16 mg/L ce qui explique la couleur blanchâtre du lait, quand à la vitamine C, sa teneur semble élevée : 25.25mg/L. La caractérisation par électrophorèse SDS-PAGE, de la caséine montre une bande avoisinant les 28 kDa et plus le temps d'hydrolyse est long, plus les bandes sont diffuses. Purifiée par la méthode RP-HPLC, la caséine présente un pic singulier à $t = 43.10$ minutes, qui diminue d'intensité au fur et à mesure que le temps d'hydrolyse augmente. La déconvolution de la bande Amide I obtenue par la technique ATR-FTIR, a montré un changement de structure notamment l'augmentation des coudes de 1.8% (caséine) à 7.38% après 180 min d'hydrolyse. Concernant l'activité antioxydante, quatre tests ont été réalisés : à savoir par les méthodes de l'acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) ABTS avec 54.63% d'inhibition pour la caséine et atteignant 83.1 % pour l'hydrolysate de 180 min. L'inhibition du radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle (DPPH) était de 30% pour la caséine et 17% pour les hydrolysats à 180 min. Les DO des tests de réduction de fer, et du molybdate, voient leur absorbance augmenter de 0.164 à 0.176 et de 0.136 à 0.7 de 15 à 180 min d'hydrolyse, respectivement. L'activité antibactérienne de la caséine révèle l'absence d'effet sur *B. megaterium* BM 11, *S. epidermis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. syringae* pv *tobaci* 1918 NCPPB, *A. baumannii* ATCC 19606, *C. parasilopsis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 24433. Tandis que tous les hydrolysats ont manifesté un effet inhibiteur sur les microorganismes sauf sur *S. aureus*, à une concentration de 80 mg/mL. La caséine et ses hydrolysats à des concentrations de 0.035-120 µg/mL favorisent la survie des lignées cellulaires Vero et A549 et leur prolifération mais manifestent un effet cytotoxique à 1120µg/mL. Les résultats des tests de l'évaluation de l'activité antivirale vis à vis du virus Cox B6 préincubé à 1 MOI sur des cellules Vero et A549 mettent en évidence l'efficacité de la caséine et l'hydrolysate de 60 min à 112µg/mL, à 100%. L'hydrolysate de 90 min était efficace à 100% sur les cellules Vero uniquement, après 72h d'incubation. L'effet antilithiasique par inhibition de formation de cristaux de la caséine est très prometteur tandis que les hydrolysats étaient inactifs.

Mots Clés : Caséine cameline, hydrolysats peptiques, antioxydants, antimicrobiens, antiviral, antilithiasique.

Abstract

Camel milk has always been a major traditional staple in the nutrition of the pastoral nomadic people, its benefits include its ability to promote the growth of the body, prevent diabetes, stimulate immunity, blood stream and alleviate allergic reactions. For the purpose of this study, we broadly define physicochemical properties of camel milk collected in April, from Laghouat region and to investigate the antioxidant, antimicrobial antiviral potential and anti-lithiasis properties of casein: major protein camel milk and those of its peptic hydrolysates after 180 min of hydrolysis. The pH of collected milk was 6.32 ± 0.1 and 17.1 ± 1 °D Dornic acidity, fat content rose to $28 \text{ g / L} \pm 1$ while nitrogen content was found to be 4.3 ± 0.01 . Casein is the dominant protein group with 34.08 g / L followed by whey 7.9 g / L; Ash content was $9 \text{ g / L} \pm 0.1$ and 13 ± 0.5 dry matter. The mean content of carotenoids was 0.16 mg/L which explain opaque white colour of milk, the amount of vitamin C seems high 25.25 mg / L. Molecular weights profile of milk casein separated by SDS-PAGE electrophoresis gave an estimation of 28kDa while casein hydrolysates show high electrophoretic mobility. The RP-HPLC procedure was used for the separation of casein, different chromatographic profiles were obtained at 43.10 min elution time, change in secondary structure of casein and casein hydrolysates obtained by ATR- FTIR spectrum and deconvolution curves were obtained. Increase in the contents of β -turn 7.38% in casein hydrolysates of 180 min was noticed compared to the original casein sample 1.8%. Samples were screened for possible antioxidant activities following four tests, among them free radical scavenging activity 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Casein showed 54.63% and 30% scavenging activity compared to 83.1 % 17% for 180 min hydrolysis sample respectively. Concerning antioxidant capacity of the reducing power and phosphomolybdenum methods, absorbance rose from 0.164 to 0.176 and from 0.136 to 0.7 from 15 to 180 min hydrolysis respectively. Antimicrobial activity was tested by using the inhibition zone assay on LB-agarose plates against several Gram positive and Gram-negative bacteria, casein has no effect on *B. megaterium* BM 11, *S. epidermis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. syringae* pv *tobaci* 1918 NCPPB, *A. baumannii* ATCC 19606, *C. parasilopsis* ATCC 22019, *C. albicans* ATCC 24433, while all hydrolysates showed an inhibitory effect on microorganisms except for *S. aureus*, at a concentration of 80 mg / mL. The antiviral activity was assessed *in vitro* against Coxsackie B6 virus (Cox B6), by evaluating the amount of viable cell (Vero and A549 cells) after the addition of Cox B6 pre-treated with casein and the hydrolysate for 72h. Samples revealed cytotoxicity at 1120µg/mL. Casein and 60 min hydrolysate (112µg/mL) were able to protect Vero and A549 cells from harmful viral infection (1MOI), at a rate of 100%, while 90 min hydrolysate was efficient on Vero cells only. Anti lithiasis test was assessed and casein could prevent calculus formation unlike hydrolysates.

Key words: Camel casein, pepsin hydrolysates, antioxidant, antimicrobial, antiviral, antilithiasis.