

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERRI DE TIZI OUZOU, ALGERIE
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE - MICROBIOLOGIE



Thèse



En vue d'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle (LMD) en Sciences
Biologiques
Spécialité : Biochimie, Microbiologie et Sciences Alimentaires

Thème

**Les caséines alpha S dans le lait de dromadaire :
comportement physico-chimique et activités biologiques des entités
protéiques isolées et de leurs peptides.**

Présentée par : **ADDAR Lydia**

Devant le jury :

Président :	Mme Fernane Farida	Professeur	UMMTO
Directeur de thèse :	Mr Mati Abderrahmane	Professeur	UMMTO
Examineurs :	Mme Kaouche-Adjlane Soumeya	MCA	UMBB- U Boumerdès
	Mr Kadri Nabil	MCA	UAMOB- U Bouira
	Mr Cherifi Fateh	MCA	USTHB
	Mme Tazdaït-Salah Rym	MCA	UMMTO

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à mon directeur de thèse monsieur **MATI Abderrahmane**, professeur en Biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Pour m'avoir permis de rejoindre son équipe de recherche, en me proposant ce sujet, pour sa disponibilité, sa compréhension et ses qualités tant scientifiques qu'humaines, qu'il en soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail :

Mme FERNANE Farida, professeur à l'Université de Tizi-Ouzou

Mme KAUCHE-ADJLANE Soumeya, maître de conférences à l'Université de Boumerdès.

Mr KADRI Nabil, maître de conférences à l'Université de Bouira

Mr CHERIFI Fateh, maître de conférences à l'Université des Sciences et de la Technologie Houari-Boumédiène

Mme TAZDAÏT-SALAH Rym, maître de conférences à l'Université de Tizi-Ouzou

J'adresse ma plus grande gratitude et mes plus chaleureux remerciements au docteur **BENSOUICI Chawki**, directeur de laboratoire de biochimie au centre de recherche en biotechnologie (CRBt) de Constantine, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir permis de mener une partie de mon travail dans les meilleures conditions. Je lui suis très reconnaissante pour ses encouragements et son aide. Ainsi je tiens à remercier tous les membres de son équipe.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur **DEGRAEVE Pascal**, professeur des Universités en Sciences des Aliments (IUT Lyon 1), de m'avoir accueillie au sein de son équipe au laboratoire BioDyMIA, pendant mon séjour en France. Je le remercie vivement pour son aide et sa compréhension.

Je remercie également **Mme OULAHAL Nadia**, responsable du pôle microbiologie au sein du laboratoire BioDyMIA, pour son aide et sa compréhension, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à **Mme ADT Isabelle**, Maître de Conférences en Biochimie Analytique et Technologie Alimentaire (IUT Lyon 1), pour m'avoir initié à la chromatographie (FPLC) et pour tous ses conseils, sa disponibilité et sa compréhension. Elle peut être assurée de mon sincère respect et de ma profonde gratitude.

Je remercie chaleureusement **Mme SMAÏL-SAADOUN Nouria**, professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour ses encouragements, son écoute et son soutien moral dans mes moments les plus difficiles.

Je témoigne toute ma gratitude à tous les membres de l'équipe de laboratoire LABAB, pour leur accueil chaleureux au sein de l'équipe, pour leurs conseils, leur précieuse aide et leurs encouragements.

Je tiens à remercier plus spécialement ***Ilhem, Lylia, Hassiba, Saida, Amel, Mohamed, Rezkia, Fahima, Lamia et Yakoub*** pour leur soutien indéfectible et d'avoir cru en moi. Je vous suis très reconnaissante mes ami (e)s.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à mes chers parents, à qui je dédie ce travail, et qui m'ont toujours soutenu durant toutes mes années d'études et m'avoir encouragé pour que j'aille le plus loin possible. Merci d'avoir toujours été là en cas de besoin. Je remercie aussi vivement ma sœur ***Sarah*** et mes frères ***Hocine*** et ***Youcef***, pour leur confiance en moi, leur amour et leurs encouragements.

Merci à tous



***Table des
matières***

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction générale 01

I/ Synthèse bibliographique

1.1. Aperçu sur le dromadaire	03
1.2. Caractéristiques du lait de dromadaire.....	04
1.2.1. Propriétés physico-chimiques.....	04
1.2.2. Composition chimique globale	05
1.2.3. Les protéines du lait de dromadaire.....	07
1.2.3.1. Les protéines du lactosérum.....	07
1.2.3.2. Les caséines.....	07
1.2.4. Les caséines α S.....	10
1.2.4.1. Données physico-chimiques et moléculaires.....	10
1.2.4.2. Données structurales.....	12
1.4. Propriétés biologiques à effets thérapeutiques	14
1.4.1. Activités biologiques dues au lait et aux protéines.....	15
1.4.2. Activités biologiques dues aux peptides.....	18
1.4.2.1. Les peptides bioactifs issus des caséines α S.....	20
1.4.2.2. Application des peptides bioactifs.....	23

II/ Matériels & méthodes

2.1. Matériels.....	26
2.1.1. Appareillage.....	26
2.1.2. Matériel biologique.....	27
2.1.2.1. Echantillons de lait.....	27
2.1.2.2. Enzymes et protéines étalon.....	27
2.1.3. Produits chimiques et réactifs spécifiques.....	27
2.2. Méthodes d'analyse.....	28
2.2.1. Mesure du pH.....	28
2.2.2. Dosage de la teneur en protéines.....	28
2.2.3. Isolement des caséines totales.....	29
2.2.4. Séparation et purification des caséines α S par chromatographie	29
2.2.4.1. Méthode de séparation adoptée en basse pression sur Biorad.....	29
2.2.4.2. Méthode adoptée en FPLC avec ÄKTA pure.....	31
2.2.4.3. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)	31
2.2.5. Caractérisation électrophorétique des préparations.....	33
2.2.5.1. Électrophorèse en présence d'urée et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-urée)	33
2.2.5.2. Électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS).....	34

2.2.6. Sensibilité des caséines α S à l'action des enzymes gastro-intestinales.....	35
2.2.7. Hydrolyse enzymatique.....	35
2.2.7.1. Hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine.....	35
2.2.7.2. Hydrolyse par la pepsine.....	36
2.2.7.3. Détermination du degré d'hydrolyse.....	36
2.2.8. Evaluation des activités biologiques.....	37
2.2.8.1. Activité antioxydante.....	37
2.2.8.1.1. Test de piégeage du radical ABTS.....	38
2.2.8.1.2. Test de piégeage du radical hydroxyle.....	38
2.2.8.1.3. Test de chélation du fer.....	39
2.2.8.1.4. Test de blanchissement du β -carotène.....	39
2.2.8.2. Activités enzymatiques.....	40
2.2.8.2.1. Activité inhibitrice de la tyrosinase.....	40
2.2.8.2.2. Activité inhibitrice de l'uréase.....	41
2.2.8.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrolysat pepsique.....	42
2.2.9. Analyse statistique.....	42

III/ Résultats & discussion

Chapitre 1 : Isolement, purification et caractérisation des caséines α S cameline

3.1.1. Analyse physico-chimique du lait collecté.....	43
3.1.2. Isolement et contrôles électrophorétiques des préparations.....	44
3.1.2.1. Isolement des caséines totales.....	44
3.1.2.2. Comportement électrophorétique des caséines totales.....	44
3.1.3. Isolement et purification des caséines α S	46
3.1.3.1. Résultats des protocoles de séparations chromatographiques adoptés.....	46
3.1.3.2. Contrôle de pureté en RP-HPLC.....	48
3.1.3.3. Caractérisation électrophorétique des caséines α S.....	49

Chapitre 2 : Activités biologiques des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse

3.2.1. Sensibilité des caséines α S aux enzymes gastro-intestinales.....	51
3.2.1.1. Choix du rapport E/S	51
3.2.1.2. Action des enzymes sur les caséines α S.....	52
3.2.1.3. Evaluation du degré d'hydrolyse	56
3.2.2. Evaluation des activités biologiques.....	58
3.2.2.1. Activité antioxydante.....	58
3.2.2.2. Activités inhibitrices d'enzymes.....	63
3.2.2.3. Activité antibactérienne.....	67

Conclusion générale..... 71

Références bibliographiques..... 74

Liste des abréviations

A

α S-CN : caséines alpha S
 α S₁-CN : caséine alpha S₁
 α S₂-CN : caséine alpha S₂
ABTS : acide 2,2'-azino-bis
(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

C

CN : caséine
CN_c : caséine cameline
CN_B : caséine bovine

E

EDTA : éthylènediaminetétraacétique
E/S : enzyme / substrat
E : échantillon

I

IC₅₀ : concentration inhibitrice médiane

P

PM : poids moléculaire
p/v : poids /volume
pH : potentiel d'hydrogène
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

S

SDS : dodécyl sulfate de sodium

v

v/v : volume/volume

U

UFC : Unités Formant Colonies
USDA : Département de l'Agriculture des États-Unis

B

BSA : albumine sérique bovine
BHA : Hydroxyanisole butylé
BHT : Butylhydroxytoluène
 β -CN : caséine bêta

D

DEAE : Diéthylaminoéthyl
DO : densité optique
DH : degré d'hydrolyse

F

FPLC : chromatographie liquide rapide des protéines
FAO : Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture

M

MM : masse moléculaire
2-ME : 2- mercaptoéthanol
MHB : Bouillon Mueller-Hinton
m/v : masse/volume

R

RP-HPLC : chromatographie liquide à haute performance en phase inverse

T

TEMED : N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine
TFA : acide trifluoroacétique
TNBS : acide trinitrobenzène-sulfonique
TCA : acide trichloracétique

k

κ -CN : caséine kappa

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Effectif des dromadaires en Algérie selon FAO 2017	04
2	Production du lait de dromadaire en Algérie selon FAO 2017	04
3	Schéma représentatif de modèle de submicelle proposé par Schmidt (1982)	08
4	Séquence primaire de la caséine αS_1 variant A	11
5	Séquence primaire de la caséine αS_1 variant B	11
6	Séquence primaire de la caséine αS_2	12
7	Séquences du signal peptide des caséines αS camelines et bovines	13
8	Alignement des séquences des caséines αS camelines et bovines	13
9	Processus de production des peptides bioactifs	19
10	Dosage des protéines par la méthode de Lowry <i>et al.</i> (1951)	28
11	Étapes suivies pour l'isolement et la purification des caséines αS camelines	30
12	Appareillage de chromatographie liquide basse pression	32
13	Appareillage de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)	32
14	Appareillage de chromatographie liquide à haute performance HPLC	32
15	Courbe de calibration en PAGE-SDS en utilisant un Kit de protéines étalons	35
16	Réaction de TNBS avec le groupement amine primaire	36
17	Courbe étalon du dosage des groupements amines libres réalisée avec L-Leucine	37
18	Réaction de catalyse de l'urée par l'uréase	41
19	Profils en PAGE-urée et en PAGE-SDS des caséines bovines et camelines	45
20	Chromatogramme de séparation des αS -CN camelines sur DEAE-Cellulose ; PAGE-urée des fractions F1 et F2 collectées	46
21	Chromatogramme en FPLC sur DEAE-Sépharose des αS -CN camelines ; PAGE-urée des fractions F1 et F2 collectées	47
22	Chromatogramme en RP-HPLC et PAGE-urée des αS -CN	48
23	PAGE-urée et PAGE-SDS des caséines αS camelines	49
24	PAGE-SDS des hydrolyses enzymatiques des caséines αS	51
25	Profils en RP-HPLC des hydrolysats tryptiques des αS -CN	53
26	Profils en RP-HPLC des hydrolysats chymotrypsiques des αS -CN	54
27	Profils en RP-HPLC des hydrolysats pepsiques des αS -CN	55
28	Profils des hydrolysats (trypsine/chymotrypsine) des αS -CN en RP-HPLC	57
29	Piégeage des radicaux (ABTS / hydroxyle) en présence des αS -CN et de leurs hydrolysats	59
30	Activité de chélation du fer et oxydation lipidique en présence des αS -CN et de leurs hydrolysats	61
31	Activité inhibitrice de la tyrosinase des αS -CN à différentes concentrations	64
32	Activité inhibitrice de la tyrosinase des αS -CN à 200 $\mu\text{g/mL}$	64
33	Activité inhibitrice de l'uréase des αS -CN à différentes concentrations	66
34	Activité inhibitrice de l'uréase des αS -CN à 200 $\mu\text{g/mL}$	66
35	Pourcentage d'inhibition de <i>S. aureus</i> , <i>L. innocua</i> et <i>E. coli</i> en présence de αS -CN de leur hydrolysat pepsique	68

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Composition chimique globale (%) du lait de dromadaire selon différents auteurs en comparaison avec le lait de vache	06
II	Caractéristiques physico-chimiques des caséines du lait de dromadaire et du lait de vache	09
III	Composition en résidus d'acides aminés des caséines α S camelines et bovines	14
IV	Peptides opiacés dérivés des caséines α S	20
V	Peptides antihypertenseurs dérivés des caséines α S	21
VI	Produits commerciaux et ingrédients à base des peptides issus de caséines	25
VII	Mesure du pH et teneur en protéines (g/L) des différents laits collectés	43
VIII	Comparaison des MM des caséines α S camelines déterminées par PAGE- SDS avec celles rapportées par quelques auteurs	50
IX	Degré d'hydrolyse des caséines α S camelines (trypsine et chymotrypsine)	56
X	Activité de piégeage des radicaux (ABTS et hydroxyle) des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse	59
XI	Activité chélatante de l'ion ferreux et oxydation lipidique des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse	61
XII	Pourcentage d'inhibition d' <i>E.coli</i> , <i>S.aureus</i> et <i>L.innocua</i> par les caséines α S et leurs fractions d'hydrolyse pepsique	69

Résumé

De nombreuses études sont entreprises de par le monde ces dernières années afin de confirmer ou d'infirmer les allégations de santé qu'on prête au lait camelin depuis des temps très lointains. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés aux caséines α S de ce lait, en vue de leur isolement, purification, caractérisation et évaluation de certaines activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et inhibitrice d'enzymes) liées soit à ces protéines natives, soit à leurs fragments peptidiques générés par des hydrolyses enzymatiques par la trypsine, la chymotrypsine ou la pepsine.

Les caséines α S ont été isolées et purifiées des caséines totales par chromatographie échangeuse d'anions en basse pression sur DEAE-Cellulose et en FPLC sur DEAE-Sépharose. Le diagramme de séparation chromatographique retenu après une série de mises au point est avantageux à plus d'un titre, du fait qu'il a permis d'obtenir, en une seule étape, les caséines α S et β avec un haut degré de pureté, vérifié par électrophorèses (PAGE-urée, PAGE-SDS) et par RP-HPLC sur une C8.

Les tests de sensibilité des caséines α S purifiées vis-à-vis de l'action des enzymes suscités ont montré que ces protéines sont plus sensibles à l'action de la chymotrypsine, suivis respectivement par la trypsine et la pepsine.

L'activité antioxydante a été évaluée par piégeage des radicaux libres (ABTS et hydroxyle), chélation du fer et peroxydation lipidique. Les activités inhibitrices d'enzymes (uréase et tyrosinase), sont mesurées respectivement selon les méthodes indophénol et dopachrome. L'activité antibactérienne a été mise en évidence selon la méthode de microdilution contre deux souches à Gram positif (*Listeria innocua* ATCC 33090 et *Staphylococcus aureus* CNRZ 3) et une souche à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Les activités antioxydantes et inhibitrices d'enzymes sont améliorées après le traitement enzymatique par la trypsine et la chymotrypsine. Les meilleures activités ont été enregistrées avec la chymotrypsine (pour l'activité antioxydante et inhibitrice de tyrosinase) tandis que la trypsine génère des peptides possédant une meilleure activité inhibitrice de l'uréase. Les hydrolysats fractionnés par ultrafiltration ont révélé que les fractions peptidiques de faible poids moléculaire ($PM < 10$) présentent les effets les plus remarquables.

Enfin, l'activité antibactérienne des fractions protéiques étudiées, montre que la fraction peptidique de petite taille (< 1 KDa) exprime l'effet le plus marqué contre l'ensemble des souches testées. Les pourcentages d'inhibition après 24 h d'incubation à 1mg/mL ont été de : $58,98 \pm 1,37$, $36,4 \pm 1,44$ et $28,57 \pm 0,71\%$, respectivement pour *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Mots clés : lait camelin, caséines α S, peptides, purification, hydrolyse enzymatique, activités biologiques

Abstract

In recent years, several investigations have been undertaken to confirm or refute the health claims attributed to camel milk. In this context, we were interested in camel milk α S-casein for the isolation, purification, characterization and evaluation of some biological activities (antioxydant, antibacterial and enzyme inhibitory activities) related either to this native protein or to the peptides generated by enzymatic hydrolysis with trypsin, chymotrypsin or pepsin.

The α S-caseins were isolated and purified from the total caseins by using anion-exchange chromatography at low pressure on DEAE-cellulose and at FPLC on DEAE-sepharose. The chromatographic separation diagram adopted is advantageous. In fact, this allows isolating beta and α S-caseins with a high degree of purity in a single step, verified by electrophoresis (PAGE-urea, PAGE-SDS) and by RP-HPLC on C8.

Sensitivity tests of purified α S caseins to the action of the above mentioned enzymes have shown that these proteins are more sensitive to the action of chymotrypsin, followed respectively by trypsin and pepsin.

The antioxidant activity was evaluated by using free radical scavenging (ABTS and hydroxyl), iron chelation and lipid peroxidation assays. The enzyme inhibitory activities (urease and tyrosinase) were determined by using the indophenol and dopachrome methods, respectively. The Antibacterial activity was detected by microdilution assay against two Gram-positive strains (*Listeria innocua* ATCC 33090 and *Staphylococcus aureus* CNRZ 3) and one Gram-negative strain (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Antioxidant and enzyme inhibitory activities were improved after enzymatic treatment with trypsin and chymotrypsin. The best activities were recorded with chymotrypsin (for antioxidant and tyrosinase inhibitory activities) while trypsin generated peptides with better urease inhibitory activity. Nevertheless, peptide fractions of low molecular weight (PM<10) had the most remarkable effects.

Finally, the antibacterial activity of the protein fractions showed that the small peptide fraction (<1 KDa) exhibited the strongest effect against all tested strains. The inhibition percentages after 24 h incubation at 1mg/mL were $58,98 \pm 1,37$, $36,4 \pm 1,44$ and $28,57 \pm 0,71\%$, respectively for *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: camel milk, α S-caseins, peptides, purification, enzymatic hydrolysis, biological activities

المخلص

أجريت في السنوات الأخيرة عدة دراسات على حليب الإبل، بصدد إثبات الإدعاءات الصحيّة المنسوبة إليه منذ فترة طويلة، وقد انصبّ اهتمامنا في هذا السياق حول كازيينات α S هذا الحليب، لعزلها وتنقيتها وتوصيفها، وتقييم بعض الأنشطة البيولوجية (المضادة للأكسدة، المثبطة لعمل الإنزيمات والمضادة للبكتيريا) المتعلقة إمّا بهذه البروتينات الأصلية أو الببتيدات الناتجة عن تحليلها الإنزيمي بواسطة التربسين، الكيموتربسين والبيبين.

لقد تم عزل الكازينات α S عن الكازينات الإجمالية من خلال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني بالضغط المنخفض على DEAE-Cellulose و FPLC على DEAE-Sépharose . مخطط الفصل الكروماتوغرافي المعتمد بعد سلسلة من التعديلات مفيد في أكثر من طريقة؛ حيث يسمح بالحصول على الكازينات α S و β بدرجة نقاوة عالية، تمّ التحقق منها بواسطة الرحلان الكهربائي (PAGE-urée ، PAGE-SDS) و RP-HPLC على C8 .

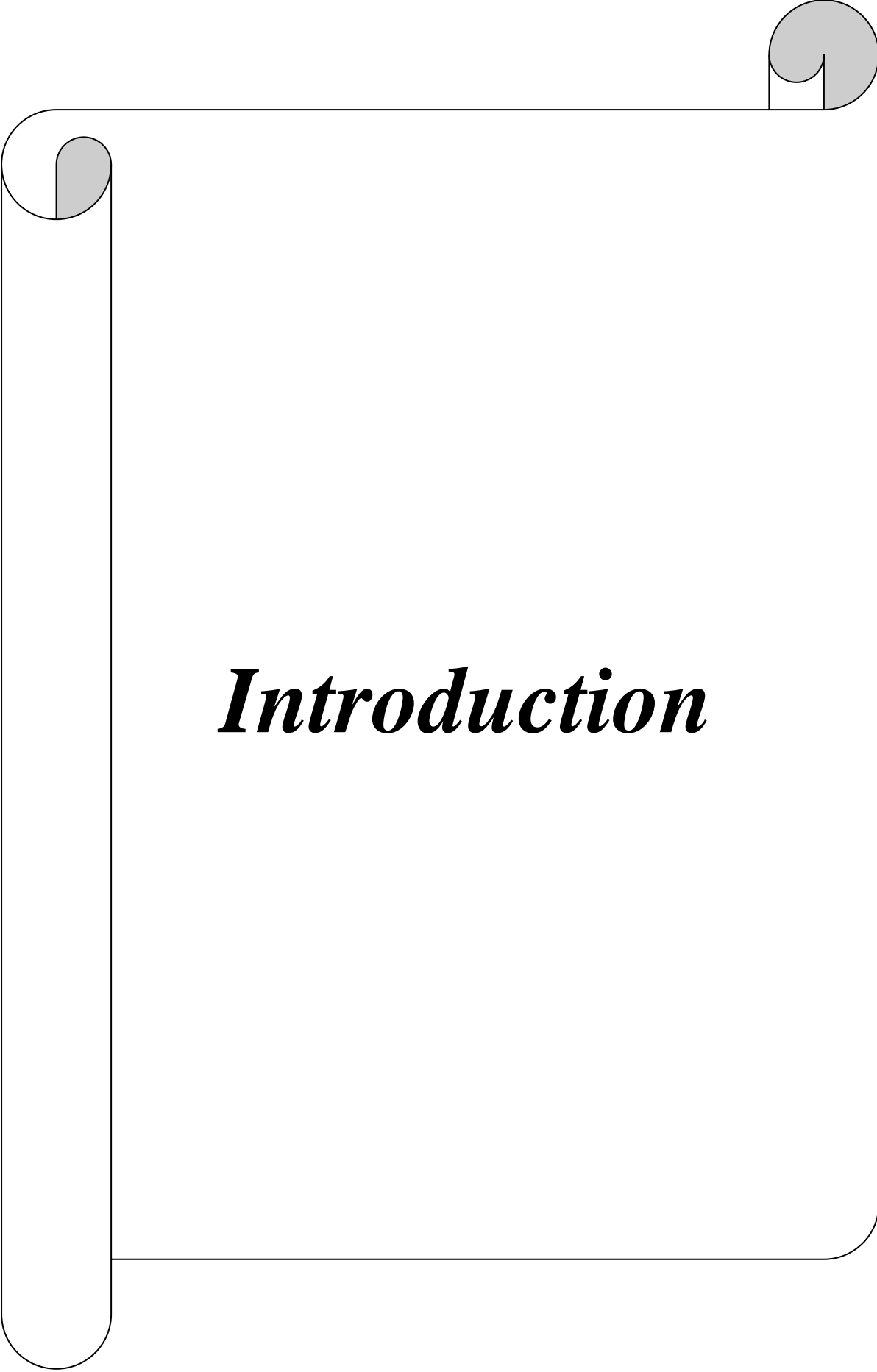
أظهرت اختبارات حساسية الكازينات لعمل الإنزيمات المذكورة أعلاه، أنّ هذه البروتينات أكثر حساسية لعمل الكيموتربسين يليها التربسين والبيبين.

تمّ تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق محاصرة الجذور الحرة (hydroxyle و ABTS) ، إزالة الحديد والأكسدة الدهنية. الأنشطة المثبطة للإنزيمات (اليورياز والتيروزيناز) تم قياسها وفق طرق الأندروفينول والدوباكروم على التوالي. أما النشاط المضاد للبكتيريا فقد تم الكشف عنه بواسطة التخفيف الجزئي (microdilution) ضد سلالتين بكتيريتين غرام موجب (*Staphylococcus aureus* CNRZ 3 و *Listeria innocua* ATCC 33090) وسلالة غرام سالب (*Escherichia coli* ATCC 25922).

الأنشطة المضادة للأكسدة والإنزيمات المثبطة أبدت تحسنا بعد المعالجة الأنزيمية مع التربسين والكيموتربسين. أفضل الأنشطة تم تسجيلها باستخدام الكيموتربسين (لنشاط المثبط لمضادات الأكسدة والتيروزيناز) بينما يولد التربسين الببتيدات ذات نشاط تثبيطي أفضل لليورياز. كشفت التحليلات المجزأة بواسطة الترشيح الفائق أن الببتيدات منخفضة الوزن (اقل من 10 كيلو دالتون) كان لها التأثيرات الأكثر بروزاً.

أخيراً، يوضح النشاط المضاد للبكتيريا في أجزاء البروتين التي تمت دراستها، أن الببتيدات صغيرة الوزن (اقل من 1 كيلو دالتون) لها التأثير الأقوى ضد جميع السلالات التي تم اختبارها. نسب التثبيط بعد 24 ساعة من الحضانة بتركيز 1 ملغ / مل هي $1,37 \pm 58,98$ ، $1,44 \pm 36,4$ و $0,71 \pm 28,57$ % على التوالي بالنسبة *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*

الكلمات المفتاحية: حليب الإبل، كازينات α S، ببتيدات، التحليل الإنزيمي، الأنشطة البيولوجية



Introduction

Introduction générale

La vocation nutritionnelle du lait est toujours de mise dans les différentes régions du monde. Cet aliment, qui convient aux besoins de différentes catégories d'âge et d'états physiologiques, est consommé tel quel ou transformé en divers produits dérivés (fromages, lait fermentés, yaourt, boissons, crèmes, glaces, produits alimentaires intermédiaires...), que l'industrie laitière a su tirer de sa richesse en nutriments de base (glucides, lipides et protides), mais aussi en calcium et en diverses vitamines et oligo-éléments.

L'une des spécificités du lait, quelle que soit l'espèce d'où il provient (vache, chèvre, brebis, chamelle, bufflonne...etc), c'est que c'est une source de protéines alimentaires dotées d'une très bonne valeur biologique, car facilement dégradables et assimilables par l'organisme, en plus de fournir des acides aminés essentiels en quantité. Cette caractéristique qui fait du lait une source de protéines animales « relativement bon marché », explique la demande sans cesse croissante en ce produit de première importance à travers le monde.

En dehors de cet aspect qui représente un chiffre d'affaire important dans les balances commerciales des états, les recherches menées ces dernières décennies ont permis de mettre en relief des propriétés fonctionnelles intéressantes de ces protéines (hydratation, activités de surface...) ainsi que des activités biologiques variées de leurs produits d'hydrolyse enzymatique.

En effet, de nombreux peptides à activités biologiques probantes ont été mis en évidence au sein de ces macromolécules : peptides anti-hypertensifs, opiacés et anti-opiacés, anti-thrombotiques, immunomodulateurs, inhibiteurs d'enzymes, transporteurs des oligoéléments ou encore des modulateurs de fonctions. Ces peptides sont susceptibles d'intervenir dans des mécanismes physiologiques en régulant des fonctions essentielles de l'organisme (digestion, immunité, système nerveux et cardiovasculaire). Vu leur action, leurs propriétés technofonctionnelle et nutritionnelle, ces peptides sont destinés à être utilisés dans différents domaines tels que l'industrie alimentaire (comme ingrédient fonctionnel) et/ou pharmaceutique, rehaussant ainsi l'intérêt de remplacer les molécules de synthèse, qui posent divers problèmes de santé publique, par des molécules naturelles, qui sont dotées des mêmes propriétés.

Par ailleurs, la transposition des connaissances établies sur le lait de référence (bovin) aux laits d'autres espèces, se heurte souvent à l'existence de différences notables et à des singularités qui sont porteuses ou non de conséquences d'ordre structurales et/ou comportementales d'intérêt.

C'est le cas notamment du lait de dromadaire, dont la valeur nutritionnelle est reconnue et qui a la particularité d'être le seul lait qui se rapproche du lait humain, vu l'absence en son sein d'une protéine allergène, la β -lactoglobuline. Ce lait, qui possède d'autres spécificités liés à sa composition, est traditionnellement utilisé par les populations des régions arides et semi arides de notre pays pour les « vertus thérapeutiques » qu'on lui prête, en plus de sa destinée première pour le chamelon, ou sa transformation en produits fermentés.

C'est pour ces raisons que plusieurs travaux lui sont consacrés de par le monde ces derniers temps afin de vérifier le bien-fondé ou non de ces allégations de santé, tout en élucidant autant que possible les relations structure / propriété / fonction liées aux protéines de ce lait, qui présentent des aptitudes technologiques limitées, un système anti-microbien puissant et plusieurs protéines sériques qu'on ne trouve que dans ce lait et dont les rôles ne sont pas encore connus.

Dans ce cadre, nous nous sommes proposé de mener une étude orientée spécifiquement sur les caséines α S du lait camelin, qui sont très peu explorées et dont les implications fonctionnelles et technologiques sont à mettre en évidence.

Le but assigné à cette présente étude est de contribuer à avoir une meilleure connaissance des protéines du lait camelin tout en recherchant en son sein des peptides doués d'activités biologiques susceptibles d'être exploités dans des domaines d'utilisation appropriés.

Nos objectifs ont consisté graduellement à :

- utiliser un protocole approprié et mettre au point une méthode d'isolement et de purification de cette entité protéique, qui puisse nous permettre tout au moins de séparer les caséines α S de la caséine β , qui est abondante dans ce lait ;
- caractériser cette fraction protéique et tester sa sensibilité aux hydrolyses par les enzymes gastro-intestinales telles la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine ;
- réaliser des hydrolyses enzymatiques avec ces enzymes et fractionner les hydrolysats par ultrafiltration ;
- évaluer pour la fraction α S native, que pour les fragments d'hydrolyse, certaines activités biologiques d'intérêt, choisies en raison de leurs implications en santé publique :
 - activité antioxydante en utilisant plusieurs approches complémentaires (piégeage de radicaux ABTS et hydroxyle, chélation du fer et oxydation de l'acide linoléique) ;
 - activité inhibitrice d'enzymes (inhibition de la tyrosinase et de l'uréase) ;
 - enfin, activité antibactérienne.



*Synthèse
bibliographique*

I. Synthèse bibliographique

1.1. Aperçu sur le dromadaire

Selon les statistiques rapportées en 2017 par l'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la population cameline mondiale est estimée à environ 34,83 millions de têtes, répartie dans 47 pays et dont environ 83% de la population est localisée en nord et à l'est de l'Afrique et le reste dans le sous-continent indien et au Moyen-Orient. La Somalie est classée en tête de liste avec une population de 7,22 millions de têtes.

Cette population est représentée majoritairement par le genre *Camelus* qui se scinde en deux espèces : *Camelus bactrianus*, le chameau à deux bosses et *Camelus dromedarius*, le dromadaire ayant une seule bosse qui constitue l'espèce dominante (84% de la population cameline).

Le dromadaire est un animal polyvalent qui joue un rôle socio-économique primordial dans les zones pastorales arides et semi-arides. Il répond en effet aux multiples besoins de ces populations en leur fournissant du lait, de la viande et en leur servant comme moyen de transport. En outre, sa peau et ses poils sont utilisés dans la fabrication des chaussures, des ceintures et dans la confection des vêtements et des tentes.

Le lait de dromadaire fait partie du régime alimentaire des bédouins. Il est même souvent la seule ressource alimentaire d'origine animale pour ces peuplades. Dans la plupart des zones pastorales sahariennes, il est considéré comme l'aliment de base tout au long de l'année (Al-Haj et Al-Kanhal, 2010). Dans des conditions environnementales hostiles (température et salinité élevées, absence d'eau, manque de ressources végétales...ect), le dromadaire produit plus de lait et pour une longue période que tous les autres animaux laitiers (Farah *et al.*, 2007).

Il est connu que les dromadaires peuvent stocker dans leurs bosses jusqu'à 36 kg de graisse qui sert de source d'eau et d'énergie lorsque les nutriments ne sont pas disponibles. Ces bosses permettent au chameau de parcourir jusqu'à 160 km sans consommer de l'eau (Faye, 2015).

En Algérie, ces dernières années la population cameline est en constante évolution (Figure 1). En 2017, l'effectif est estimé à environ 381 882 têtes avec une production laitière de 14 000 tonnes/an (Figure 2) (FAO, 2017).

Cette croissance qui s'explique en partie par la forte demande en ce lait et la mise en place des fermes d'élevage semi-intensif, a donné lieu à l'implantation au cours de cette dernière décennie de petites unités de commercialisation (lait cru / lait pasteurisé) et de transformation de ce lait en lait fermenté et fromage frais (notamment à Ghardaïa). Ce qui a permis un tant soit peu de réduire la tension sur la forte demande en lait bovin au sud du pays, même si le prix du litre de lait camelin n'est pas à la portée de toutes les bourses, vue les allégations santé dont ce produit nutritif jouit. En effet, ce lait est utilisé traditionnellement depuis des temps très lointains dans des usages préventifs et thérapeutiques où on lui reconnaît notamment des propriétés anti-infectieuses anti-inflammatoires et hypoglycémiantes (Konuspayeva *et al.*, 2004 ; Agrawal *et al.*, 2007).

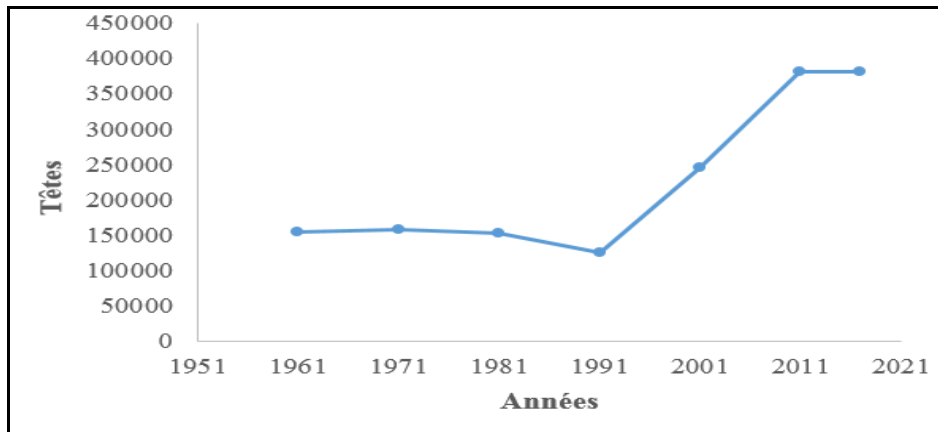


Figure 1 : Effectif des dromadaires en Algérie selon FAO 2017.

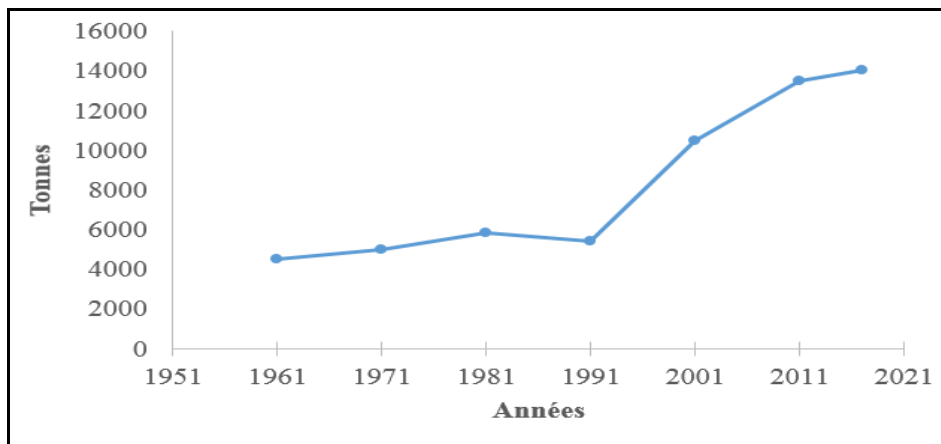


Figure 2 : Production du lait de dromadaire en Algérie selon FAO 2017.

1.2. Caractéristiques du lait de dromadaire

1.2.1. Propriétés physico-chimiques

Le lait de dromadaire est d'une couleur blanche opaque, un goût légèrement sucré, acide et parfois même salé. Cela dépend généralement du type de fourrage et de la disponibilité d'eau (Hashim, 2002 ; Al-Haj et Al-Kanhal, 2010).

Le pH du lait camelin 6,4 à 6,7 et il est similaire à celui du lait de brebis, mais légèrement inférieur à celui du lait de vache (Mehaia *et al.*, 1995 ; Al-Haj et Al-Kanhal, 2010). Sa densité moyenne est de 1,029 g/cm, alors que son point de congélation se situe entre - 0,57 °C et - 0,61 °C (Singh *et al.*, 2017).

La viscosité du lait de dromadaire à 20 °C est de 1,72 mPa.s, alors que la viscosité du lait de vache dans les mêmes conditions est de 2,04 mPa.s (Khaskheli *et al.*, 2005 ; Singh *et al.*, 2017).

1.2.2. Composition chimique globale

Les laits des différents mammifères renferment les mêmes constituants principaux, à savoir, l'eau, les protéines, les graisses, les glucides, les vitamines et les minéraux. Toutefois, leurs proportions peuvent varier d'une façon notable d'une espèce animale à l'autre, et à un degré moindre, d'une race à l'autre au sein de même espèce. Dans tous les cas, la composition nutritionnelle des laits de chaque espèce est remarquablement bien adaptée aux besoins du jeune.

La composition du lait de dromadaire a été étudiée par différents auteurs dans le monde (Tableau I) et selon ces auteurs la composition de ce lait est avérée moins stable comparativement aux laits d'autres espèces. Cependant, ces variations pourraient être attribuées à plusieurs facteurs tels que : les procédures analytiques de mesure, les conditions géographiques, l'alimentation, la race, la période de lactation, l'âge et le nombre de traite (Haddadin *et al.*, 2008 ; Shuiep *et al.*, 2008 ; Al-Haj et Al-Kanhal, 2010 ; Khalesi *et al.*, 2017).

L'eau est un facteur important qui affecte la composition du lait camelin. Un régime riche en eau donne un lait ayant un taux de 86 à 88%, alors qu'en période de sécheresse, la teneur passe à 90% (Yagil et Etzion, 1980 ; Khan et Iqbal, 2001). Ce mécanisme d'adaptation particulier a pour avantage l'hydratation du chameau durant la période de sécheresse. Ces variations en teneur d'eau affectent d'une façon directe la teneur des autres composés du lait (Shuiep *et al.*, 2008).

Même si sa composition en minéraux est semblable à celle du lait de vache, en revanche le lait de dromadaire présente des teneurs plus élevées en oligo-éléments. La teneur totale en minéraux est généralement exprimé en cendres totales, elle varie de 0,7 à 1,2% (Merin *et al.*, 2001 ; Farah, 2011). Les principaux sels minéraux sont les chlorures, les phosphates et les citrates (de potassium, de sodium, de calcium et de magnésium). Bien que les sels représentent moins de 1% du lait, ils influencent l'état physique et la stabilité de ce dernier, en particulier le complexe phosphocasinat (Farah, 2004 ; 2011).

Le lait de dromadaire se singularise par sa richesse en niacine (vitamine B₃) et en acide ascorbique (vitamine C). Cette dernière se trouve à des teneurs trois à cinq fois plus élevées (25 à 60 mg/mL) que son homologue bovin (3 à 23 mg/mL) (Haddadin *et al.*, 2008 ; Farah, 2011).

Cette caractéristique est importante du point de vue nutritionnel et le lait de dromadaire peut être une source alternative de vitamine C dans les zones arides où les fruits et légumes sont faiblement disponibles.

Selon le rapport de l'USDA en 2009, 250 mL de lait de dromadaire fournit un apport vitaminique quotidien de l'adulte estimé à 15,5 ; 8,25 et 5,25% respectivement de cobalamine (B₁₂), de riboflavine (B₂) et de vitamine A alors que l'acide ascorbique (vitamine C), la thiamine (B₁) et la pyridoxine (B₆) représentent le même taux chacun (soit 10,5%) de l'apport quotidien recommandé (AQR) (Al-Haj et Al-Kanhal, 2010 ; Singh *et al.*, 2017).

Tableau I : Composition chimique globale (%) du lait de dromadaire selon différents auteurs en comparaison avec le lait de vache.

Origine du lait	Constituants						Références
	Protéines	Matière grasse	Lactose	Cendre	Matière sèche	Eau	
Lait de dromadaire	3,35	3,24	4,52	0,80	11,91	–	Mehaia et Al-kanhal (1989)
	2,52	2,85	4,46	0,80	10,63	–	Mehaia <i>et al.</i> (1995)
	3,3	3,3	2,5	–	10,0	90,0	Gorban et izzeldin (1997)
	3,31	4,81	4,28	0,83	13,44	–	Wangoh <i>et al.</i> (1998)
	2,81	1,20	5,4	0,99	9,61	–	Attia <i>et al.</i> (2001)
	3,25	2,65	4,05	0,83	10,80	–	Kouniba <i>et al.</i> (2005)
	2,69	2,95	3,92	0,82	12,30	–	Haddadin <i>et al.</i> (2008)
Lait de vache	2,06	2,35	4,41	0,94	9,78	90,20	Omer et Eltinay (2009)
	2,9 – 3,5	3,4 – 4,4	4,8 – 5,0	–	12,5 – 13,0	87,0 – 87,5	Mietton <i>et al.</i> (1994)
	3,20	3,50	4,50	0,80	14,52	–	Lindmark-Månsson <i>et al.</i> (2003)

Le lactose est le principal glucide présent dans le lait des mammifères, avec une teneur qui oscille entre 2,40 et 5,80% (Singh *et al.*, 2017). Il a été rapporté que le lactose est le seul composant qui reste quasiment inchangé durant une saison soumise à des conditions d'hydratation ou de déshydratations (Yagil et Etzion, 1980 ; Haddadin *et al.*, 2008). Les seules variations signalées en ce composant sont celles qui sont attribuées à l'effet de race (Al-Haj et Al-Kanhal, 2010 ; Abdalla *et al.*, 2015).

La teneur en matière grasse du lait camelin se situe entre 1,2 et 5,4% avec une moyenne de $3,5 \pm 1\%$, dont 96% des triglycérides (TG) (Konuspayeva *et al.*, 2009 ; Ereifej *et al.*, 2011). Ces lipides sont principalement constituée d'acides gras à longue chaîne et se caractérisent par une proportion élevée d'acides gras insaturés (43%) et une faible teneur en acides gras à courtes chaînes que le lait de vache (Ereifej *et al.*, 2011 ; Khalesi *et al.*, 2017 ; Singh *et al.*, 2017).

1.2.3. Les protéines du lait de dromadaire

Les protéines constituent la source incontournable d'acides aminés essentiels dans tous les laits de mammifères. Elles sont classées traditionnellement en deux groupes : les caséines et les protéines du lactosérum. Cette répartition repose sur leur solubilité en milieu acide. D'après Wangoh *et al.* (1998), les caséines camelines précipitent à leur pH isoélectrique qui est d'environ 4,3, alors que les protéines sériques restent solubles dans cette zone de pH. La teneur totale en protéines du lait de dromadaire est de 2,5 à 5,3% avec une teneur moyenne de $3,1 \pm 0,5\%$ (Al-Haj et Al-Kanhal, 2010).

1.2.3.1. Les protéines du lactosérum

Les protéines sériques représentent 20 à 25% des protéines totales (Khaskheli *et al.*, 2005 ; Al-Haj et Al-Kanhal, 2010 ; Brezovecki *et al.*, 2015). Parmi les entités protéiques qu'on retrouve dans la plupart des laits de mammifères, il y a la β -lactoglobuline, l' α -lactalbumine, l'albumine sérique (ou sérumalbumine), la lactoferrine, la lactophorine (également connue sous le terme PP3 ou encore GlyCAM-1) et les différents immunoglobulines. Leur présence et leur abondance relative varient d'une espèce à une autre (Hailu *et al.*, 2016). La β -lactoglobuline (52,6%) et l' α -lactalbumine (26%) sont les principales protéines sériques du lait bovin alors que dans le lait camelin, la β -lactoglobuline est absente ou peu présente tandis-que et l' α -lactalbumine (50%) et la sérumalbumine (35%) sont dominantes (Hailu *et al.*, 2016 ; Khaledi *et al.*, 2017).

Outre ces protéines majeures, le lait de dromadaire renferme en son sein des protéines mineures qui ont effet antibactérien puissant (lactoferrine / lactoperoxydase / lysozyme) et dont les teneurs sont généralement le double de celles mesurées dans le lait de vache. Cette caractéristique permet à ce lait de ne pas s'altérer pendant 2 ou 3 jours à une température ambiante de 30 °C.

1.2.3.2. Les caséines

Les caséines, qui représentent la fraction protéique majeure du lait, se définissent comme « le groupe hétérogène de phosphoprotéines ». Le complexe caséinique est constitué de quatre protéines nommées caséine α_{S1} (α_{S1} -CN), caséine α_{S2} (α_{S2} -CN), caséine β (β -CN) et caséine κ (κ -CN). Elles sont organisées sous la forme de micelles et s'associent à un complexe minéral composé de phosphate de calcium. Ces caséines sont synthétisées par l'épithélium sécrétoire mammaire sous forme de précurseurs.

Les caséines α_{S1} , α_{S2} et β sont dites sensibles au calcium, car elles sont insolubles en présence de CaCl_2 à 20 °C. À la différence des protéines de lactosérum qui ont une structure globulaire compacte et résistante à l'attaque protéolytique, les caséines possèdent une structure lâche, peu ordonnée, qui les rend accessibles aux enzymes protéolytiques (Schmidt, 1982).

La structure des micelles de caséine de la majorité des espèces est relativement similaire. Plusieurs modèles ont été proposés. Celui de Schmidt (1982) est l'un des plus cité dans la littérature scientifique. IL repose sur l'existence de submicelles de caséines qui

s'associent par pontage phosphocalcique pour former la micelle, Notons qu'autre modèle proposé par Dumas et Garnier (1970) puis repris par Horne (1998) est en faveur d'une structure micellaire ouverte plus fluide dans laquelle les caséines formeraient un maillage poreux.

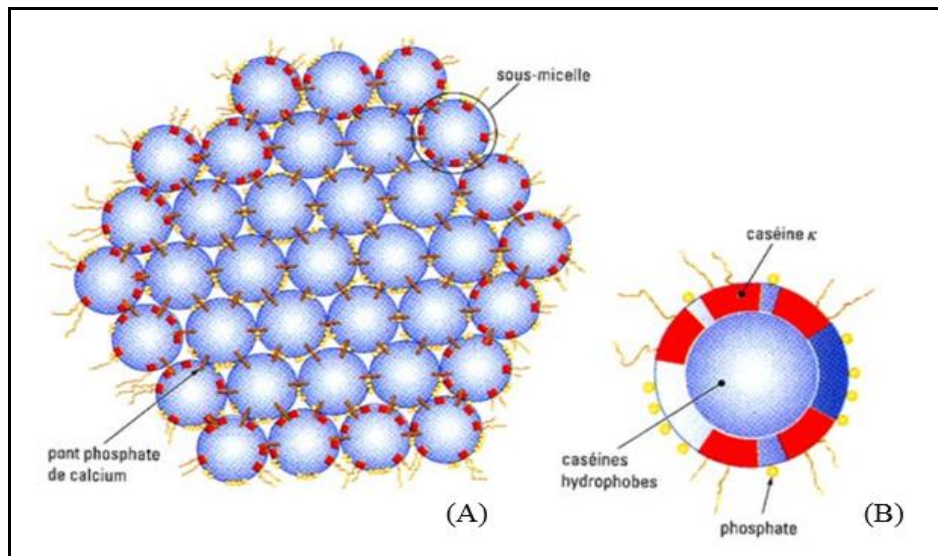


Figure 3 : Schéma représentatif de modèle de submicelle proposé par Schmidt (1982).

A : micelle de caséine ; **B** : submicelle.

Dans ces propositions de structures, la micelle (diamètre moyen de 180 nm chez le lait de vache) est constituée, en son cœur, de submicelles (10 nm) de caséines α_{S1} et β et à sa périphérie de submicelles (6 nm) de caséines α_{S1} , α_{S2} et κ . Les submicelles sont reliées entre elles par des ponts phosphocalciques de $Ca_9(PO_4)_6$ (Figure 3).

La micelle de caséines du lait de dromadaire se caractérise par un taux faible en caséines (en moyenne 20,60 contre 28 g/kg), un diamètre plus important (260 à 300 nm contre 100 à 140 nm pour le lait de vache, Farah et Rüeegg, 1989 ; Farah, 2011) et une minéralisation plus élevée estimée à 11,4 contre 7,2 g/100 mg de poids sec (Attia *et al.*, 2000 ; Kherouatou *et al.*, 2003).

Ces différences sont parmi les principaux facteurs limitant l'aptitude technologique du lait camelin, notamment sa transformation fromagère. En effet, Bornaz *et al.* (2009) et Ramet (2001) ont mentionné que la taille de la micelle et sa teneur en caséines déterminent le temps de coagulation et la consistance des gels obtenus. Ceci se vérifié pour le lait camelin qui présente un temps de coagulation élevé et un gel relativement friable.

Les caséines représentent 52 à 87% des protéines totales dans le lait de dromadaire (Ereifej *et al.*, 2011 ; Shuiep *et al.*, 2013 ; Singh *et al.*, 2017). Leurs principales caractéristiques physico-chimiques sont rapportées dans le tableau II.

Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques des caséines du lait de dromadaire et du lait de vache.

Paramètres	α S ₁ -CN		α S ₂ -CN		β -CN		κ -CN	
	LC	LV(c)	LC	LV(c)	LC	LV(c)	LC	LV(c)
Proportion dans les CN totales (%)	22 – 38 (a)	36	9,5-21 (a)	10	28- 65 (a)	34	3,5- 5 (a)	13
Résidus d'acides aminés	207 (b)	199	178 (b)	207	217 (b)	209	162 (b)	169
Poids moléculaire (KDa)	24,75 - 35,50 (a)	23,60	21,99 - 26,30 (a)	25,25	24,90 - 32,0 (a)	24,00	22,29 - 22,98 (a)	19,00
Point isoélectrique	4,41 (b)	4,26	4,58 (b)	4,78	4,76 (b)	4,49	4,11 (b)	3,97
Résidus cystéyls	0	0	2	2	0	0	2	2
Groupements phosphoséryls	6 (b)	8	9 (b)	10	3 (b)	5	2 (b)	1
Résidus proline	19	17	8	10	35	34	22	20
Acides aminés Acides	38	31	26	19	22	22	14	17
Acides aminés Basiques	30	25	27	33	21	20	17	17
Présence de Glucides	0	0	0	0	0	0	OUI	OUI
Similitude de structure (%)	39 (b)		56 (b)		64 (b)		56 (b)	

LC : lait de chamelle ; LV : lait de vache.

(a) : selon Ochirkhuyag *et al.* (1997) et Kappeler *et al.* (1998) ;

(b) : selon Kappeler *et al.* (1998) ;

(c) : selon Eigel *et al.* (1998).

Ces protéines présentent une teneur élevée en β -CN (65% des caséines totales avec une concentration de $12,78 \pm 0,92$ mg/mL) (Farah, 2011 ; Omar *et al.*, 2016). Cette entité protéique fortement hydrophobe confère au lait camelin une meilleure digestibilité et une faible incidence allergique chez les nourrissons, comparativement à son homologue bovin (El-Agamy *et al.*, 2009 ; El-Hatmi *et al.*, 2012).

Nous relevons aussi dans ce lait la faible teneur en κ -CN (3,5% des caséines totales avec une concentration de $1,67 \pm 0,01$ mg/mL) (Omar *et al.*, 2016), qui réduit d'autant la transformation fromagère de ce lait, étant donné que la présure ou chymosine (enzyme coagulante utilisée en fromagerie) clive spécifiquement un fragment polaire de cette protéine au niveau du site (Phe⁹⁷-Ile⁹⁸) différent de celui rencontré dans le cas du bovin (Phe¹⁰⁵-Ile¹⁰⁶). En outre, Kappeler *et al.* (1998) soulignent que cette protéine possède un résidu de proline supplémentaire (Pro⁹⁵) qui joue un rôle important dans la stabilité de la micelle.

Comparée aux autres caséines, la κ -CN est la moins phosphorylée avec deux résidus de sérine phosphorylés (Ser¹⁴¹ et Ser¹⁵⁹) et c'est la seule caséine glycosylée par l'acide sialique aux niveaux de cinq positions Thr¹⁰⁵, Thr¹⁰⁹, Thr¹⁴⁹, Thr¹⁵² et Thr¹⁵³ (Hailu *et al.*, 2016).

1.2.4. Les caséines α S

Les caséines α S présentent la fraction caséinique la plus sensible aux sels de calcium, d'où l'indice « S » utilisé dans leur appellation. Dans le lait de vache, cette fraction est la plus abondante (48%) alors que dans le lait de dromadaire représente 31,5% des caséines totales avec une concentration de $2,89 \pm 0,29$ mg/mL (Farah, 2011 ; Omar *et al.*, 2016). Ces protéines, qui se scindent en α S₁-CN et α S₂-CN, présentent un facteur prédominant d'allergie dans le lait des autres espèces et jouent un rôle important dans le processus de fabrication de fromage, où notamment la présence de la caséine α S₁ dans le lait caprin est synonyme d'aptitudes élevées à sa transformation fromagère (Ambrosoli *et al.*, 1988).

1.2.4.1. Données physico-chimiques et moléculaires

La caséine α S₁ est la caséine la plus abondante du lait de vache. Dans le lait de dromadaire, elle représente 22% des caséines totales. Elle comporte dans sa séquence 6 résidus de sérine phosphorylés (Ser¹⁸, Ser⁶⁸, Ser⁷⁰, Ser⁷¹, Ser⁷² et Ser⁷³) et elle est dépourvue de résidus de cystéine. Cette caséine présente deux variants génétiques A et B rapportés par Kappeler *et al.* (1998) et un nouveau variant C rapporté par Shuiep *et al.* (2013).

Le variant A est le plus fréquemment rencontré dans le lait. Il comporte 207 résidus d'acides aminés (Figure 4) avec une masse moléculaire estimée à 35,50 KDa, mesurée en électrophorèse PAGE-SDS (Farah et Farah-Riesen, 1985), alors qu'en spectrométrie de masse, sa masse serait de 24,75 KDa (Kappeler *et al.*, 1998). Son pH isoélectrique est de 4,4. Les travaux menés par Shuiep *et al.* (2013) en focalisation isoélectrique (IEF) ont montré que ce variant possède le point isoélectrique (pI = 4,4) le plus alcalin comparativement aux deux autres variants.

RPKYPLRYPEVFQNEPDSIEEVLNKRKILELAVVSPIQFRQENIDELKDT	50
RNEPTEDHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSSTTEQKDILKEDMPSQRYLEEL	100
HRLNKYKLLQLEAIRDQKLIPRVKLSHPYLEQLYRINEDNHPQLGEPVK	150
VVTQPFQFFQLGASPYVAWYYPQVMQYIAHPSSYDTPEGIASEDGGKT	200
DVMPQWW	207

Figure 4 : Séquence primaire de la caséine αS_1 variant A. **P** : séine phosphorylé.
(www.uniprot.org/uniprot)

Le variant B (Figure 5) contient 215 résidus d'acides aminés et une masse moléculaire de 25,29 KDa (Kappeler *et al.*, 1998). Il est caractérisé par une insertion de 8 résidus d'acides aminés (EQAYFHLE) entre Gln¹⁵⁴ et Pro¹⁵⁵ et un échange d'acides aminés en position 30 (p.Glu → Asp) dans la séquence du variant mature A, qui n'est pas mentionnée dans la base de données UniProt O97943. La séquence insérée d'Asn¹⁴ à Glu²⁰ dans les deux variants génétiques A et B de αS_1 -CN cameline était probablement le résultat d'un exon supplémentaire exprimé entre les deux exons bovins 3 et 4.

RPKYPLRYPEVFQNEPDSIEEVLNKRKILELAVVSPIQFRQENIDELKDT	50
RNEPTEDHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSSTTEQKDILKEDMPSQRYLEEL	100
HRLNKYKLLQLEAIRDQKLIPRVKLSHPYLEQLYRINEDNHPQLGEPVK	150
VVTQEAYFHLEPFQFFQLGASPYVAWYYPQVMQYIAHPSSYDTPEGI	200
ASEDGGKTDVMPQWW	215

Figure 5 : Séquence primaire de la caséine αS_1 variant B. **P** : séine phosphorylé.
(www.uniprot.org/uniprot)

Le variant C est décrit pour la première fois par Shuiep *et al.* (2013) chez les dromadaires de Soudan. Sa séquence est composée de 207 résidus d'acides aminés.

L'alignement des ARNm de différentes espèces réalisé par Martin *et al.* (2002) a montré que l'exon 16 (exon bovin) est absent dans l'ARNm de αS_1 -CN A camelin et qu'il est présent dans αS_1 -CN B, ce qui a conduit à la différence de la longueur des séquences protéiques correspondantes (Kappeler *et al.*, 1998). Cependant, le variant αS_1 -CN C semble également être caractérisé par l'absence de l'exon 16 au niveau de son ARNm, ceci est probablement due au saut d'exon, qui est un phénomène commun remarqué dans la caséines αS_1 de plusieurs espèces (Giambra *et al.*, 2010 ; Shuiep *et al.*, 2013).

La caséine αS_2 est la caséine la plus hydrophile et la plus sensible au calcium. Elle présente à raison de 9,5% des caséines totales. Elle contient 178 résidus d'acides aminés (Figure 6), dont 9 résidus de serine phosphorylés (Ser⁸, Ser⁹, Ser¹⁰, Ser³², Ser⁵³, Ser¹⁰⁸, Ser⁷³, Ser¹¹³ et Ser¹²¹) et deux résidus de cystéines (Kappeler *et al.*, 1998). Sa masse moléculaire est estimée entre 25,00 et 26,30 KDa (par électrophorèse en PADE-SDS, Larsson-Raznikiewicz et Mohamed, 1986 ; Ochirkhuyag *et al.*, 1997) et à 21,99 KDa (en spectrométrie de masse) avec un pH isoélectrique de 4,85 (Kappeler *et al.*, 1998).

La séquence primaire de cette caséine est plus courte que son homologue bovine. Cela est le fait des délétions qui se sont produites dans la région hélicoïdale de la séquence bovine entre Glu⁴⁹ et Asn⁸³. Ceci est accompagné par une perte de l'amas de sérine phosphorylée (Ser⁵⁶, Ser⁵⁷ et Ser⁵⁸). Cette perte peut avoir des implications sur l'assemblage et la stabilité de la micelle ainsi que sur le comportement nutritionnel des caséines (Kappeler *et al.*, 1998).

<i>ppp</i> <i>p</i> <i>p</i>	<i>p</i> <i>p</i>	
KHEMDQGSSEESINVSQQKFKQVKKVAIHPSKEDICSTFCEEAVRNIKE		50
<i>p</i>	<i>p</i>	
VESAEVPTENKISQFYQKWFLQYLQALHQGQIVMNPWDQGKTRAYPFIP		100
<i>p p</i> <i>p</i>	<i>p</i>	
TVNTEQLSISEESTEVPTEESTEVEFTKKTTELTEEEKDHQKFLNKIYQYYQ		150
TFLWPEYLKTVYQYQKTMTPWNHIKRYF		178

Figure 6 : Séquence primaire de la caséine αS_2 . **P** : séine phosphorylé.
(www.uniprot.org/uniprot)

La séquence du peptide signal des caséines αS_1 et αS_2 (Figure 7) est de 15 résidus d'acides aminés dont la composition est similaire à son homologue bovin. Cette similarité pourrait s'expliquer par l'existence du même ancêtre commun de ces caséines (Kappeler *et al.*, 1998 ; Pareek *et al.*, 2012). Kappeler *et al.* (1998) ont rapporté que la structure du gène codant pour les caséines αS est caractérisée par de nombreuses courtes séquences d'exons qui sont généralement interrompues par des longues séquences d'introns.

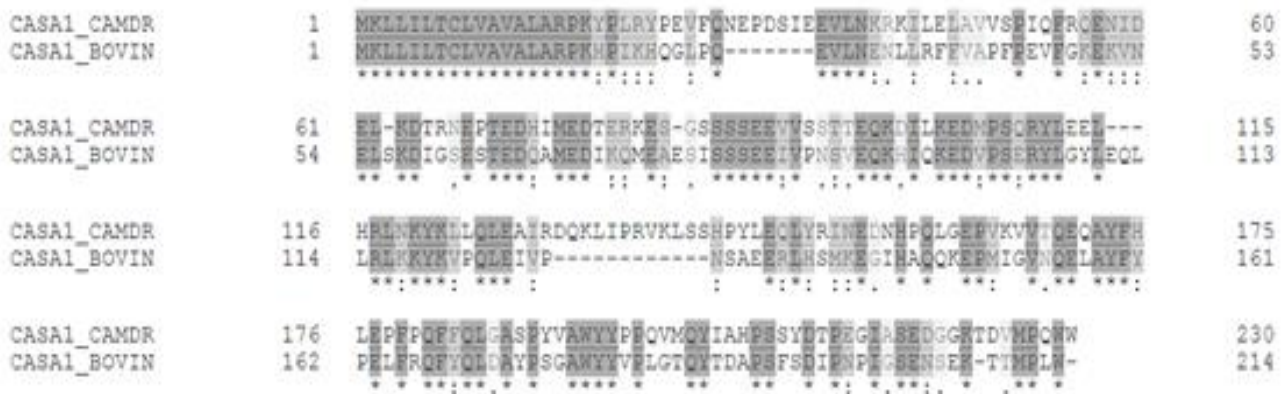
1.2.4.2. Données structurales

L'alignement des séquences primaires des caséines αS camelines révèle une faible homologie par rapport à leurs homologues bovins (Figure 8) où un pourcentage d'identité de 44,68 et 53,33% est détecté pour αS_1 -CN et αS_2 -CN, respectivement. La structure présente un domaine amphiphile conservé : la partie N-terminale contient plus de résidus polaires, alors que le domaine C-terminal est riche en résidus apolaires.

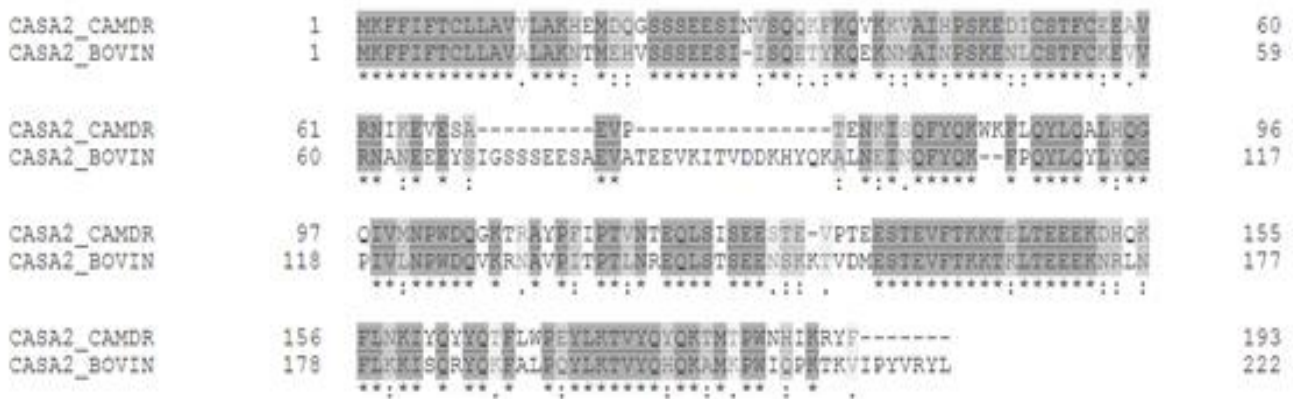
Bien qu'il y ait cette faible similitude dans leur séquence primaire, peu de différences structurales ont été constatées dans leur structure secondaire. Les caséines αS_1 et αS_2 camelines possèdent une structure secondaire où les hélices α représentent respectivement 38,70 et 37,31% et les feuillets β 13 et 7% (Kappeler *et al.*, 1998).

Espèces	Caséines	Séquences du peptide signal	N ^{bre} acides aminés
Camelin	α_{S1} -CN	MKLLILTCLVAVALA	15
Bovin	α_{S1} -CN	MKLLILTCLVAVALA	15
Camelin	α_{S1} -CN	MKFFIFTCLLAVVLA	15
Bovin	α_{S1} -CN	MKFFIFTCLLAVALA	15

Figure 7 : Séquences du peptide signal des caséines α_S camelines et bovines.
(<https://www.uniprot.org/align>)



(A)



(B)

Figure 8 : Alignement des séquences des caséines α_S camelines et bovines.
(<https://www.uniprot.org/align>)

A : séquence α_{S1} -CN

B : séquence α_{S2} -CN

Les caséines α S camelines et bovines présentent une composition similaire en résidus d'acides aminés (Tableau III). Cependant, la teneur en proline est légèrement plus élevée au niveau de α S₁-CN (8,3 vs 7,9%), ce qui pourrait influencer sur la stabilité structurale de cette protéine. Salmen *et al.* (2012) ont montré que la teneur en acides aminés non essentiels sauf Arg et en acides aminés essentiels (Met, Ile, Leu et Phe) est plus élevée dans les α S-CN du lait de vache par rapport à celle du lait de chamelle.

Les acides aminés acides représentent 38% pour α S₁-CN et 26% pour α S₂-CN, alors que les acides aminés basiques sont estimés à 25 et 32%, respectivement pour ces deux protéines.

Tableau III : Composition en résidus d'acides aminés des caséines α S camelines (c) et bovines (b). (www.uniprot.org/uniprot)

Acides aminés	Pourcentage (%)			
	α S ₁ -CN c	α S ₁ -CN b	α S ₂ -CN c	α S ₂ -CN b
Ala (A)	4,3	5,6	3,6	5
Arg (R)	4,8	2,8	1,6	2,7
Asn (N)	3,0	3,7	3,6	6,3
Asp (D)	5,2	3,3	2,1	1,8
Cys (C)	0,4	0,5	1,6	1,4
Gln (Q)	7,0	6,5	8,8	7,2
Glu (E)	11,3	11,7	11,4	10,8
Gly (G)	2,6	4,2	1,6	0,9
His (H)	2,6	2,3	2,6	1,4
Ile (I)	5,2	5,6	5,7	5,4
Leu (L)	10,4	10,3	5,7	7,2
Lys (K)	6,1	7,0	10,4	11,3
Met (M)	2,2	2,8	2,1	2,3
Phe (F)	2,6	3,7	6,2	4,1
Pro (P)	8,3	7,9	4,1	4,5
Ser (S)	7,0	7,5	6,7	7,7
Thr (T)	3,9	2,8	8,3	7,2
Trp (W)	1,3	0,9	2,1	0,9
Tyr (Y)	5,2	4,7	5,2	5,4
Val (V)	6,5	6,1	6,7	6,8

1.4. Propriétés biologiques à effets thérapeutiques

Afin de vérifier scientifiquement les « vertus thérapeutiques » associées traditionnellement au lait camelin, ce dernier a fait l'objet au cours de ces premières décennies du XXI^{ème} siècle de nombreux travaux qui ont exploré différentes disciplines médicales et dont nous donnons ci-après un aperçu des principales conclusions qui émergent. Les activités ont été d'abord testées sur le lait dans son ensemble et sur les protéines entières avant qu'elles ne soient examinées sur les fragments d'hydrolyse (peptides) issus de ces protéines.

1.4.1. Activités biologiques dues au lait et aux protéines

1.4.1.1. Propriétés antibactériennes et antivirales

Ces propriétés ont constituées une des premières pistes explorées, dès que la composition protéique de ce lait a été analysée et sa richesse en protéines telles la lactoferrine, la lactoperoxydase, le lysozyme et les immunoglobulines a été établie. Ces protéines sont connues pour leur activité antibactérienne. Leur présence à des teneurs appréciables dans le lait de dromadaire suggère que les micro-organismes auront du mal à se développer normalement dans ce lait, y compris la flore lactique. C'est ce qui est constaté dans les faits, puisque cette matière nutritionnelle possède une aptitude particulière à se conserver plus longtemps (quelques jours), à des températures ambiantes qui dépassent souvent 25, voire 30 °C.

Les investigations menées par plusieurs auteurs concluent que le lait camelin a un effet bactériostatique ou bactéricide sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif de contamination usuelle comme *Escherichia coli*, ou sur certaines bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* (El-Agamy *et al.*, 1992 ; 1996 ; Kappeler, 1998 ; Barbour *et al.*, 1984 ; Benkeroum *et al.*, 2004 ; Al-Majali *et al.*, 2007 ; Othman *et al.*, 2016).

Ainsi, un homologue à la lactoferrine bovine a été isolé et identifié dans le lait camelin (El-Agamy *et al.*, 1996 ; Kappeler *et al.*, 1999). Cette protéine basique (pHi égal à 8,14) de 78 KDa (pour 689 acides aminés), qui se trouve à une teneur moyenne de 220 mg/L (soit le double de sa teneur dans le lait de vache), a un fort taux d'homologie (74%) avec la lactoferrine issue du lait de référence. Elle possède une action inhibitrice de la croissance de *Salmonella thyphimurium* (El-Agamy *et al.*, 1992) ainsi qu'une stabilité à des pH bas et vis-à-vis des traitements thermiques (Kappeler *et al.*, 1998 ; El-Agamy, 2000).

Selon Redwan et Tabll (2007) ainsi que Saltanat *et al.* (2009), cette protéine inhibe aussi l'action du virus de l'hépatite B et celui de l'hépatite C en empêchant son entrée dans les cellules. De même, son action peut éliminer un parasite tel que *Schistosoma mansoni* (Maghraby *et al.*, 2005).

La lactoperoxydase cameline, isolée par El-Agamy *et al.* (1996), présente 95% d'homologie structurale avec son homologue bovin et un pHi de 8,63. Sa MM se situe entre 69,5 et 78 KDa (contre 72,5 KDa chez le bovin) pour un total de 612 résidus d'acides aminés, dont 15 résidus cystéines (Kappeler, 1998).

Cette protéine possède un effet bactéricide très prononcé contre les bactéries à Gram négatif et un effet bactériostatique contre les bactéries à Gram positif (El-Agamy *et al.*, 1992). De même, elle semble avoir une activité inhibitrice contre les virus et les moisissures (Kappeler, 1998).

Le lysozyme est présent dans le lait camelin au moins à une teneur de 150 µg/L (environ le double de celle existant dans le lait bovin) (El-Agamy *et al.*, 1996). Cette protéine de 14,4 KDa, présente une action lytique effective contre *Salmonella thyphimurium* mais non effective contre *Staphylococcus aureus* (El-Agamy *et al.*, 1992).

Des immunoglobulines du lait de chamelle ont été isolées et caractérisées : IgG, IgM, IgA avec une prédominance de la classe G composée par plusieurs sous classes (El-Agamy *et al.*, 1996 ; El-Agamy, 2000).

Dans ce cadre, une étude portant sur l'activité antivirale et antibactérienne du lait de chamelle a révélé que les immunoglobulines G et les immunoglobulines A sécrétées (IgAs) de ce lait ont un faible effet contre les bactéries mais une activité antivirale élevée, notamment contre les rotavirus d'origine bovine et humaine (EL-Agamy *et al.*, 1992).

Il est à noter qu'en plus de ces entités protéiques qui ont des propriétés biologiques intéressantes, d'autres protéines sériques mineures, dont certaines sont spécifiques au lait de dromadaires, font l'objet actuellement d'études qui se proposent de mettre en relief leurs activités. Il s'agit :

- du composant-3 de la fraction protéose-peptone, connue sous l'appellation PP3 ou lactophorine. Le variant A de ce composant (137 acides aminés), qui se trouve à une teneur nettement plus élevée que dans le lait bovin (900 contre 300 mg/L) présente un pourcentage d'homologie appréciable (60%) par rapport à son homologue dans ce lait ;

- d'une protéine de 14 KDa, riche en résidus cystéine et dont l'extrémité N-terminal présente une similitude de structure avec celle des caséines α et β camelines (Beg *et al.*, 1984) ;

- d'une protéine de 117 résidus d'acides aminés, riche en cystéine et qui est homologue à une lactophosphoprotéine de rat ou à la neurophysine de souris (Beg *et al.*, 1986) ;

- d'une protéine à caractère acide (Kappeler, 1998) dénommée d'ailleurs "Whey Acidic Protein (WAP)". Cette dernière de 12,5 KDa, est constituée de 117 acides aminés avec 17 groupements thiols. Elle a un pHi de 4,7 et se trouverait dans le lait à une teneur de 157 mg/mL ;

- d'une protéine dénommée "Novel Whey Protein (NWP)". Celle-ci possède 112 résidus d'acides aminés et a une masse moléculaire évalué à 15 KDa (Beg *et al.*, 1987). Selon Girardet *et al.* (2000), la structure primaire de cette protéine ne diffère de celle du PP3 camelin que par une insertion entre les résidus Met¹ et Glu¹², suggérant que ces deux protéines sont l'expression d'un seul et même gène ;

- d'une protéine de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP) homologue à celle du lait humain. Elle est constituée de 172 résidus d'acides aminés et présente une masse moléculaire de 19,1 KDa (Kappeler, 1998). Cette protéine, dont la teneur est estimée à 370 mg/L, est riche en arginine mais pauvre en lysine. Son point isoélectrique est très basique (8,73). Elle présente également un grand pouvoir d'inhibition de la croissance des bactéries Gram positive ainsi que d'autres germes pathogènes ;

- enfin, d'une protéine d'environ 20 KDa ayant un pHi basique et dénommée : "Camel Whey Basic Protein (CWBP)". Sa séquence N-terminal déterminée, par Ochirkhuyag *et al.* (1998) ne semble pas présenter selon ces auteurs d'homologie avec une quelconque protéine laitière et non laitière.

1.4.1.2. Propriétés hypoglycémiantes

C'est les secondes propriétés explorées et dont le lait camelin, qui a été utilisé depuis longtemps par les bédouins pour traiter le diabète, tire profit de son effet bénéfique pour la

santé. Les études menées *in vivo* chez l'Homme, le rat et le chien atteints de diabète de type 1 ont mis en évidence un effet hypoglycémiant appréciable (Agrawal *et al.*, 2005 ; Sahani *et al.*, 2005 ; Sboui *et al.*, 2010).

La présence de protéines like-insuline ainsi que la meilleure absorption de ce lait et sa résistance à la coagulation dans l'estomac sont parmi les facteurs qui expliquent cet effet favorable (Beg *et al.*, 1986 ; Agrawal *et al.*, 2007 ; Ajamaluddin *et al.*, 2012 ; Shori, 2015).

1.4.1.3. Propriétés antihypertensives

L'effet hypotenseur du lait de chamelle a été étudié et attribué aux peptides libérés à partir de ses protéines lors de la digestion enzymatique (Jrad *et al.*, 2014 ; Tagliazucchi *et al.*, 2016) ou durant la fermentation (Quan *et al.*, 2008 ; Moslehshid *et al.*, 2013). Récemment, il est rapporté que la fermentation de ce lait par les bactéries lactobacille produit des puissants peptides hypotenseurs comparativement au lait bovin (Ayyash *et al.*, 2018 ; Solanki et Hati, 2018).

1.4.1.4. Propriétés anti-tumorales et maladies auto-immunes

Au Kazakhstan, le lait de chamelle est traditionnellement utilisé comme adjuvant à la chimiothérapie de certains cancers, notamment ceux du tube digestif. Il semble également que des résultats probants soient obtenus dans certaines maladies auto-immunes, telles que le lupus, le pemphigus, la maladie de Crohn et la sclérose en plaques (Konuspayeva *et al.*, 2004). Krishnankutty et ses collaborateurs en 2018 ont révélé que la lactoferrine du lait de chamelle possède un puissant effet antiprolifératif sur les cellules cancéreuses colorectales humaines (HCT-116) et du sein (MCF-7) en induisant l'apoptose.

D'autres chercheurs ont également rapporté que le lait camelin a des effets anti-génotoxiques et anticytotoxiques par inhibition des MnPCEs et améliore l'index mitotique des cellules de la moelle osseuse (Salwa et Lina, 2010). Dans ce volet, des études *in vitro* ont réussi à montrer que le lait camelin peut arrêter la croissance des cellules tumorales et des cellules malignes (khorshid *et al.*, 2005).

1.4.1.5. Effet sur l'autisme

La consommation du lait camelin chez les enfants atteints d'autisme a montré une réduction des symptômes et une amélioration des capacités motrices, cognitives, communicatives ainsi que la coordination articulaire (Panwar *et al.*, 2015). Ceci met en relief des effets thérapeutiques potentiels de ce lait sur l'autisme qui sont déjà connus et rapportés par les éleveurs et les sociétés traditionnelles (Sharma et Singh, 2014).

1.4.1.6. Propriétés dermatologiques

Du fait de ses teneurs élevées en vitamines B et C ainsi que la présence en son sein d'acides α -hydroxylés, qui sont connus pour leurs effets soignants efficaces sur la peau (antirides, lutte contre vieillissement cutané, atténuation de la pigmentation irrégulière ...etc), le lait de dromadaire possède un effet dermatologique probant (Kula, 2016). De plus, les liposomes présents dans ce lait s'appliquent à un ingrédient cosmétique potentiel pour améliorer l'effet anti-âge (Choi *et al.*, 2013).

1.4.1.7. Alternatif aux personnes allergiques

La β -lactoglobuline ainsi que les caséines α S et β sont connues pour leur effet allergène chez l'Homme après l'ingestion du lait bovin. Cependant, chez le camelin, l'absence de la β -lactoglobuline et les différences structurales des caséines font que ce lait ne provoque aucune réaction allergique chez les personnes sensibles. De plus, El-Agamy *et al.* (2009) ont signalé une absence de similarité immunologique entre les protéines du lait camelin et celles du lait d'autres ruminants. De ce fait, ce lait est suggéré comme source alternative de protéines aux personnes allergiques au lait de vache (de Almeida, 2011). En outre, la digestion et l'assimilation aisée du lactose issu du lait camelin chez l'Homme fait de ce lait un bon substitut aux personnes intolérantes au lactose (Shabo *et al.*, 2005).

1.4.2. Activités biologiques dues aux peptides

Les caséines, qui ont une vocation nutritionnelle incontournables, puisqu'elles permettent dans le cadre d'une transformation technologique, d'obtenir un produit dérivé très prisé dénommé fromage, sont aussi une source par excellence de peptides doués d'activités biologiques variées dits « peptides bioactifs » (Silva et Macata, 2005). Naturellement, ces peptides ont été mis en évidence sur le lait bovin avant qu'ils ne soient décrits ces dernières années sur les laits d'autres espèces laitières, notamment sur le lait camelin.

Le terme « peptides bioactifs » désigne les fragments peptidiques inactifs encryptés dans la séquence de protéines précurseurs, mais lorsqu'ils sont libérés peuvent exercer différentes activités biologiques *in vivo* et *in vitro* (Dziuba *et al.*, 2009).

Ces peptides sont libérés après hydrolyse de la protéine mère soit par des enzymes endogènes du lait et/ou des bactéries lactiques au cours de la fermentation et/ou par des enzymes d'origine animale, végétale ou microbienne (Figure 9).

L'hydrolyse enzymatique par des enzymes spécifiques telles que les enzymes gastro-intestinales (trypsine, chymotrypsine et pepsine) est la méthode la plus utilisée. Elle permet d'avoir des peptides aux propriétés désirées (en quantité, tailles et natures). De plus, cette hydrolyse améliore les propriétés fonctionnelles et n'affecte pas la valeur nutritionnelle des protéines (de Castro *et al.*, 2015 ; Sultan *et al.*, 2016).

L'hydrolyse enzymatique permet aussi de réduire l'allergénicité de la protéine entière. A cet effet, les hydrolysats caséiniques sont utilisés depuis 1942 dans les formules lactées destinées aux enfants présentant une allergie au lait de vache.

Les peptides bioactifs du lait sont généralement formés de 2 à 20 acides aminés et ont un impact positif sur une fonction ou un état physiologique de l'organisme, par conséquent sur la santé. En effet, ils agissent sur les systèmes nerveux (effets sédatif, analgésique et anxiolytique), digestif (transport de minéraux, effet satiétogène ou anti-sécrétoire d'hormone), immunitaire (effets antimicrobien, immunomodulateur, prébiotique) et cardiovasculaire (effets hypertenseur et anti-thrombotique) (Mohanty *et al.*, 2016 ; Nongonierma *et al.*, 2016 ; Sultan *et al.*, 2016).

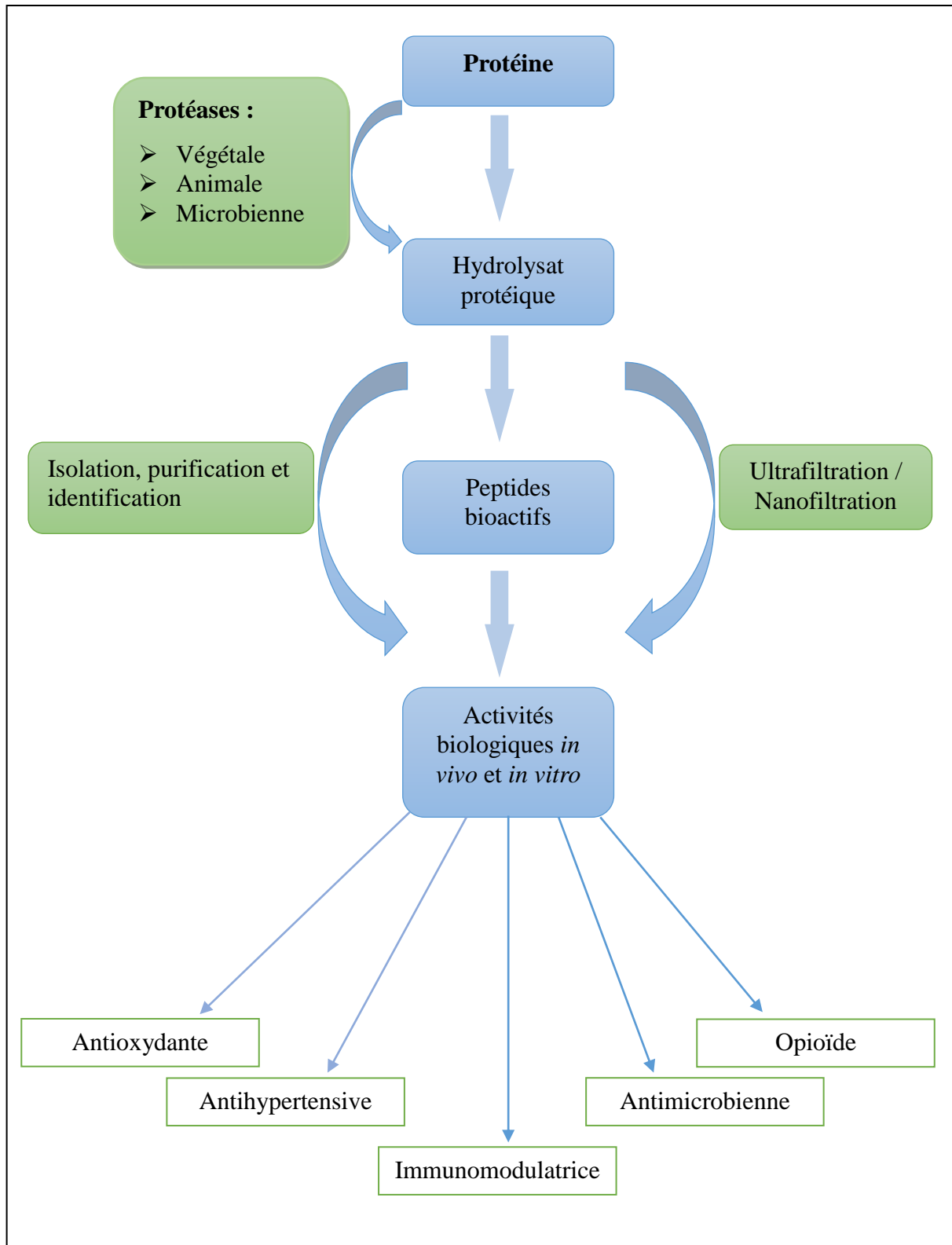


Figure 9 : Processus de production des peptides bioactifs (adapté d'après de Castro *et al.*, 2015).

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été menées au cours de ces dernières années et à ce jour, les peptides bioactifs représentent un axe majeur de la recherche dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Étant donné que de nombreuses bioactivités ont déjà été caractérisées à partir des caséines, Nous récapitulons ci-dessous les principaux peptides libérés des caséines α S et cités dans la littérature.

1.4.2.1. Les peptides bioactifs issus des caséines α S

1.4.2.1.1 Les peptides opiacés

Les peptides opiacés issus des protéines alimentaires sont appelés exorphines, en référence à leurs homologues endogènes, les endorphines. Ces peptides ont été les premiers à avoir été identifiés. Ils sont souvent issus de la caséine β bovine ou humaine, d'où leur nom de β -casomorphines. Mais on les trouve aussi dans les fragments issus de la caséine α S₁ bovine (Loukas *et al.*, 1983) et la caséine α S₁ humaine (Yoshikawa *et al.*, 1994 ; Kampa *et al.*, 1996).

Ces peptides sont des ligands pour les récepteurs opiacés (type μ , γ et κ) induisant des effets opiacés similaires à ceux des opiacés exogènes comme la morphine et endogènes comme les enképhalines. Ils ont généralement un rôle dans le système immunitaire, endocrinien, nerveux et au niveau du tractus gastro-intestinal. Le tableau IV présente les peptides opiacés dérivés des caséines α S. Aucun peptide opiacé n'a été identifié jusqu'à présent à partir des caséines du lait de dromadaire.

Tableau IV : Peptides opiacés dérivés des caséines α S.

Caséine	Fragment peptidique	Nom	Référence
α S ₁ -CN bovine	f(91-96)	α -caséine	Loukas <i>et al.</i> (1983)
	f(90-96)	exorphine	
	f(90-95)		
	f(91-95)		
α S ₁ -CN humaine	f(158-164)	casoxineD	Yoshikawa <i>et al.</i> (1994)
	f(158-162)	α S ₁ -casomorphine	Kampa <i>et al.</i> (1996)

1.4.2.1.2. Les peptides anxiolytiques

Les propriétés sédatives et calmantes liées au lait peuvent être attribuées aux protéines et peptides libérés durant la digestion. En fait, l' α -casozépine (YLGYLEQLLR), un peptide dérivé de l'hydrolyse trypsique de α S₁-CN, présente une activité semblable à celle des benzodiazépines (Miclo *et al.*, 2001). L' α -casozépine se fixe sur le récepteur GABA du type A qui est un récepteur multimérique présentant un site de fixation des benzodiazépines. Par conséquent, il provoque un effet anticonvulsivant et anxiolytique. Des études *in vivo* chez l'Homme ont montré que l'apport de la formule industrielle de l'hydrolysate trypsique de α S₁-CN contenant l' α -casozépine avant une situation de stress freine l'élévation de la pression artérielle et le taux de cortisol (Messaoudi *et al.*, 2005). De plus, cet apport diminue les symptômes digestifs, cardiovasculaires et émotionnels liés au stress (Kim *et al.*, 2007a).

1.4.2.1.3. Les peptides antihypertenseurs

L'hypertension artérielle est l'un des principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (Erdmann *et al.*, 2008). L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une métallopeptidase qui augmente la pression sanguine en convertissant l'angiotensine I en angiotensine II (un puissant vasoconstricteur). L'inhibition de cette enzyme est donc considérée comme l'une des stratégies essentielle pour le traitement de l'hypertension. Au cours de ces dernières années, les effets antihypertenseurs de certains peptides dérivés des protéines du lait ont été examinés par des études *in vitro* et *in vivo*, devenant ainsi la classe la plus connue de peptides bioactifs.

Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence l'activité hypotensive du lait camelin après hydrolyse enzymatique (Jrad *et al.*, 2014 ; Rahimi *et al.*, 2016 ; Tagliazucchi *et al.*, 2016) ou fermentation (Quan *et al.*, 2008 ; Moslehishad *et al.*, 2013 ; Al-Haj *et al.*, 2018 ; Solanki et Hati, 2018). Néanmoins, aucun peptide n'a été identifié jusqu'à présent. Le tableau V illustre les peptides antihypertensifs issus des caséines α S.

Tableau V : Peptides antihypertenseurs dérivés des caseines α S.

Caséine	Procédure	Fragment peptidique	Référence
α S ₁ -CNB	Hydrolyse enzymatique	f(23-34)	Karaki <i>et al.</i> (1990)
		f(194-199)	Miguel <i>et al.</i> (2007)
		f(90-94)	Contreras <i>et al.</i> (2009)
		f(104-109)	Maeno <i>et al.</i> (1996)
		f(102-109)	Miguel <i>et al.</i> (2010) ; Gómez-Ruiz <i>et al.</i> (2002)
	Fermentation	f(1-9) f(146-147)	Saito <i>et al.</i> (2000) Maeno <i>et al.</i> (1996)
α S ₂ -CNB	Hydrolyse enzymatique	f(89-95)	Ruiz-Giménez <i>et al.</i> (2010)
		f(203-208)	
		f(189-192)	Maeno <i>et al.</i> (1996)
		f(190-197)	
		f(198-202)	
α S ₂ -CNO		f(165-170)	López-Expósito <i>et al.</i> (2006)

B : Bovine ; **O** : Ovine

1.4.2.1.4. Les peptides antimicrobiens

La majorité des peptides antimicrobiens sont des peptides cationiques ($\pm 80\%$) qui interviennent dans la lutte contre l'invasion de pathogènes. Parmi ceux-ci, les peptides antibactériens sont les plus étudiés. En effet, de nombreux peptides ayant une activité forte sur les bactéries ont été identifiés des protéines du lait et particulièrement des caséine αS . Ces peptides présentent une activité bactériostatique et/ou bactéricide.

Un glycopeptide basique, la casécidine est obtenue après hydrolyse du lait par la chymosine. Ce peptide présente *in vitro* une activité bactéricide sur *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* (Lahav *et al.*, 1971). L'isracidine, αS_1 -CN f(1-23), possède *in vivo* une activité bactéricide mise en évidence contre de nombreuses souches pathogènes (Lahav et Regelson, 1996). Plusieurs fragments de la caséine αS_2 ont été qualifiés d'agents antibactériens.

Ainsi, la casocidine-I, αS_2 -CN f(150-188), issue d'un hydrolysate obtenu à l'aide d'un mélange de trypsine, de pronase et d'endoprotéinase Glu-C, inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus carnosus* (Zucht *et al.*, 1995).

Les peptides obtenus par hydrolyse pepsique de la caséine αS_2 le f(164-179) et tout particulièrement le fragment f(183-207), inhibent la croissance d'*Escherichia coli* et de plusieurs bactéries à Gram positif comme *Micrococcus flavus*, *Listeria innocua* ou *Bacillus cereus* avec des MIC (concentration minimale inhibant la croissance bactérienne) allant de 8 à 100 μM (Recio et Visser, 1999).

De même, αS_2 -CN ovine et αS_1 -CN génèrent des peptides antibactériens après hydrolyse pepsique. En outre, six caractéristiques intrinsèques au peptide vont affecter son caractère antimicrobien : sa taille, sa séquence, sa charge, sa configuration spatiale, son hydrophobicité et son caractère amphiphile. L'étude menée par Adoui (2014) a identifié des fragments peptidiques dans l'hydrolysate pepsique des caséines camelines issus de αS_1 -CN f(66-90), f(83-98), f(109-126) et de l' αS_2 -CN f(106-129), f(1-19) et f(126-142).

1.4.2.1.5. Les peptides immunomodulateurs

Plusieurs investigations ont révélé que les peptides provenant des caséines pouvaient moduler à la fois le système immunitaire non spécifique et le système immunitaire spécifique (Korhonen et Pihlanto, 2006). La séquence de αS_1 -CN bovine libère deux fragments :

- le premier : f(194-199) est capable de stimuler *in vitro* la phagocytose et d'augmenter la résistance des souris à l'infection par *Klebsiella pneumoniae* (Migliore-Samour *et al.*, 1989) ;

- le second : f(1-23) exhibe une activité immunomodulatrice marquée (Minkiewicz *et al.*, 2000).

Hata (1999) signale qu'un autre fragment est libéré de αS_2 -CN : f(1-32). Malgré ces avancés, cette activité n'est pas encore mise en évidence pour les caséines du lait de dromadaire.

1.4.2.1.6. Les peptides antioxydants

Le stress oxydatif est un facteur responsable de l'apparition ou de l'évolution de diverses maladies, y compris les maladies cardiovasculaires, le vieillissement et le cancer.

Les antioxydants naturels apportent un complément bénéfique aux stratégies de défense endogène dans la lutte contre le stress oxydatif (Erdmann *et al.*, 2008). Les peptides d'origine alimentaire se sont révélés de puissants antioxydants sans effets secondaires importants (Sarmadi et Ismail, 2010).

A ce titre, les protéines du lait sont l'une des sources les plus fréquemment étudiées pour y déceler des antioxydants naturels. À ce jour, de nombreux antioxydants dérivés de caséines et des protéines de lactosérum ont été caractérisés par des essais chimiques *in vitro* (Pihlanto, 2006 ; Power *et al.*, 2013).

Parmi les peptides antioxydants identifiés à partir des caseines α S figurent les deux fragments issus de α S₁-CN, f(144-149), capable de piéger les radicaux DPPH, l'hydroxyle et l'anion superoxyde (Suetsuma *et al.*, 2000) et f(138-149), qui inhibe la peroxydation lipidique (Homayouni-Tabrizi *et al.*, 2016).

Il est intéressant de noter que plusieurs peptides dérivés du lait se distinguent par des propriétés multifonctionnelles, c'est-à-dire des séquences de peptides ayant deux ou plusieurs activités physiologiques différentes. Certaines régions de la structure primaire de la caséine contiennent des séquences peptidiques qui se chevauchent et qui exercent des activités différentes. Ces régions ont été considérées comme des zones stratégiques qui sont partiellement protégées contre une dégradation protéolytique poussée. Pour exemple, signalons le cas du fragment peptidique f(165-170), dérivé de la caséine α S₂ ovine, qui exerce à la fois une activité antibactérienne, antioxydante et antihypertensive (Gobbetti *et al.*, 2007).

1.4.2.2 Application des peptides bioactifs

Vu leur large spectre d'activité, les peptides bioactifs peuvent trouver leur utilisation dans différents secteurs : alimentaire, pharmaceutique et cosmétique. Pour cela, un intérêt commercial important est porté sur la production de ces peptides. Plusieurs aliments fonctionnels enrichis en peptides bioactifs sont commercialisés un peu partout dans le monde. Le tableau VI liste quelques-uns de ces produits contenant des peptides issus de caséines et leur effet bénéfique pour le consommateur. Là aussi, l'utilisation des caséines du lait de dromadaire n'est pas encore rapportée.

À ce jour, les peptides bioactifs sont valorisés comme ingrédients fonctionnels et nutraceutiques. La plupart des aliments formulés sont composés d'hydrolysats bruts ou des produits de fermentation et non par des peptides purifiés, en raison du coût élevé et du rendement faible généralement associés à la purification. De plus, des études ont montré que l'utilisation des hydrolysats bruts comme nutraceutique donne un meilleur effet comparativement aux peptides isolés, probablement dû à l'effet synergétique entre les différents peptides du mélange (Daliri *et al.*, 2017).

Actuellement, l'utilisation des techniques de filtration membranaire, à titre d'exemple l'ultrafiltration, présente une alternative aux techniques de purification. Cette technique relativement simple d'utilisation permet le fractionnement, la concentration et la séparation des peptides d'un mélange selon la masse moléculaire. Elle est largement utilisée dans l'industrie laitière.

Par ailleurs, une autre voie de valorisation en cours de croissance est la conception des nouveaux médicaments à base de peptides. Les industries pharmaceutiques se sont intéressés aux peptides bioactifs, d'une part, en raison de leur spécificité aux tissus cibles, leur toxicité relativement absente, leur dégradation facile dans l'environnement et généralement les peptides s'accumulent peu ou pas dans l'organisme (de Castro *et al.*, 2015), et d'autre part, l'absence de brevets explique aussi leur intérêt en relation avec cet axe de recherche.

Si les peptides présentent des avantages, leur utilisation thérapeutique se heurte à de nombreux écueils, notamment le coût de production à l'échelle industrielle ainsi que la dégradation rapide des peptides qui limite leur application.

Tableau VI : Produits commerciaux et ingrédients à base des peptides issus de caséines ayant des effets revendiqués sur la santé (d'après Korhonen et Pihlanto, 2006 ; Phelan *et al.*, 2009 ; Dziuba B et Dziuba M, 2014).

Protéines	Fragments peptidiques	Type du produit	Effet revendiqué sur la santé	Nom commerciale	Fabriquant
β -CN β -CN, κ -CN	Val-Pro-Pro Ile-Pro-Pro	Lait caillé	Hypotensif	Calpis	Calpis Co, Japan
α S1-CN	f(91-100)	Boisson lactée aromatisée, confiseries et gélule	Anxiolytique (anti-stress)	Prodiet F200/Lactium	Ingredia, France
α S1-CN	f(1-9), f(1-7), f(1-6)	Fromage dure avec une teneur de gras réduite	Aucun effet encore revendiqué	Festivo	MTT Agrifood Research, Finland
CN	peptides issus de caséines	Hydrolysat	Hypotensif	C12	DMV International, Holland
CN	caséinophosphopeptide	Hydrolysat	Aide à l'absorption des minéraux	Capolac	Arla Foods Ingredients, Sweden
CN	peptides issus de caséines	Hydrolysat	Amélioration de la force musculaire	PeptoPro	DSM Food Specialties, Norway
CN	un décapeptide issue de caséines	Boisson	Hypotensif	Casein DP Peptio	Kanebo, Japan
CN	caséinophosphopeptide	Chewing gum	Prévenir les caries dentaires	Recaldent	Cadbury Enterprises Pte Ltd.

CN : caséine



***Matériels
& méthodes***

II. Matériels & Méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau des structures de recherche suivantes :

- Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;
- Laboratoire de Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaire (BioDyMia) de l'Université Claude Bernard de Lyon 1, 01000 Bourg en Bresse, France ;
- Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine, Algérie.

Il a été sous tendu par les moyens ci-après indiqués.

2.1. Matériels

2.1.1. Appareillage

Dans chacun des établissements cités plus haut, un certain nombre d'équipement scientifique a été utilisé pour réaliser les différentes expérimentations :

2.1.1.1. Equipement utilisé au LABAB-UMMTO

- Unité de chromatographie liquide basse pression (Bio-Rad) ;
- Unité de chromatographie haute performance en phase inverse (RP-HPLC) avec une colonne analytique Lichrosorb C8 ;
- Unités d'électrophorèse sur mini cuves verticales (10×10 / 10×08 cm) (Hoeffer SE 200, SE 280) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU) ;
- Centrifugeuse réfrigérée (max 28 000xg ; SIGMA) ;
- Lyophilisateur à plateaux (Telstar LyoQuest) ;
- Autres matériels d'usage courants (balance de précision à 0,01 mg, Denver Instrument) ; balances analytiques à affichage digital (0,01 g ; Denver Instrument) ; pH-mètre (Hanna-Instruments) ; bain-Marie (Memmert) ; agitateurs variés...etc).

2.1.1.2. Equipement utilisé au laboratoire BioDyMIA-Lyon

- Unité de chromatographie liquide rapide des protéines (FLPC) ÄKTA pure (GE Healthcare, Suisse) équipée d'une colonne Hitrap DEAE-sépharose FF 5 mL ;
- Lyophilisateur Epsilon à plateaux (Christ) ;
- Spectrophotomètre (Biochrom, Nottingham, UK) ;
- Centrifugeuse réfrigérée (30070 x g, Sigma) ;
- Cellule d'ultrafiltration agitée (Amicon) ;
- Lecteur de microplaque Bioscreen ® C (Thermofisher, Illkirch).

2.1.1.3. Equipement utilisé au CRBt-Constantine

- Rotavapor (Buchi)
- Lecteur de microplaque (PerkinElmer, Enspire Multimode Plate Reader) ;

- Autres matériels d'usage courants (balance de précision (Kern ABT) ; pH-mètre (Mettler toledo ; bain-Marie (Julabo sw23) ; agitateur de microplaques (Heidolph titramax 100) ; agitateurs variés).

2.1.2. Matériel biologique

2.1.2.1. Echantillons de lait

Les échantillons de lait utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de chamelles saines (*Camelus dromedarius*) de la population *Sahraoui* vivant en élevage extensif dans des parcours naturels de trois régions du pays : M'sila, Laghouat et Ghardaïa.

Le lait est trait, recueilli proprement et additionné aussitôt d'un antimicrobien (azoture de sodium 0,002%, p/v). Les échantillons de lait sont conservés à 4 °C et transportés ainsi au laboratoire où ils sont analysés.

Parallèlement, du lait collecté de vaches saines de la région de Tizi-Ouzou a été utilisé à titre comparatif.

2.1.2.2. Enzymes et protéines étalon

- α -chymotrypsine (EC 3.4.21.1) extraite de pancréas bovin, activité de 57,24 U/mg (Sigma Chemical, États-Unis) ;
- Trypsine (EC 3.4.21.4) extraite de pancréas bovin, activité de 1645 U/mg de protéine (Sigma Chemical, États-Unis) ;
- Pepsine (EC 3.24.3.1) extraite de la muqueuse de l'estomac porcine, activité de 3000-4500 U/mg de protéine (1436) ;
- kit commercial prêt à l'emploi qui comprend dix protéines dont les MM s'étalent de 26 à 180 KDa (Bio-Rad, Etats-Unis) contenant : l'alpha 2 macroglobuline issue du sérum d'équin (180 KDa), la β -galactosidase d'*E-coli* (116 KDa), la lactoferrine du lait humain (90 KDa), la pyruvate kinase de muscle de lapin (58 KDa), la fumarase de cœur du porc (48,50 KDa), la déshydrogénase lactique de muscle du lapin (36,50 KDa) et enfin, la triose phosphate isomérase (26 KDa) ;
- kit de protéines étalons préparé au laboratoire de MM allant de 14,4 à 67 KDa ;
- Sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA ; USA) pour le dosage des protéines.

2.1.3. Produits chimiques et réactifs spécifiques

Acrylamide, N, N'-méthylène-bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, dodécyl sulfate de sodium (SDS), glycine, 2-mércaptoéthanol, persulfate d'ammonium, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED), réactif de Folin-Ciocalteu, Diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE-cellulose DE 52), Bouillon Mueller Hinton (MHB), acétonitrile, acide trifluoroacétique (TFA), acide trichloracétique (TCA).

2.2. Méthodes d'analyse

2.2.1. Mesure du pH

La mesure du pH est effectuée à une température du lait de +20 °C à l'arrivée d'échantillon au laboratoire, la valeur du pH est lue directement sur le pH-mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser.

2.2.2. Dosage de la teneur en protéines

La teneur en protéine a été déterminée selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) (annexe 1). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur deux réactions simultanées : une réaction de type Biuret, par laquelle les molécules polypeptidiques qui contiennent au moins quatre groupements (-CO-NH-) donnent en milieu alcalin un complexe cuivrique coloré et une réaction par laquelle les noyaux phénoliques de la tyrosine et du tryptophane et à un degré moindre la cystéine et l'histidine, réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu. Les intensités de coloration développées sont proportionnelles à la concentration en protéine dont la densité optique (DO) est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm.

La concentration en protéines des échantillons analysés est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine étalon (Figure 10).

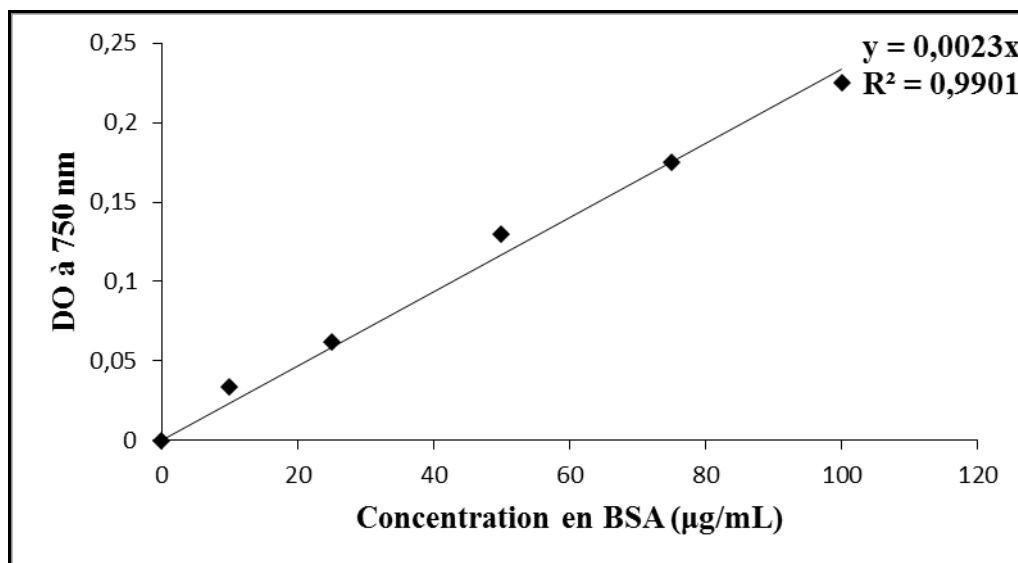


Figure 10 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951).
La BSA est utilisée comme protéine étalon.

2.2.3. Isolement des caséines totales

Les laits entiers (camelin et bovin) subissent un écrémage qui a été réalisé par chauffage du lait à 30 °C pendant 10 min suivi d'une centrifugation à 4500 xg pendant 20 min à 4 °C. La crème est écartée à l'aide d'une spatule tandis que le lait écrémé est filtré par passage à travers une laine de verre. Les caséines sont précipitées par acidification du lait écrémé à pH 4,3 pour le lait camelin comme préconisé par Wangoh *et al.* (1998) (Figure 11) et à pH 4,6 pour le lait bovin.

La précipitation est réalisée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique 4N, suivie d'une centrifugation à 3500 xg pendant 15 min à 20 °C. Les culots de caséines précipitées sont lavés deux fois sous agitation avec de l'eau distillée puis sont neutralisés à pH 7 avec une solution de NaOH 1M. L'opération est répétée deux fois afin d'éviter les traces de contaminations par les protéines de lactosérum.

Les caséinates de sodium obtenues sont dialysées contre de l'eau distillée contenant un antibactérien (azoture de sodium 0,005 M) pendant 72 h à 4°C avec un changement d'eau biquotidien. Une fois dialysées, les solutions de caséines sont lyophilisées et conservées sous cette forme jusqu'à leur utilisation. La pureté des caséines est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS ; PAGE-urée).

2.2.4. Séparation et purification des caséines α S par chromatographie

Les caséines α S camelines ont été isolées et purifiées par chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne de DEAE-cellulose en basse pression et sur une colonne DEAE-sépharose en FPLC.

La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur l'affinité qu'ont les ions ou les molécules en solution pour les ions de charge opposée de la phase stationnaire. Les résines utilisées sont des échangeurs anioniques faibles, sur lesquelles sont liés d'une façon covalente les groupements ammonium quaternaires (DEAE). Ces derniers sont chargés positivement à pH alcalin. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines suivant un ordre décroissant de leurs charges et ce, en augmentant progressivement la concentration en sel (force ionique).

2.2.4.1. Méthode de séparation adoptée en basse pression sur Biorad

Les α S-CN camelines ont été purifiées sur chromatographie échangeuse d'anions basse pression au moyen d'un appareillage semi-automatisé BioLogic LP, Biorad (Figure 12). Une solution de caséines totales camelines, à raison de 16 mg/mL est centrifugée à 20 000 xg pendant 40 min. Le surnageant est mélangé avec la DEAE-cellulose pré-équilibrée pendant 30 min à 4°C avec un tampon acétate de sodium 20 mM, pH 6,6 contenant 4 M d'urée, 35 mM d'éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et 0,01% (v/v) de 2-mercaptoéthanol (2-ME). Le mélange est ensuite introduit dans la colonne (1,5×15 cm).

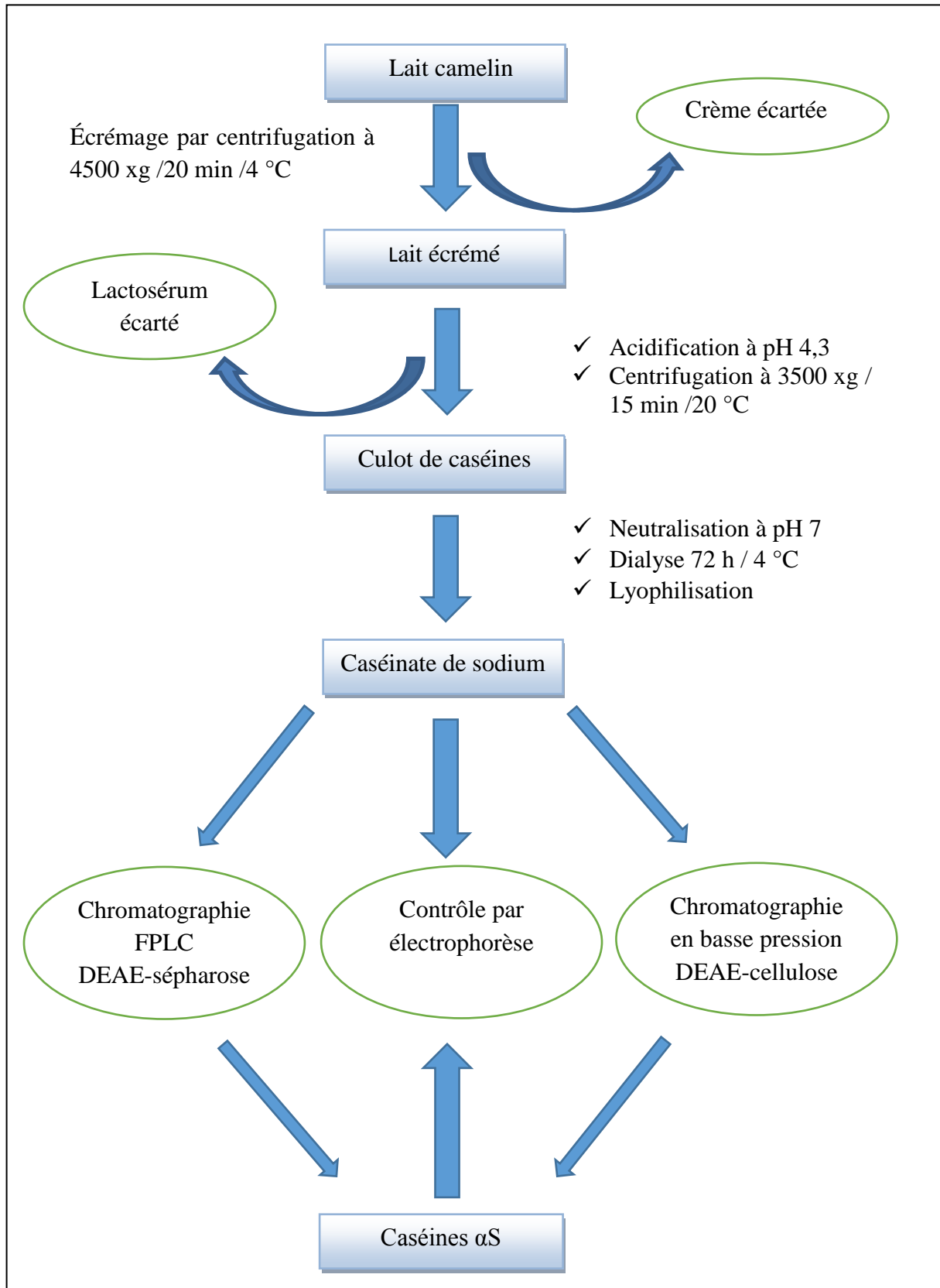


Figure 11 : Étapes suivies pour l'isolement et la purification des caséines α S camelines.

L'élution est réalisée à température ambiante (20 à 25 °C) par deux lavages. Le premier a lieu avec le tampon de départ, le second par le même tampon additionné de NaCl (1M) à un débit de 0,5 mL/min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 5 mL sont collectées. Après contrôle électrophorétique, les fractions contenant α S-CN sont dialysées, lyophilisées puis conservées sous cette forme.

2.2.4.2. Méthode adoptée en FPLC avec ÄKTA pure

Les α S-CN camelines ont été aussi purifiées par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) au moyen d'un appareillage automatisé ÄKTA pure (Figure 13). Les protéines ont été séparées sur une colonne DEAE-sépharose (FF 5 mL, 1,6 × 2,5 cm).

Un volume de 30 mL de la solution de caséines totales centrifugée est injecté dans la colonne pré-équilibrée avec le tampon acétate de sodium (20 mM, pH 6,6) contenant 4 M d'urée, 35 mM d'EDTA 0,01% (v/v) de 2-ME. L'élution est réalisée à température ambiante (20 à 25 °C) par un premier lavage avec le tampon de départ suivi d'un deuxième lavage de même tampon additionné de NaCl (1 M) à un débit de 1 mL/min. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 6 mL sont collectées. Après contrôle électrophorétique, les fractions contenant les α S-CN sont dialysées contre l'eau Milli-Q, lyophilisées et conservées à -20 °C.

2.2.4.3. Chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse permet la séparation des molécules d'un mélange selon leur hydrophobicité relative. Cette technique possède un large éventail d'applications en raison de la disponibilité des différentes phases mobiles et stationnaires. La phase stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C8 et C18).

L'analyse en RP-HPLC a été réalisée à l'aide d'un système automatique de type LC-10 AT, SHIMADZU (Figure 14).

Les α S-CN sont solubilisées à raison de 3 mg/500 μ l dans un tampon bis-tris contenant 8M urée, 1,3% citrate de sodium, 0,1M bis-tris et 0,3% 2-ME. Le mélange est tout d'abord filtré à travers un filtre à membrane en nylon 0,45 μ m, puis un volume de 60 μ l est injecté dans une colonne Lichrosorb C8 (5 μ m, 125 x 4,1 mm). La phase mobile est constituée d'un solvant A (10% acétonitrile, 90% eau ultra pure et 0,1% TFA) et d'un solvant B (60% acétonitrile, 40% eau ultra pure et 0,1% TFA).

L'élution est effectuée à un débit de 0,2 mL/min sous une température de 38 °C en utilisant un gradient binaire (0-50%) pendant 50 min. La détection est réalisée à deux longueurs d'onde 280 et 215 nm et les spectres UV sont exploités avec le logiciel Shimadzu class vp.

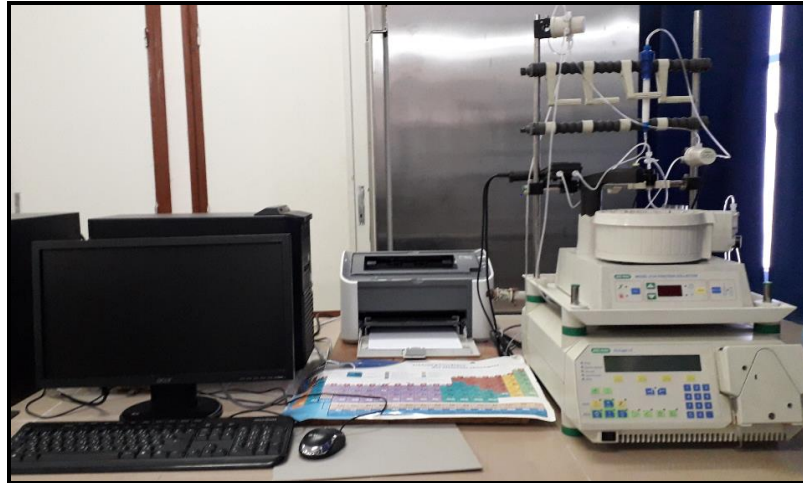


Figure 12 : Appareillage de chromatographie liquide basse pression (BioLogic LP, Biorad).



Figure 13 : Appareillage de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) ÄKTA pure.



Figure 14 : Appareillage de chromatographie liquide haute performance HPLC (LC-10 AT, SHIMADZU).

2.2.5. Caractérisation électrophorétique des préparations

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines du fait de leur caractère amphotère peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer soit vers l'anode ou la cathode selon leurs caractéristiques physico-chimiques. Elles sont visualisées sur l'électrophorégramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE), est la technique la plus utilisée en raison des avantages qui sont procurés par le gel tels la transparence, la reproductibilité élevée et la possibilité de varier à volonté sa porosité, en changeant les concentrations de l'acrylamide et son monomère le bis acrylamide (N, N-méthylène-bis-acrylamide), selon les indices T et C qui déterminent la structure du gel et qui sont définis par les relations suivantes :

$$T = (a+b/v) \times 100(\%) ; C = (b/ a+b) \times 100(\%)$$

a : acrylamide (g) ; **b** : N, N-méthylène -bis acrylamide (g) ; **v** : volume du tampon (mL).

Notons que la polymérisation du gel requière la formation de radicaux libres qui vont initier ce processus. Ceci est rendu possible en utilisant notamment le persulfate d'ammonium $(NH_4)_2S_2O_8$ en présence d'un accélérateur de radicaux tel le TEMED (ou N, N, N, N-tétraméthylène diamine).

2.2.5.1. Électrophorèse en présence d'urée et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-urée)

Du fait de leurs structures micellaires et des liaisons inter-protéiques denses qui se trouvent aux seins des caséines, ces dernières ne peuvent pas être séparées efficacement en électrophorèse dans des conditions natives. C'est pour cette raison qu'il va falloir utiliser des agents dissociant comme l'urée (qui rompt les liaisons hydrogène) et le β -mercaptoéthanol ou 2-ME (qui rompt les ponts S-S) pour pouvoir les séparer sur un gel d'électrophorèse.

Aussi, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée (PAGE-urée) est la méthode la plus indiquée pour faire migrer et discriminer les caséines sur un gel de porosité appropriée.

Pour cela, la méthode en gels et tampons discontinus décrite par Medrano et Sharrow (1989) a été adoptée. Elle repose sur la préparation d'un gel de concentration (T : 4,6% et C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0.375 M, pH 6,8 contenant de l'urée (4 M) et un gel de séparation (T : 8% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,9 contenant la même concentration en urée. Le tampon d'électrode (pH 8,3) est constitué de Tris 5 mM et de glycine 77 mM (annexe 3).

Les échantillons, sous forme lyophilisée, sont dissous à raison de 1 mg/mL dans 8% (v/v) du tampon de gel de concentration contenant [3,3 M de l'urée, 0,3% (v/v) de 2-ME, 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol]. Des dépôts de 10 μ L sont effectués

dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous 200 V (10 mA) pendant 2 h environ.

2.2.5.2. Électrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS)

Ce type d'électrophorèse est basé sur la séparation des protéines d'un mélange uniquement selon leur taille dans un gel de porosité appropriée. En effet, l'utilisation d'un détergent anionique en excès comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) va conférer une charge négative à l'ensemble des entités protéiques présentes dans le milieu. Le seul critère discriminant qui va rester dans ce cas est la différence de leur masse moléculaire.

La méthode utilisée est celle de Laemmli et Favre (1973) qui utilise une superposition de deux gels ayant des caractéristiques et des objectifs différents :

- le gel de séparation (T : 15% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS est préparé est coulé en premier dans la cuve à raison de 70% environ de sa dimension :
- une fois ce gel solidifié, un deuxième gel de concentration est coulé dessus. Ce dernier est composé d'acrylamide (T : 4%, C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (m/v) de (SDS).

Le tampon d'électrode (pH 8,3) est constitué de 50 mM de Tris, 384 mM de glycine et de 0,1% (m/v) de SDS.

Les échantillons sous forme lyophilisée sont dissous à raison de 1 mg/mL dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 6,8 contenant [10% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-ME, 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol]. Le mélange est ensuite chauffé à 100 °C pendant 3 min. Des dépôts de 10 µL sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous 200 V (20 mA) pendant 2 h 30 environ (annexe 2).

La détermination du poids moléculaire des entités séparées s'effectue en faisant migrer dans un puit et dans les mêmes conditions, des protéines étalons de PM connus. Une courbe $\text{Log PM} = f(\text{distance parcourue})$ est utilisée pour la détermination du PM des entités protéiques (Figure 15).

Aussi bien pour la PAGE-urée que pour la PAGE-SDS et après migration électrophorétique, les protéines sont fixées dans le gel par de l'acide trichloracétique (TCA) à 12% (m/v) pendant 45 min, puis colorées pendant 2 h par du bleu de Coomassie R250 à 0,1% (m/v) dans un mélange d'éthanol à 50% (v/v) et de TCA à 2% (m/v). La décoloration est effectuée par plusieurs lavages dans une solution d'éthanol, eau et acide acétique à des proportions de (3 /6,25 /0,75, v/v/v).

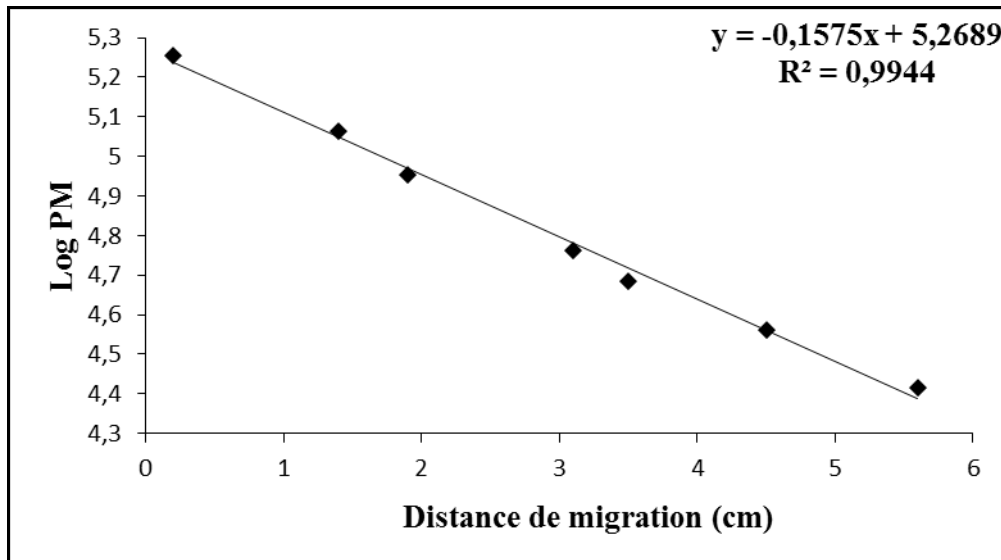


Figure 15 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS en utilisant un Kit de protéines étalons.

2.2.6. Sensibilité des caséines α S à l'action des enzymes gastro-intestinales

Afin d'avoir une idée sur la sensibilité des caséines α S camelines vis-à-vis de l'action des protéases gastro-intestinales choisies : trypsine, pepsine et chymotrypsine, différents rapports enzyme/substrat ont été testés. Suite à ces essais, le rapport optimum adopté est de 1/100.

L'hydrolyse trypsique et chymotrypsique est effectuée à pH 7,8 [tampon phosphate, 20 mM ; 0,02% (m/v) d'azoture de sodium] alors que celle ayant lieu avec la pepsine est réalisée à pH 2 [0,01N HCl, 0,02% (m/v) d'azoture de sodium]. Les mélanges réactionnels sont homogénéisés pendant quelques secondes puis incubés à 37 °C au bain-Marie. L'arrêt de l'hydrolyse se fait par chauffage à 90 °C pendant 10 min. Des prélèvements à différents intervalles de temps : 2,5, 5, 10, 15, 30, 60 min et 2, 4, 6, 24 h ont été effectués. Les hydrolysats ont été analysés en PAGE-SDS et en RP-HPLC.

2.2.7. Hydrolyse enzymatique

2.2.7.1. Hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine

L'hydrolyse trypsique et chymotrypsique est effectuée selon le protocole décrit par Salami *et al.* (2011). Les α S-CN sont solubilisées à raison de 5% (p/v) dans un tampon phosphate 20 mM, pH 7,8. Des volumes appropriés de solutions enzymatiques sont additionnés aux solutions caséiniques afin d'obtenir un rapport E/S de 1%. Les milieux réactionnels sont incubés à 37 °C pendant 2 h, la réaction est arrêtée par chauffage à 85 °C pendant 15 min.

Les hydrolysats sont centrifugés à 15 000 xg pendant 20 min à 4 °C puis les surnageants sont récupérés. Des prélèvements représentant la fraction d'hydrolysats brut sont effectués. L'hydrolysats restant est fractionné au moyen d'un système d'ultrafiltration (avec un seuil de coupure de 10 KDa). A la fin de cette opération, trois fractions obtenues pour chaque

hydrolysats : hydrolysats brut, la fraction de haut poids moléculaire (PM > 10) et la fraction de faible poids moléculaire (PM < 10). Ces fractions sont dialysées, lyophilisées et conservées sous cette forme jusqu'à leur utilisation.

2.2.7.2. Hydrolyse par la pepsine

Dans le but de générer des peptides antibactériens conformément aux recommandations de Bellamy *et al.* (1992), les α S-CN sont solubilisées à raison de 5% (p/v) dans de l'eau Milli-Q ajustée à pH 2 avec de HCl (1N). La pepsine est ajoutée dans un rapport E/S de 3%. Le mélange réactionnel est incubé à 37 °C pendant 4 h. L'hydrolyse est arrêtée par ajustement de pH à 7 avec de NaOH (1 M) suivi d'un chauffage à 85 °C pendant 15 min.

L'hydrolysats est centrifugé à 15 000 xg pendant 20 min à 4 °C, le surnageant est récupéré puis fractionné par ultrafiltration sous une pression de 2 mbar, en utilisant deux membranes (diamètre = 76 cm), à seuils de coupures respectives de 1 et 10 kDa. Après fractionnement, trois fractions peptidiques sont obtenues : une fraction de poids moléculaire supérieur à 10 KDa (PM > 10), une fraction de poids moléculaire intermédiaire (1 < PM < 10) et une fraction de poids moléculaire inférieur à 1KDa (PM < 1). Ces trois fractions sont dialysées, lyophilisées et conservées jusqu'à leur utilisation.

2.2.7.3. Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH), défini comme le pourcentage de liens peptidiques coupés, est utilisé pour le contrôle de l'hydrolyse enzymatique et la caractérisation des hydrolysats protéiques. Le DH peut être déterminé en continu par la technique pH-stat ou en utilisant des réactifs spécifiques aux amines primaires comme l'O-phthaldialdéhyde (OPA) et l'acide trinitrobenzène-sulfonique (TNBS). Cette dernière mesure la densité optique à 339 nm du chromophore résultant de l'interaction de ce réactif sur l'amine primaire des extrémités N-terminales des entités protéiques et des chaînes latérales de la lysine. Au fur et à mesure que l'hydrolyse se produit, la teneur en ces amines, et donc la DO, augmente dans le milieu réactionnel (Figure 16) (Adler-Nissen, 1979).

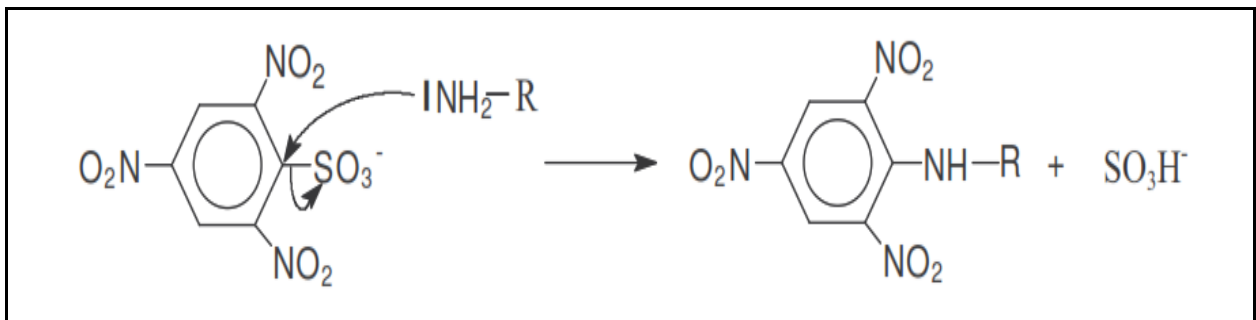


Figure 16 : Réaction de TNBS avec le groupement amine primaire (Adler-Nissen, 1979).

Le dosage a été réalisé selon la méthode décrite par McKellar (1981) avec quelques modifications. 500 μ L de tampon bicarbonate de sodium (0,1 M) à pH 8,5 contenant l'échantillon à doser sont mélangés avec 250 μ L de réactif TNBS (0,01%) préparé

extemporanément. Après homogénéisation, le milieu réactionnel est incubé à 37 °C pendant 2 h à l'obscurité. L'arrêt de la réaction se fait par ajout de 250 µL de SDS (10%) et 125 µL d'HCl (1M). L'absorbance est lue à 339 nm par spectrophotométrie contre le blanc. Une gamme étalon de L-leucine est réalisée (Figure 17). Le DH est calculé comme suit :

$$\text{DH (\%)} = 100 (\text{AN2} - \text{AN1}) / \text{Npb}$$

- **AN1** : la teneur en azote aminé du substrat protéique avant hydrolyse (mg/g protéine) ;
- **AN2** : la teneur en azote aminé du substrat protéique après hydrolyse (mg/g) ;
- **Npb** : la teneur en azote des liaisons peptidiques dans le substrat protéique (mg/g).

Les valeurs d'**AN1** et **AN2** ont été obtenues en référence à une courbe standard d'absorbance à 339 nm par rapport à l'azote aminé (mg/L) généré avec la L-leucine.

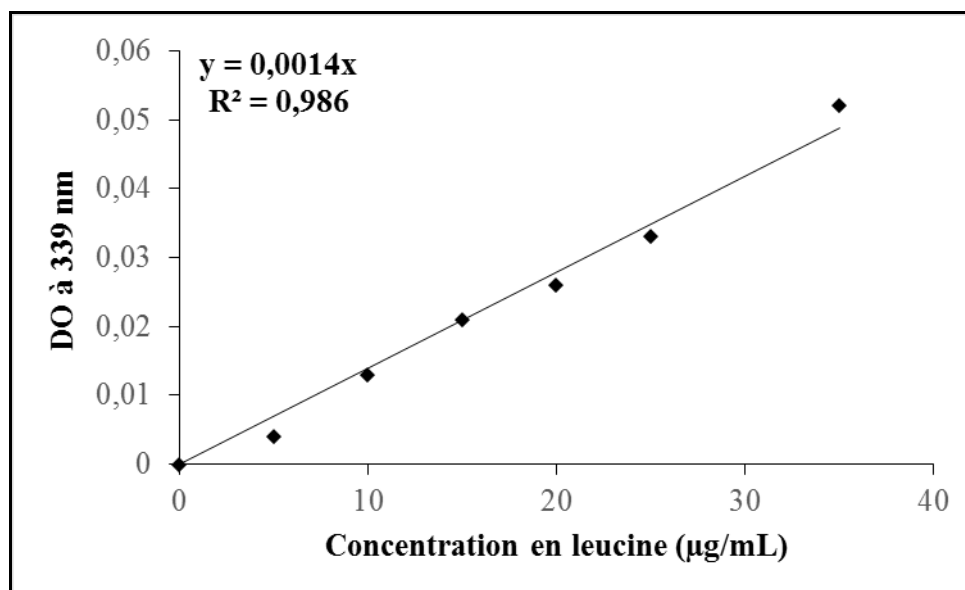


Figure 17 : Courbe étalon du dosage des groupements amines libres réalisée avec la L-leucine.

2.2.8. Évaluation des activités biologiques

2.2.8.1. Activité antioxydante

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des mécanismes d'action des antioxydants, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. De ce fait, quatre tests complémentaires sont combinés afin d'avoir une indication sur la capacité antioxydante des caséines α S et ses fractions d'hydrolyse (trypsique et chymotrypsique).

2.2.8.1.1. Test de piégeage du radical ABTS

L'ABTS est un radical libre stable largement utilisé pour évaluer l'activité des composés d'origine alimentaire piégeant les radicaux libres (Kumar *et al.*, 2016a).

La présente méthode est basée sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical cation ABTS^{•+} en ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. L'addition d'un antioxydant à une solution de ce radical entraîne sa réduction et une diminution de l'absorbance à 734 nm. Cette diminution dépend de l'activité antioxydante du composé testé, mais souvent aussi du temps et de la concentration.

En pratique, le radical ABTS est produit par réaction de 7 mM ABTS avec 2,45 mM de persulfate de potassium (Re *et al.*, 1999). La solution est conservée à l'obscurité, à température ambiante pendant 12 à 16 heures. 160 µl de la solution ABTS^{•+} sont mélangés avec 40 µl d'échantillon à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance est lue à 734 nm par un lecteur de microplaques. Le BHA et le BHT sont utilisés comme des antioxydants de référence. Le pourcentage (%) de piégeage du radical ABTS est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage du radical ABTS} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance en absence du composé à tester ;

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance en présence du composé à tester.

2.2.8.1.2. Test de piégeage du radical hydroxyle

Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif des espèces réactives d'oxygène, il provoque la détérioration des aliments et l'oxydation des biomolécules conduisant à des dommages cellulaires.

L'activité de piégeage du radical hydroxyle est mesurée selon la méthode décrite par Smirnoff et Cumbes (1989). Cette méthode est basée sur la production du radical hydroxyle dans le milieu par la réaction de Fenton où l'intensité du chromophore formé est inversement proportionnelle au pouvoir de piégeage.

L'échantillon à différentes concentrations est mélangé avec 12 µl de sulfate de fer, 10 µl de peroxyde d'hydrogène et 40 µl d'acide salicylique. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37 °C. Après incubation, 18 µl d'eau bi-distillée sont ajoutés. L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence. L'absorbance est lue à 510 nm. Le pourcentage (%) de piégeage du radical hydroxyle est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage du radical hydroxyle} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance en absence du composé à tester ;

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance en présence du composé à tester.

2.2.8.1.3. Test de chélation du fer

L'ion ferreux est un métal pro-oxydant important qui intervient dans les processus d'auto-oxydation et dans la production des radicaux libres (Huang *et al.*, 2002). Leur chélation aide à retarder la peroxydation et à prévenir le rancissement des aliments.

La méthode de chélation des ions ferreux est basée sur l'inhibition de la formation du complexe stable Ferène-Fe²⁺, chromophore de couleur bleu. Plus la coloration est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

L'activité chélatante des ions ferreux (Fe²⁺) est évaluée selon la méthode décrite par Decker et Welch (1990), ayant subi quelques modifications. La solution de l'échantillon à différentes concentrations est mélangée avec 40 µl de FeCl₂ et 80 µl de Ferène. Le mélange est agité et incubé pendant 10 min à température ambiante puis l'absorbance est mesurée à 593 nm. L'EDTA est utilisé comme antioxydant de référence. L'effet chélateur des ions ferreux est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Effet chélateur (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: absorbance en absence de composé à tester ;

$A_{\text{échantillon}}$: absorbance en présence de composé à tester.

2.2.8.1.4. Test de blanchissement du β-Carotène

La peroxydation incontrôlée des lipides dans les aliments détériore non seulement leur qualité nutritionnelle, mais peut aussi causer des maladies chroniques chez le consommateur suite à la libération de produits toxiques. Pour évaluer l'effet inhibiteur de cette activité par les αS-CN et leurs fractions d'hydrolyse, nous avons utilisé le test de blanchissement du β-carotène.

Cette méthode est basée sur la perte de la couleur rouge du β-carotène. L'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β-carotène entraînant ainsi la disparition de sa couleur, qui est suivie par spectrométrie à 470 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β-carotène.

La méthode adoptée est celle décrite par Marco (1968) avec une légère modification. Une émulsion (β-carotène/acide linoléique) est préparée par solubilisation de 2 mg du β-carotène dans 1 mL de chloroforme. Cette émulsion est additionnée de 25 µl d'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après évaporation complète du chloroforme au rotavapor, 100 mL d'eau saturée en oxygène sont ajoutés. L'émulsion résultante est vigoureusement agitée. Dans des microplaques à 96 puits, 160 µl de la solution ci-dessus sont ajoutés à 40 µl de la solution d'échantillon à différentes concentrations. L'absorbance est mesurée à 470 nm à t=0 et à t=120 min d'incubation à 50 °C. Le taux de blanchiment (R) du β-carotène est calculé selon l'équation suivante :

$$R = (\ln a/b) / t ;$$

Où **a** est l'absorbance au temps zéro et **b** est l'absorbance au temps **t** (120 min).

Le BHA et le BHT sont utilisés comme des antioxydants de référence. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antioxydante (\%)} = [(R_{\text{témoin}} - R_{\text{échantillon}}) / R_{\text{témoin}}] \times 100$$

Les résultats des différents tests antioxydants sont rapportés en calculant les valeurs des IC_{50} (mg/mL), qui est définie comme étant la concentration de l'échantillon qui donne un pourcentage d'inhibition de 50 % du phénomène oxydatif.

2.2.8.2. Activités enzymatiques

2.2.8.2.1. Activité inhibitrice de la tyrosinase

La tyrosinase (EC 1.14.18.1) est l'enzyme clé de la biosynthèse de la mélanine. C'est une métallo-enzyme qui contient du cuivre dans son site actif. Elle appartient à la famille des polyphénoloxidasés (PPOs), groupe des O-diphénol-oxydase. Cette enzyme catalyse les deux premières réactions de la formation de la mélanine, à savoir l'hydroxylation de la L-tyrosine et l'oxydation de la L-DOPA (ou 3,4-dihydroxyphénylalanine), qui est le précurseur de la dopamine.

L'excès de mélanine provoque différents problèmes cutanés chez L'Homme ainsi que le brunissement enzymatique des aliments d'origine végétale. D'où l'inhibition de l'activité de la tyrosinase est une cible importante dans les domaines de la médecine, la cosmétique et de l'alimentaire (Kim, 2005). De nombreux inhibiteurs synthétiques et naturels ont été rapportés, mais leur utilisation est en cours de restriction à raison de leurs effets indésirables. En conséquence, la recherche est tournée vers la découverte des oligopeptides comme source alternative.

L'activité inhibitrice de la tyrosinase des αS -CN et de ses fractions d'hydrolyse a été déterminée selon la méthode de la dopachrome en utilisant la L-DOPA comme substrat. En présence de la tyrosinase, la L-DOPA s'oxyde en dopaquinone, un composé chromophore qui absorbe à 475 nm. Une faible intensité indique un effet inhibiteur important de la tyrosinase.

La méthode adoptée est celle décrite par Chan *et al.* (2008). Le tampon phosphate (0,1 M, pH 6,8) est mélangé avec 10 μ L d'échantillon à tester et 20 μ L de la solution enzymatique de tyrosinase (*mushroom tyrosinase*). Le mélange réactionnel est agité puis incubé pendant 10 min à 37 °C. Après incubation, 20 μ L de L-DOPA sont ajoutés. L'absorbance est lue à 475 nm. L'acide kojique est utilisé comme inhibiteur de référence. Le pourcentage d'inhibition de l'activité tyrosinase est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance en absence du composé à tester ;

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance en présence du composé à tester.

2.2.8.2.2. Activité inhibitrice de l'uréase

L'uréase (EC 3.5.1.5) est une métallo-enzyme nickel-dépendante qui appartient à la famille des amidohydrolases et des phosphoestérases (Krajewska, 2009). Elle catalyse la réaction d'hydrolyse de la molécule d'urée en ammoniac (NH_3) et en dioxyde de carbone (CO_2) (Figure 18).

L'activité prononcée de cette enzyme a des impacts négatifs sur la qualité et la santé des organismes. Notons que l'uréase bactérienne produite par *Helicobacter pylori* est un facteur de virulence qui contribue au développement de plusieurs maladies gastriques, notamment l'ulcère gastroduodéal et l'adénocarcinome. Les stratégies basées sur l'inhibition de l'uréase sont considérées actuellement comme la première ligne de traitement pour les infections causées par ces bactéries. Plusieurs inhibiteurs d'uréase sont décrits, mais leur toxicité et/ou leur instabilité empêchent leur utilisation *in vivo* (Krajewska, 2009 ; Upadhyay, 2012). D'où la recherche de nouvelles sources naturelles d'inhibiteurs.

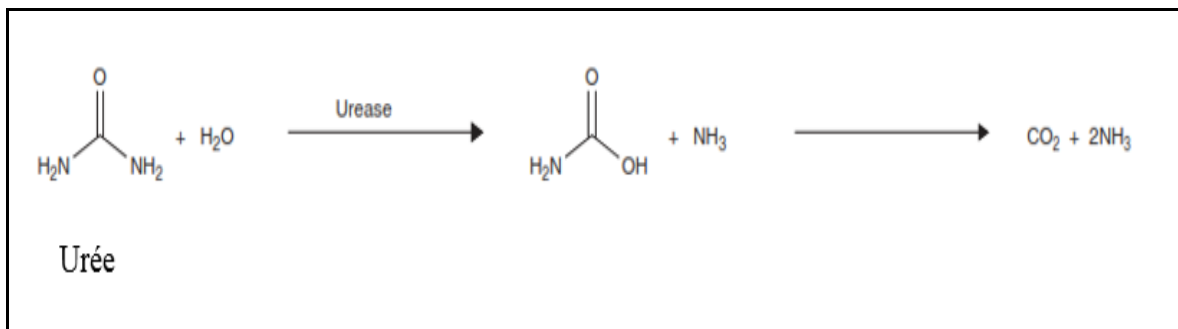


Figure 18 : Réaction de catalyse de l'urée par l'uréase (Kosikowska et Berlicki, 2011).

L'activité inhibitrice de l'uréase des α S-CN et de ses fractions d'hydrolyse a été évaluée en mesurant la production d'ammoniac selon la méthode de l'indophénol décrite par Weatherburn (1967). Cette méthode est basée sur la réaction de Berthelot. La molécule d'ammoniac se fixe sur une molécule de phénol en présence du chlore formant un complexe de type indophénol qui donne une coloration bleue. Une faible intensité indique un effet inhibiteur important.

En pratique, 10 μl d'échantillon à tester sont mélangés avec 25 μl de la solution enzymatique (*Jack bean urease*) et 50 μl d'urée préparé dans un tampon phosphate de sodium (pH 8,2). Le mélange réactionnel est mis en incubation dans une microplaque à 96 puits pendant 15 min à 30 °C. Après incubation, 45 μl de réactif phénol et 70 μl de réactif alcalin sont additionnés à chaque puits. Après homogénéisation, le milieu réactionnel est incubé une autre fois pendant 50 min à 30 °C puis l'absorbance est lue à 630 nm. La thiourée est utilisée comme inhibiteur de référence. Le pourcentage d'inhibition de l'activité uréase est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = \left[\frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$: Absorbance en absence du composé à tester ;

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance en présence du composé à tester.

2.2.8.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'hydrolysate pepsique

Les α S-CN et leurs fractions d'hydrolyse pepsique sont testés pour leur effet antibactérien contre trois souches impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires ; une souche à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922) et deux souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* CNRZ 3 et *Listeria innocua* ATCC 33090). L'activité antibactérienne est mise en évidence par la méthode de microdilution.

- **Préparation des inocula bactériens**

Les souches bactériennes ont été conservées dans des cryotubes contenant du Bouillon Mueller-Hinton (MHB) et 15% de glycérol à -20 °C. Après décongélation, des prélèvements de 1 mL de chaque souche sont inoculés dans 9 mL de MHB et incubés pendant 24 h à 30 °C pour *Listeria innocua* et à 37 °C pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Après 24 h d'incubation une deuxième culture est préparée en prélevant 1 mL de la première culture de chaque souche qui est l'inoculé dans 9 mL de MHB pendant 8 h dans les mêmes conditions. Après 8 h d'incubation, une troisième culture est préparée de la même manière pour une incubation de 16 h. L'inoculum de chaque souche est préparé à partir de cette troisième culture par dilution pour avoir une charge bactérienne de 10^6 UFC/mL.

- **Évaluation de l'activité antibactérienne**

Les α S-CN et leurs fractions d'hydrolyse pepsique ont été testées à raison de deux concentrations 0,5 mg/mL et 1 mg/mL. Les échantillons sont préparés dans le MHB puis filtrés à travers un filtre de 0,22 μ m.

La méthode adoptée est celle décrite par Bouarab-Chibane *et al.* (2017). Dans des microplaques de 100 puits, 270 μ l de MHB contenant l'échantillon à tester ou sans échantillon (contrôle négatif) est mélangé avec 30 μ l de chaque culture bactérienne. La nisine (2400 U/mL) et la ciprofloxacine (2 mg/L) sont utilisées comme contrôle positif pour les bactéries Gram positive (*S.aureus*, *L.innocua*) et Gram négative (*E.coli*), respectivement.

Les microplaques sont incubées pendant 24 h à 37 °C sous agitation dans l'appareil Bioscreen C. Après incubation, l'absorbance est lue à 600 nm. L'effet antibactérien se traduit par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne après 24 h d'incubation à 37 °C selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A \text{ témoin négatif} - A \text{ échantillon}) / A \text{ témoin négatif}] \times 100$$

A témoin négatif : absorbance de la souche dans milieu MHB ;

A échantillon : absorbance de la souche en présence de l'échantillon à tester.

2.2.9. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart-type pour trois répétitions. L'analyse statistique est réalisée au moyen de logiciel GraphPad Prism7.00, en utilisant le test de variance ANOVA. La différence est considérée significative pour un $p < 0,05$.



***Résultats &
discussion***

III. Résultats & discussion

Chapitre 1 : Isolement, purification et caractérisation des caséines α S camelines

3.1.1. Analyse physico-chimique du lait collecté

Le lait camelin collecté à travers trois régions du pays (M'Sila, Laghouat et Ghardaïa) a fait l'objet aussitôt son arrivée au laboratoire d'analyses physico-chimiques afin de vérifier l'état de sa fraîcheur et évaluer les teneurs relatives en ses principales entités protéiques, tant sériques que micellaires.

Les valeurs du pH et les résultats du dosage des fractions protéiques sont récapitulés dans le tableau VII. Le pH des laits de dromadaire analysés, issus de petits mélanges, se situe en moyenne autour de $6,62 \pm 0,02$. Cette valeur, qui est similaire à celle du lait frais de brebis, est légèrement plus basse que celle du lait de vache (pH=6,8).

Comme le pH d'un lait frais de dromadaire varie entre 6,5 et 6,7 (Al-Haj et Al-Kanhal, 2010 ; Adugna *et al.*, 2014), nous pouvons conclure que les valeurs de pH du lait collecté analysé confirment le bon état de fraîcheur de ce dernier, ce qui suggère que ses protéines se trouveraient à l'état relativement natif, où les réactions de protéolyse induites par les conditions du milieu sont limitées.

Notons que les valeurs mesurées concordent globalement avec celles rapportées par différents auteurs (Alloui-Lombarkia *et al.* (2007) ($6,65 \pm 0,31$ et $6,69 \pm 0,04$)) et Siboukeur (2005) ($6,65 \pm 0,25$).

Tableau VII : Mesure du pH et teneur en protéines (g/L) des différents laits collectés.

Échantillons	Lait de dromadaire			Lait de vache
	E1	E2	E3	
pH	$6,53 \pm 0,04$	$6,67 \pm 0,004$	$6,66 \pm 0,004$	$6,70 \pm 0,06$
PT	$27,81 \pm 1,765$	$33,76 \pm 0,251$	$31 \pm 1,984$	$26,5 \pm 1,30$
PS	$6,04 \pm 0,451$	$7,26 \pm 0,470$	$8 \pm 1,449$	$6 \pm 0,95$
CN	$21,76 \pm 1,702$	$26,50 \pm 0,674$	$23 \pm 0,998$	$20,5 \pm 1,55$

PT : protéines totales ; **PS :** protéines totales de lactosérum ; **CN :** caséines totales.

E1 : lait provenant de M'Sila ; **E2 :** lait collecté de Laghouat ; **E3 :** lait issu de Ghardaïa.

Le dosage de la fraction protéique des trois échantillons du lait de dromadaire donne une teneur moyenne en protéines totales de $30,85 \pm 1,33$ g/L, supérieur à celle enregistrée pour le lait de vache ($26,5 \pm 1,3$ g/L). Des teneurs similaires ($29,4$ g/L), collectées dans les régions sahariennes du pays, ont été rapportées (Alloui-Lombarkia *et al.*, 2007), tandis que d'autres auteurs mentionnent des teneurs relativement plus élevées ($33,1$ et $35,68$ g/L), respectivement par (Saidi *et al.*, 2005 et Siboukeur, 2005). Selon Al- Haj et Al-Kanhal (2010) et, en se basant

sur une méta-analyse des données relatives à ces trente dernières années, la teneur moyenne en protéine totale du lait camelin est estimée à 31 g/L.

Les variations constatées dans les teneurs rapportées dans la littérature sont imputées à divers facteurs, parmi eux : la race (Mehaia *et al.*, 1995), l'alimentation, la saison (Haddadin *et al.*, 2008) et le stade de lactation (Konuspayeva *et al.*, 2009).

Quant au dosage des caséines, la teneur des laits de dromadaire analysés est en moyenne de $23,75 \pm 1,12$ g/L (contre $20,5 \pm 1,55$ g/L pour le lait bovin), ce qui représente 77% des protéines totales. Ces valeurs concordent dans leur ensemble avec celles rapportées par Kihal *et al.* (1999) et Saidi *et al.* (2005) avec 24,53 et 23,15 g/L, respectivement pour des échantillons de lait camelin prélevés au sud de notre pays. Toutefois, des teneurs légèrement plus faibles sont signalées par d'autres auteurs (19,7 par Kamoun, 1995 ; 19,8 g/L par Haddadin *et al.*, 2008).

3.1.2. Isolement et contrôles électrophorétiques des préparations

3.1.2.1. Isolement des caséines totales

La précipitation acide des caséines laitières est utilisée comme méthode de séparation, car elle est rapide, reproductible et ne nécessite pas de moyens particuliers en dehors de l'acide chlorhydrique dilué.

Pour cela, l'isolement des caséines totales est conduit en réalisant une précipitation à pH 4,3 comme suggéré par Wangoh *et al.* (1998) et Kherouatou *et al.* (2003). Ces auteurs ont souligné que la précipitation acide réalisée classiquement à pH 4,6 sur le lait de référence n'entraîne pas une précipitation totale des caséines du lait camelin. Le même effet est d'ailleurs constaté sur le lait caprin où la précipitation isoélectrique totale a lieu à pH 4,2 (Mati, 1992). Cette différence dans le seuil de séparation est due à des variations dans le nombre et la nature des acides aminés constitutifs de ces caséines (Cayot et Lorient, 1998).

L'ensemble des précipitations réalisées dans cette première étape nous ont permis d'obtenir une séparation nette entre les culots contenant les caséines et les surnageants où nous retrouvons les protéines sériques. Néanmoins, nous avons dû refaire à chaque fois deux fois les centrifugations (après re-dissolution des culots) afin d'éliminer les traces de contaminants protéiques dans les deux phases.

3.1.2.2. Comportement électrophorétique des caséines totales

L'analyse électrophorétique est réalisée dans le but d'évaluer l'état des préparations effectuées et de procéder à une pré-identification de la fraction caséinique séparée en confrontant les profils obtenus avec ceux du lait de référence et aux données bibliographiques compilées sur le lait de dromadaire. Il est clair que l'identification précise de ces entités nécessite le recours au séquençage des extrémités N-terminales et leur comparaison à des séquences préalablement établies.

En PAGE-urée (Figure 19 A), les profils électrophorétiques obtenus des caséines camelines sont très comparables entre-eux, ce qui laisse supposer que le lait de dromadaire analysé ne manifeste pas d'hétérogénéité particulière par rapport à sa composante caséinique,

malgré la différence des régions de collecte. Ces profils diffèrent néanmoins de ceux des caséines bovines par le nombre et le niveau de migration des bandes protéiques majeures. Globalement il est admis que par rapport aux protéines bovines, les caséines camelines, présentent une migration plus lente, du fait de leurs charges négatives nettes moins élevées (Hinz *et al.*, 2012). Ces protéines migrent en trois bandes : deux bien distinctes qui correspondraient aux caséines αS_1 et β et une troisième bande diffuse de faible intensité et de plus grande mobilité électrophorétique, qui caractériserait la caséine αS_2 , selon les travaux de Farah et Farah-Riesen (1985) ; Mohamed *et al.* (1989) et Ochirkhuyag *et al.* (1997). Les caséines bovines migrent quant à elles selon l'ordre décroissant de leur mobilité électrophorétique en : γ -CN < κ -CN < β -CN < αS_2 -CN < αS_1 -CN.

Par ailleurs, nous remarquons l'absence d'une bande protéique correspondant à la caséine κ cameline. Cette protéine est toutefois peu visualisable sur l'électrophorégramme, vu qu'elle se présente dans le lait camelin en faible teneur, comme signalé préalablement par (Larsson-Raznikiewiez et Mohamed, 1986 ; Mohamed *et al.*, 1989 ; Ochirkhuyag *et al.*, 1997).

L'analyse en PAGE-SDS (Figure 19 B) montre que les caséines des deux espèces migrent en trois bandes bien distinctes avec une plus faible mobilité et un ordre de séparation différent pour les caséines camelines. Ces observations vont dans le même sens que celles émises par (Metwalli et Al-Saleh, 2010 ; Salmen *et al.*, 2012).

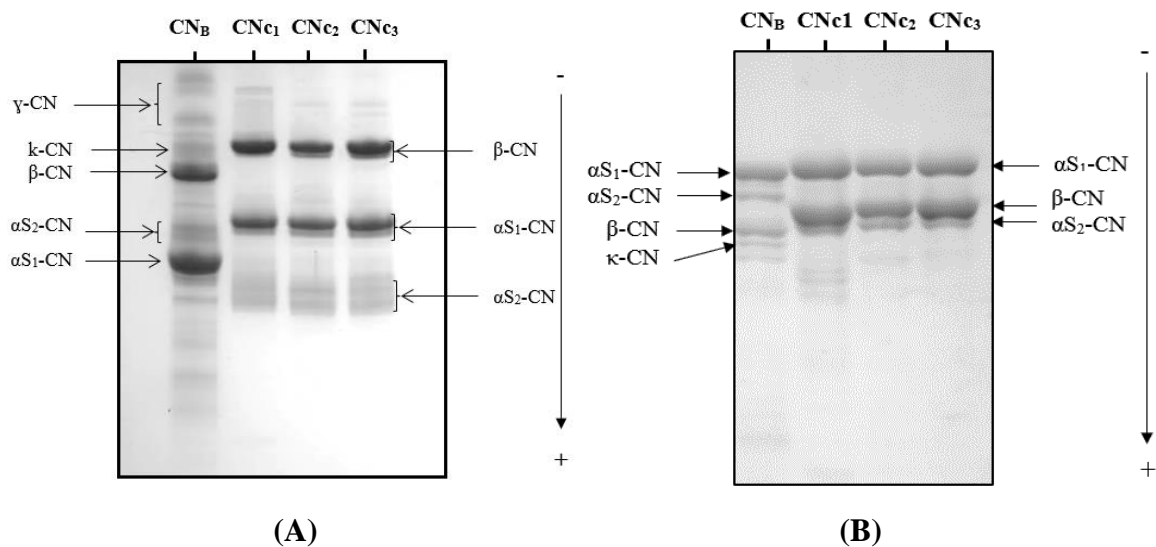


Figure 19 : Profils électrophorétiques des caséines bovines et camelines en PAGE-urée (A) (T= 13%) et en PAGE-SDS (B) (T= 15%).

CNB : caséines bovines ; **CNc1, CNc2, CNc3 :** caséines camelines du lait de dromadaire de différentes régions.

Selon Farrell *et al.* (2004), les caséines bovines migrent selon l'ordre décroissant de leur mobilité électrophorétique comme suit : αS_2 -CN < αS_1 -CN < β -CN < κ -CN < γ -CN. Alors que Larsson-Raznikiewiez et Mohamed (1986) ainsi qu'Ochirkhuyag *et al.* (1997) donnent un ordre de migration décroissant des caséines camelines comme suit : αS_1 -CN < β -CN < αS_2 -CN.

Sur ces profils électrophorétiques relativement similaires des caséines camelines, selon la provenance du lait et, où le déplacement des entités protéiques se fait uniquement selon leurs tailles (masse moléculaire et forme), αS_1 -CN se présente en une seule bande bien focalisée avec un niveau de migration légèrement inférieur à celui de αS_1 -CN bovine. Alors que les caséines β et αS_2 se présentent sous forme d'un doublet situé entre les caséines αS_2 et β bovines.

Pour la suite de ce travail et, compte tenu de l'homogénéité des échantillons de laits collectés sur le plan des caractéristiques physico-chimiques et de la nature des protéines majeures qu'ils renferment, nous avons utilisé uniquement le lait provenant de la région de Laghouat pour l'étude spécifique consacrée aux caséines αS -CN, d'autant que ce lait présente le taux protéique le plus élevé.

3.1.3. Isolement et purification des caséines αS

3.1.3.1. Résultats des protocoles de séparations chromatographiques adoptés

En nous appuyant sur les résultats obtenus par Sanogo *et al.* (1989) avec les caséines bovines, nous avons mis en œuvre et optimisé une méthode chromatographique sur colonne pour séparer les αS -CN camelines. Ces dernières sont isolées selon leurs charges ioniques sur DEAE-cellulose en basse pression et sur DEAE-sépharose, AKTA pure, en FPLC.

Après une première séparation obtenue par centrifugation suite à la dissolution des caséines totales dans un tampon d'acétate de sodium, additionné d'urée, du 2-ME et de l'EDTA, les fractions éluées sur colonne F1 et F2 (Figure 20 A), correspondant aux deux pics bien résolus obtenus, sont analysées en PAGE-urée. L'électrophorégramme obtenu (Figure 20 B) montre que la fraction F1 contient essentiellement de la β -CN et la fraction F2 les αS -CN (αS_1 -CN et αS_2 -CN).

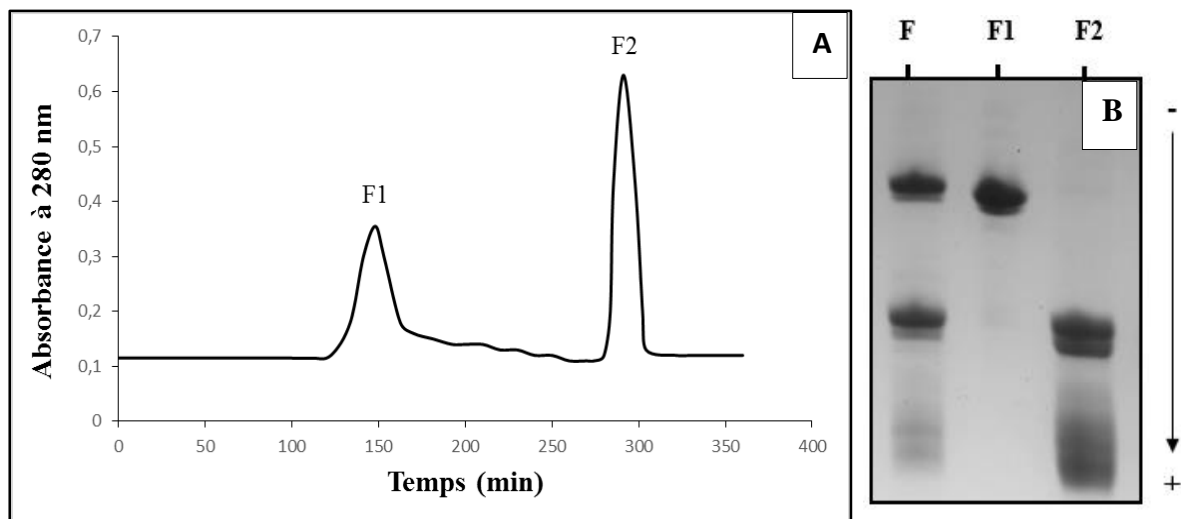


Figure 20 : Chromatogramme de séparation des αS -CN camelines par basse pression sur DEAE-Cellulose (A) et contrôle électrophorétique en PAGE-urée (T= 13%) des fractions (F1 et F2) collectées (B). F : CN totale ; F1 : β -CN ; F2 : αS -CN.

Dans ce protocole, les caséines α S sont bien séparées de la β -CN et sont obtenues avec un haut degré de pureté. La substitution du tampon imidazole, le plus souvent utilisé dans ces séparations, par le tampon acétate de sodium a abouti à un résultat très satisfaisant comparativement à ceux préalablement obtenus au même laboratoire par Si Ahmed-Zennia *et al.* (2013), en utilisant la même résine. Notons que Shuiep *et al.* (2016) ont signalé la difficulté de fractionner les caséines camelines sur DEAE-Cellulose, notamment les α S-CN sans que ces dernières ne soient abondamment contaminées par la β -CN.

Nous pouvons estimer qu'au niveau qualitatif, le résultat est probant. La méthode utilisée est avantageuse, étant donné qu'elle a permis en une seule étape d'avoir une bonne séparation entre les caséines alpha S, d'un côté et, bêta, de l'autre.

Néanmoins, elle présente l'inconvénient d'avoir un temps d'analyse relativement allongé, suite au faible débit utilisé, lui-même dépendant de la quantité limitée d'échantillon fractionné à travers la colonne.

Afin de purifier davantage les α S-CN et augmenter le rendement, les caséines sont fractionnées sur une colonne DEAE-sépharose (prête à l'emploi), en utilisant un système automatisé (AKTA pure, FPLC). La même procédure adoptée antérieurement est optimisée sur cette colonne. La séparation est effectuée en séquences répétitives. Le fractionnement a permis l'obtention de deux pics majeurs F1 et F2 (Figure 21 A), qui correspondent respectivement aux β -CN et α S-CN (Figure 21 B).

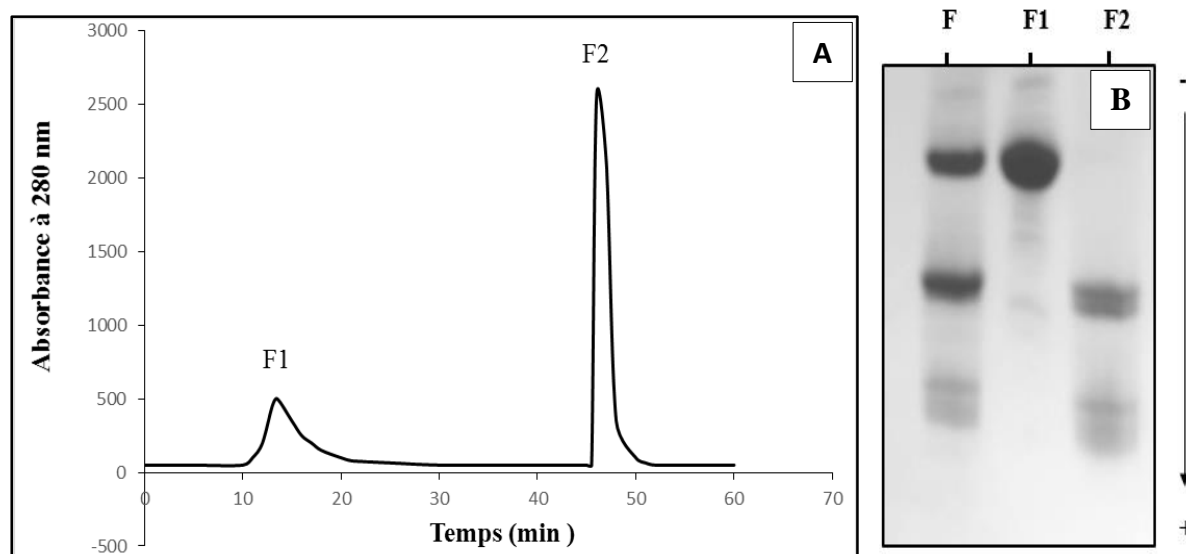


Figure 21 : Chromatogramme de séparation des α S-CN camelines par FPLC sur DEAE-sépharose (A) et contrôle électrophorétique en PAGE-urée (T=13%) des fractions (F1 et F2) collectées (B). F : CN totale ; F1 : β -CN ; F2 : α S-CN.

En comparant entre les deux procédés utilisés, nous pouvons conclure que les deux résines donnent des résultats comparables, néanmoins la chromatographie « rapide » en FPLC sur DEAE-Sépharose est avantageuse du fait qu'elle permet d'utiliser un débit plus élevé, d'où

un temps d'analyse plus réduit avec une résolution élevée, comme signalé précédemment par Barrefors *et al.* (1985) et Christensen (1989).

La chromatographie échangeuse anionique est assez utilisée pour séparer les caséines individuelles du lait de différentes espèces (Thompson, 1966 ; Sanogo *et al.*, 1989 ; Strange *et al.*, 1991). Toutefois, un nombre limité d'études a été consacré à la séparation chromatographique des caséines camelines. Certaines investigations ont utilisé d'autres supports chromatographiques pour des objectifs similaires. Ainsi, Ochirkhuyag *et al.* (1997), sur les caséines du lait de dromadaire, ont montré la possibilité de séparer les différentes caséines sur une résine QAE-sépharose, tandis que Chaoui-Kherouatou et Attia (2008) ont relevé une résolution non satisfaisante des caséines alpha S sur Mono Q HR 5/5.

3.1.3.2. Contrôle de pureté en RP-HPLC

Dans le but d'évaluer l'état de pureté des fractions alpha S séparées comme décrit plus haut, nous avons soumis cet isolat à un fractionnement en chromatographie liquide de haute performance en phase réverse (RP-HPLC) sur une colonne C8. Les conditions d'élution utilisées ont permis d'avoir deux pics P1 et P2, d'aires différentes et dont les temps de rétention respectifs sont évalués à 8,7 et 18,6 min. (Figure 22 A). Le comportement électrophorétique de ces fractions est analysé en PAGE-urée (Figure 22 B).

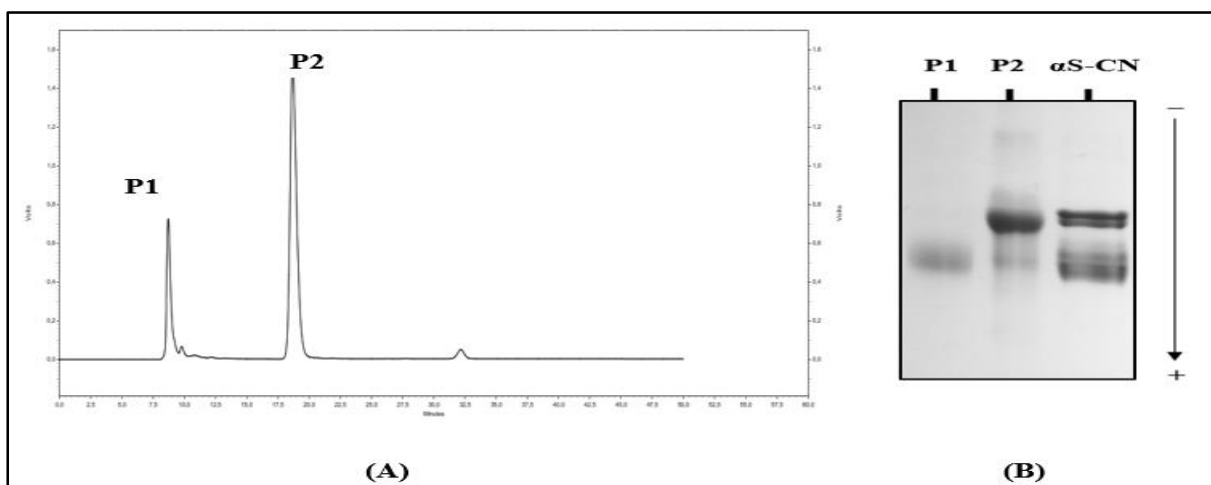


Figure 22 : Chromatogramme en RP-HPLC (A) sur C8 des α S-CN et contrôle électrophorétique en PAGE-urée (T=13%) (B) des fractions collectées. **P1 :** α S₂-CN ; **P2 :** α S₁-CN.

Elution : gradient binaire (0-50%) de solvant A (10% acétonitrile, 90% eau ultra pure et 0,1% TFA) et de solvant B (60% acétonitrile, 40% eau ultra pure et 0,1% TFA) pendant 50 min ; débit : 0,2 mL/min ; température : 38 °C ; DO : 215 nm.

En s'appuyant sur les données bibliographiques des caséines, notamment les travaux de Nagasawa *et al.*, 1971 ; Mikkelsen *et al.*, 1987 ; Rasmussen *et al.*, 1995 ; Mas *et al.*, 1999 ; Trujillo *et al.*, 2000 ; Veloso *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2009), nous pouvons estimer avec une forte probabilité que les fractions F1 et F2 correspondent respectivement aux fractions

caséiniques αS_2 et αS_1 . Ce résultat confirme par la même occasion le haut degré de pureté des caséines αS isolées par chromatographie échangeuse d'anions, puisque aucun autre pic ne figure sur le chromatogramme.

3.1.3.3. Caractérisation électrophorétique des caséines αS

Les αS -CN isolées ont été soumises à une migration électrophorétique en PAGE-urée et en PAGE-SDS où plusieurs conditions opératoires ont été testées afin d'avoir des gels discriminants, avec des bandes protéiques résolutes et bien focalisées.

Ces essais ont permis d'arriver aux diagrammes électrophorétiques (Figure 23 A), où nous pouvons noter qu'en PAGE-urée, les caséines αS migrent sous deux doublets bien distincts : l'un de moindre mobilité électrophorétique qui correspondrait à la caséine αS_1 avec les deux variants génétiques A et B décrits dans la littérature, sachant que Kappeler *et al.* (1998) avaient rapporté que αS_1 -CN cameline comporte au moins deux allèles, l'autre doublet, de moindre intensité est aussi décelable sur ce diagramme. Ces bandes ont une mobilité électrophorétique plus élevée, ce qui suggère un fort taux de phosphorylation dans leur composition. Selon Ochirkhuyag *et al.* (1997) et Kappeler *et al.* (1998), qui avaient décrit un comportement similaire, ces deux bandes protéiques pourraient correspondre aux deux variants génétiques A et B de αS_2 -CN.

Le profil électrophorétique en PAGE-SDS (Figure 23 B) montre que ces caséines se présentent sous deux bandes distinctes mais d'intensités différentes. L'une, intense et à mobilité lente, a une masse moléculaire estimée à 35,5 KDa. Cette bande correspondrait à αS_1 -CN, selon les recoupements des données de la littérature. La seconde, de faible intensité mais ayant une plus forte mobilité sur le gel, possède une MM estimée à 26 KDa. Cette bande correspondrait à αS_2 -CN.

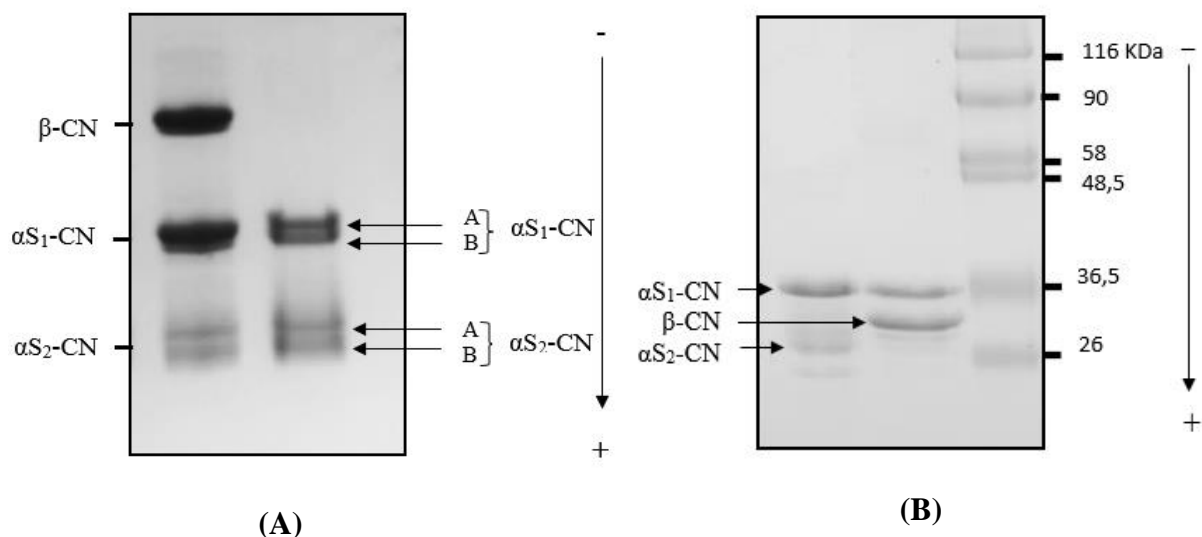


Figure 23 : Profils électrophorétiques des caséines αS cameline en PAGE-urée (T=13%) (A) et en PAGE-SDS (T=15%) (B).

αS_2 -CN : caséine alpha S_2 ; αS_1 -CN : caséine alpha S_1 ; β -CN : caséine bêta.

Globalement, nous relevons que le profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS des α S-CN est similaire à ceux rapportés par Farah et Farah-Riesen (1985) ; Larsson-Raznikiewicz et Mohamed (1986) et Ochirkhuyag *et al.* (1997). Selon le tableau VIII, nous constatons que les masses moléculaires déterminées sont assez concordantes avec celles données par ces auteurs. Comparativement aux résultats rapportés par Alim *et al.* (2005) et Si Ahmed-Zennia *et al.* (2013), relatifs au lait de dromadaire d'Algérie, il ressort une similitude par rapport à la MM de α S₁-CN et une différence relative pour α S₂-CN.

Tableau VIII : Comparaison des MM (en KDa) des caséines α S camelines déterminées par PAGE- SDS avec celles rapportées par quelques auteurs.

Auteurs	Présente étude	a	b	c	d	e
α S ₁ -CN	35,5	31	35,300	34,400	36	35,5
α S ₂ -CN	26	25	26,300	29,800	30	nd

(a) : Larsson-Raznikiewicz et Mohamed (1986) ; (b) : Ochirkhuyag *et al.* (1997) ; (c) : Alim *et al.* (2005) ; (d) : Si Ahmed-Zennia *et al.* (2013) ; (e) : Farah et Farah-Riesen (1985). nd : non déterminé.

En se basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que les caséines camelines présentent un comportement électrophorétique différent de celui de leurs homologues bovines, qui reflète leurs propriétés physico-chimiques et structurales spécifiques. Par ailleurs, nous avons pu isoler les caséines α S avec un haut degré de pureté, en mettant au point une méthode simple, reproductible, qui peut s'appliquer en basse et haute pression.

Chapitre 2 : Activités biologiques des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse

3.2.1. Sensibilité des caséines α S aux enzymes gastro-intestinales

3.2.1.1. Choix du rapport E/S

La sensibilité et le comportement des caséines α S camelines vis-à-vis l'action séparée de 3 enzymes gastro-intestinales choisies (trypsine, α -chymotrypsine et pepsine) a été examinée. Plusieurs rapports E/S ont été testés avant d'opter pour un rapport E/S =1/100 qui correspond aux conditions optimales d'activités, évaluées selon le seuil de dégradation des protéines initiales, l'apparition des fragments d'hydrolyse, le nombre et l'intensité des bandes protéiques qui apparaissent ou qui disparaissent au cours de la cinétique.

Une fois ce rapport fixé, la sensibilité aux coupures enzymatiques est appréciée en suivant les cinétiques d'hydrolyse sur un intervalle de 24 h par électrophorèse PAGE-SDS (Figure 24) et par RP-HPLC.

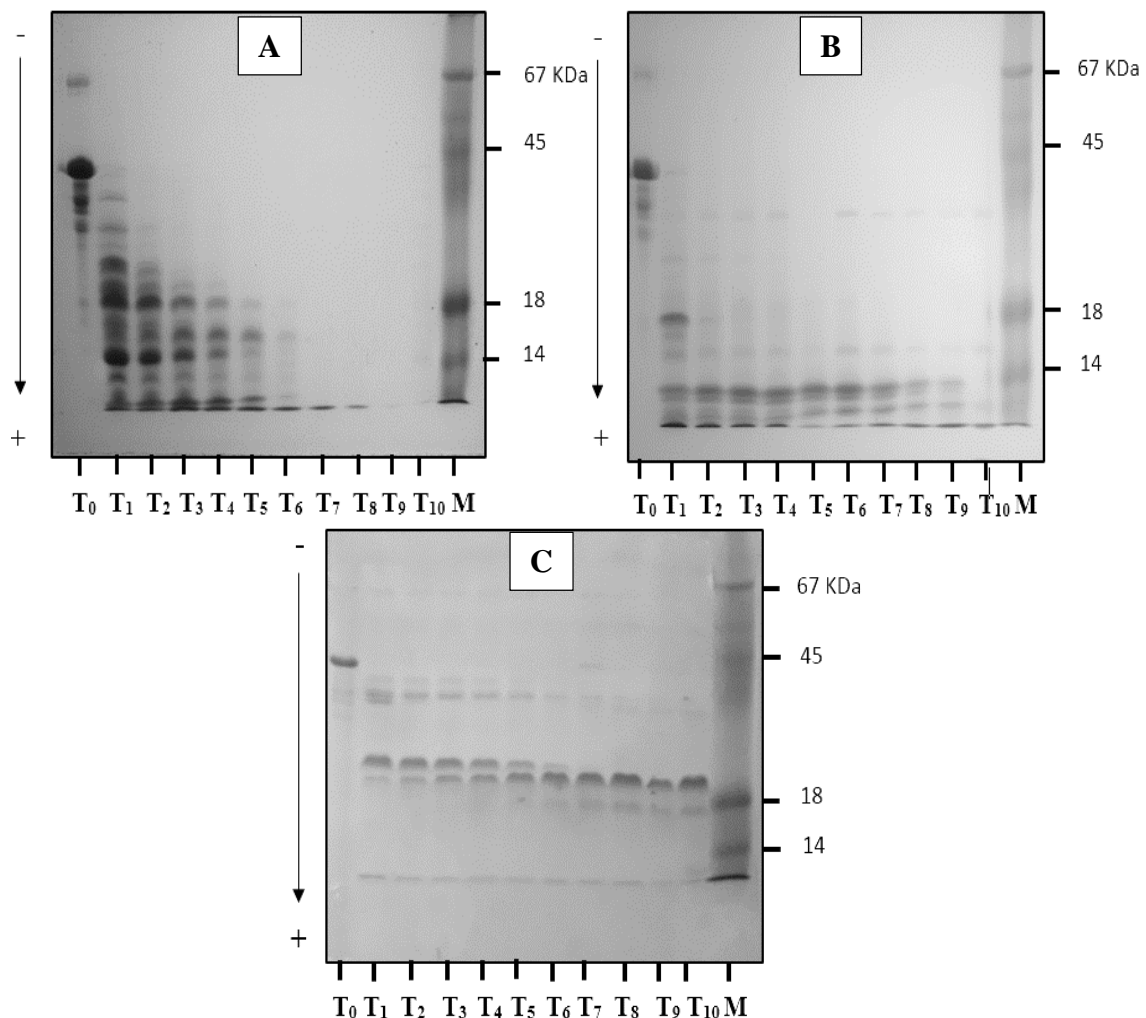


Figure 24 : Comportement en PAGE-SDS (T = 15 %) de l'action de la trypsine (A), chymotrypsine (B) et pepsine (C) sur les caséines α S camelines (E/S = 1/100). Temps d'incubation : T₀ : 0 min ; T₁ : 2,5 min ; T₂ : 5 min ; T₃ : 10 min ; T₄ : 15 min ; T₅ : 30 min ; T₆ : 1 h ; T₇ : 2 h ; T₈ : 4 h ; T₉ : 6 h ; T₁₀ : 24 h ; M : marqueur de masse moléculaire (kDa).

3.2.1.2. Action des enzymes sur les caséines α S

Sous l'action de chacune des enzymes testées, les profils électrophorétiques montrent globalement une disparition progressive des bandes correspondantes aux α S-CN camelines et l'apparition successives de bandes de migration à plus fortes mobilités électrophorétiques, mais dont l'intensité diminue au cours du temps.

Nous relevons une disparition totale des bandes principales après 5 min d'incubation avec la trypsine et la chymotrypsine. Par contre, sous l'action de la pepsine, ces bandes ne disparaissent qu'après 1h d'incubation.

En examinant ces profils de près, nous pouvons noter que la dégradation des α S-CN est plus intense avec la chymotrypsine. En effet, une bande intense de 16 KDa se forme rapidement après 2,5 min d'incubation avec cette enzyme, alors que parallèlement, plusieurs bandes bien distinctes, d'intensités différentes, sont formées avec les autres enzymes, en générant plusieurs fragments peptidiques dans les zones allant de 10 à 31 KDa (avec la trypsine) et de 22 à 39 KDa (avec la pepsine).

Cette dégradation avancée dès les premières minutes d'incubation de l'enzyme avec le substrat s'explique par la structure micellaire lâche des caséines qui présentent des sites de coupures exposés en surface (Cayot et Lorient, 1998).

L'hydrolyse par la trypsine est plus ciblée et séquentielle. Cependant son action est plus complète dans un intervalle de temps plus court. En effet, avec cette enzyme, aucune bande de migration n'est détectable après plus d'une heure d'incubation. Ce comportement trouve sa raison, selon Ahmad *et al.* (2015), dans le fait que la trypsine clive la protéine en de très petits fragments, alors que la pepsine et la chymotrypsine génèrent de larges fragments.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Salami *et al.* (2008) et El-Salam et El-Shibiny (2013) qui ont signalé que les α S-CN camelines sont plus facilement dégradables par la chymotrypsine que par la trypsine. Salami *et al.* (2008) ont mentionné que la caséine α S₁ est totalement hydrolysée par ces deux enzymes après 5 min d'incubation.

Le suivi des cinétiques d'hydrolyse des caséines α S par RP-HPLC se traduit par l'apparition de plusieurs pics (ou fragments peptidiques) sur les chromatogrammes (Figures 25 à 27). Cependant, les profils des hydrolysats chymotrypsiques présentent un plus grand nombre de peptides, comparés à ceux obtenus avec les autres enzymes. Ceci confirme bien les observations qui découlent des profils électrophorétiques de ces caséines.

Par ailleurs, ces chromatogrammes montrent aussi que l'aire des principaux pics correspondants aux fragments d'hydrolyse issus des α S-CN camelines est peu affectée par l'action des enzymes, notamment après 2 h d'hydrolyse. Cela suggère que la plupart des sites potentiels de coupures ont été clivés à ce temps d'incubation. C'est d'ailleurs pour ces raisons que des travaux, dont la méthode de Salami *et al.* (2011) que nous avons adopté, ont proposé de fixer cette limite de 2 h (à des rapports E/S=1/100) pour la mesure des activités biologiques des peptides générés par des coupures enzymatiques.

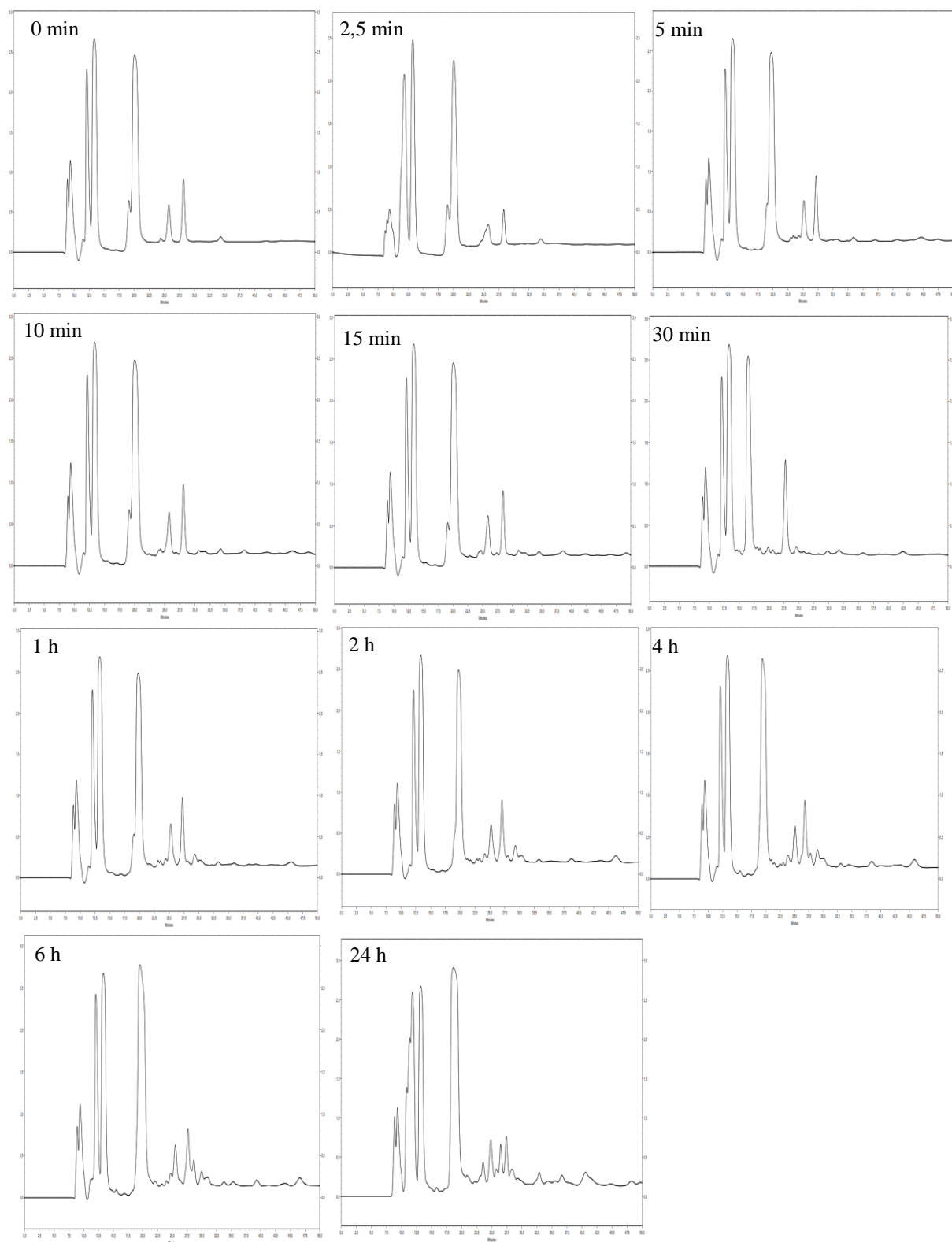


Figure 25 : Profils chromatographiques en RP-HPLC sur C8 des hydrolysats tryptiques des caséines α S camelines obtenus à différents temps d'incubation ; E/S= 1/100.

Conditions d'élution : gradient binaire (0-50%) de solvant A (10% acétonitrile, 90% eau ultra pure et 0,1% TFA) et de solvant B (60% acétonitrile, 40% eau ultra pure et 0,1% TFA) pendant 50 min ; température : 38 °C ; débit : 0,2 mL/min ; DO : 215 nm.

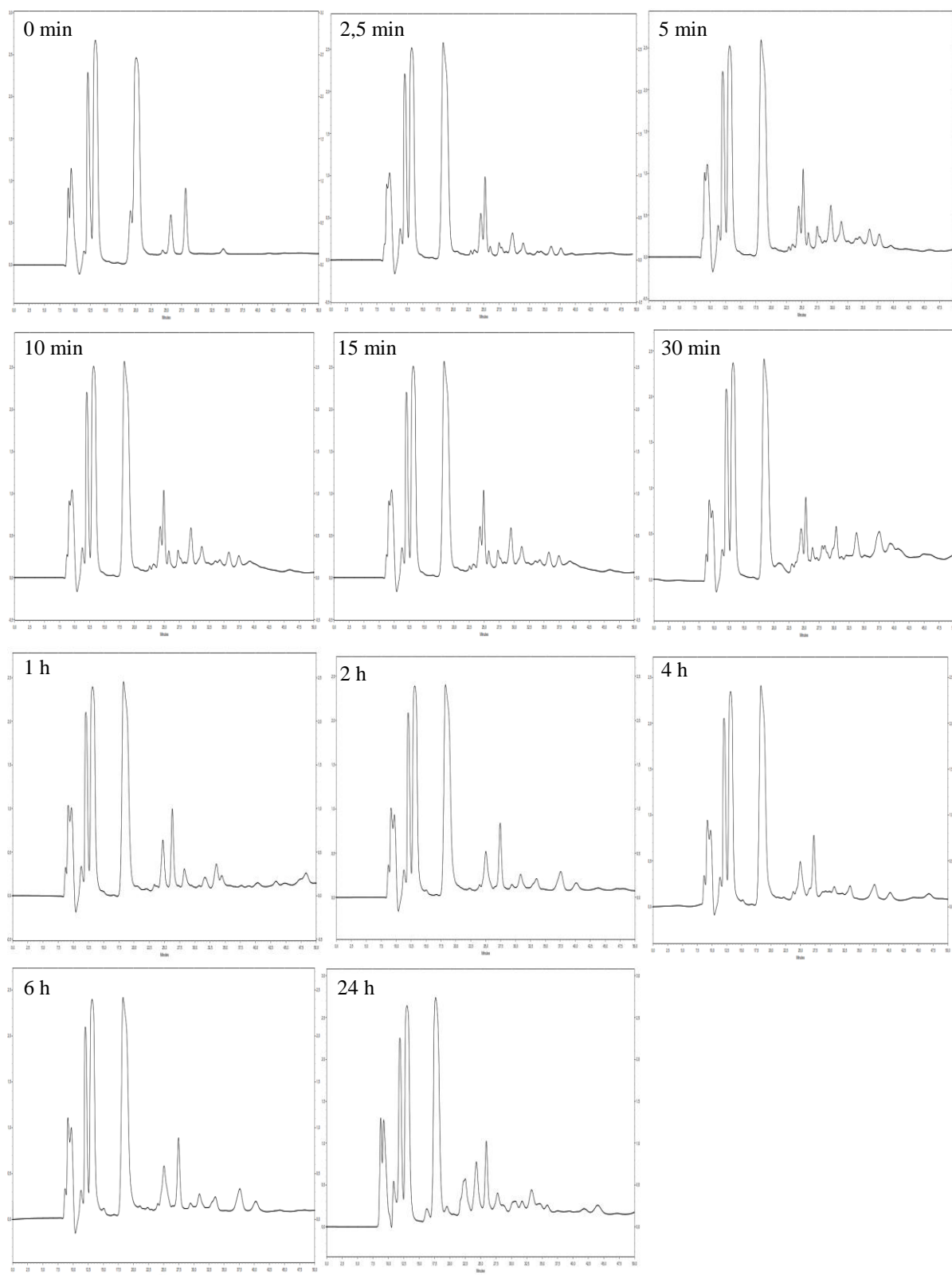


Figure 26 : Profils chromatographiques en RP-HPLC sur C8 des hydrolysats chymotrypsiques des caséines α S camelines obtenus à différents temps d'incubation. E/S= 1/100 ; conditions d'élution : idem que figure 25

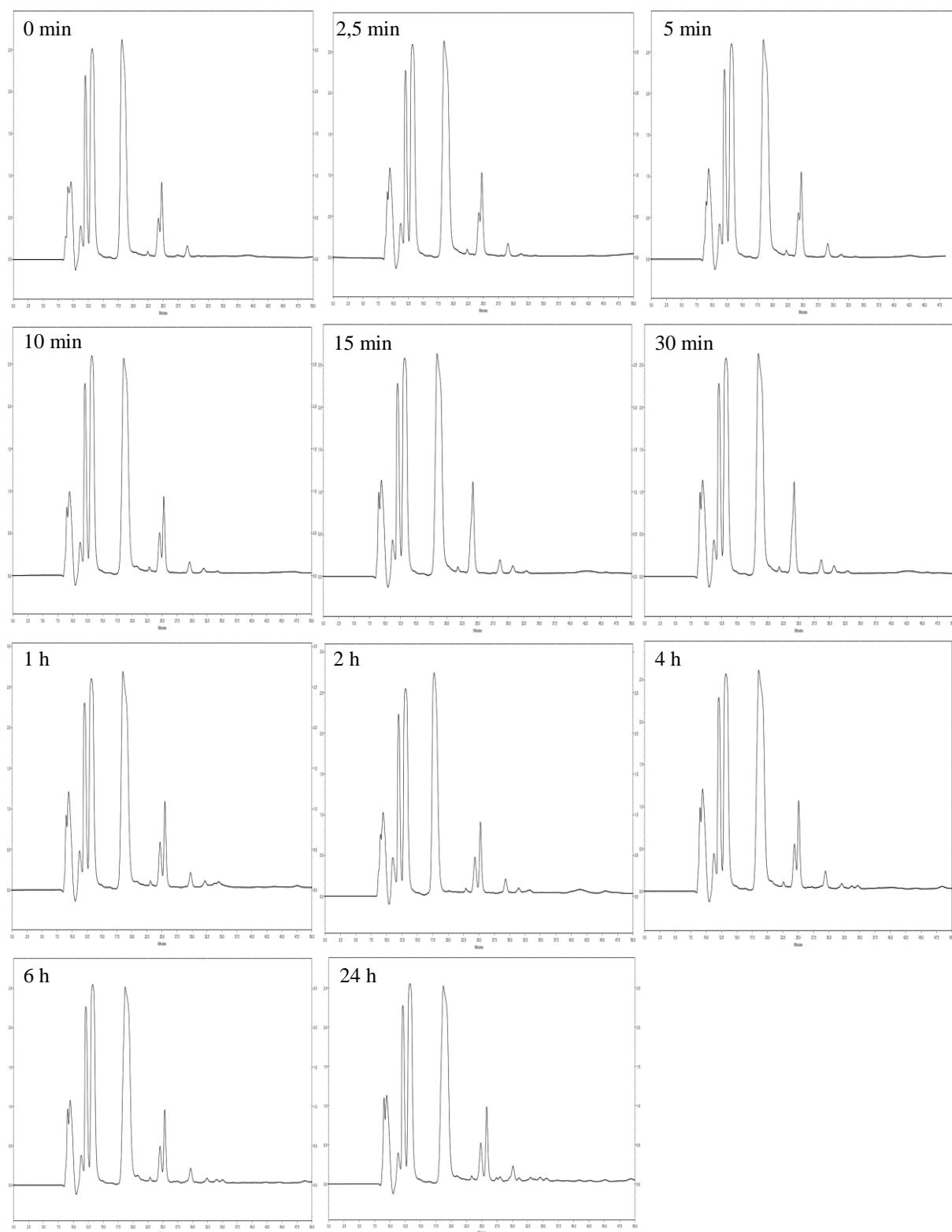


Figure 27 : Profils chromatographiques en RP-HPLC sur C8 des hydrolysats pepsiques des caséines α S camelines obtenus à différents temps d'incubation. E/S= 1/100 ; Conditions d'élution : idem que figure 25.

Il apparaît, au vu de ces résultats, que les α S-CN camelines sont plus sensibles à l'action de la chymotrypsine, qu'avec les autres enzymes, comme rapporté précédemment par Salami *et al.* (2011), Si Ahmed-Zennia *et al.* (2013) et Kumar *et al.* (2016a). Dans ces travaux, l'hypothèse émise quant à l'action de ces protéases sur les caséines camelines serait celle d'un mécanisme intermédiaire entre le « one by one » et « Zipper » où il y a une dégradation progressive des α S-CN natives en peptides intermédiaires qui sont à leur tour hydrolysés en peptides finaux.

Signalons que différents facteurs peuvent limiter l'hydrolyse des caséines, non seulement le nombre de sites potentiels de coupure, mais aussi l'accessibilité de l'enzyme à ces sites ainsi que les groupements phosphates liés aux résidus sérine et thréonine qui influencent la digestibilité des caséines (Li-*chan* et Nakai, 1989).

Toutefois, la présence de zones hydrophobes dans les chaînes polypeptidiques induit des interactions entre ces dernières qui sont à l'origine d'obstacle stérique à l'action de la protéase et renforce l'inaccessibilité de certains sites d'action (Molina *et al.*, 2007 ; Salami *et al.*, 2011).

3.2.1.3. Evaluation du degré d'hydrolyse

Nous pouvons relever, au vu des résultats de la détermination du degré d'hydrolyse (DH) des caséines α S camelines soumises à l'action de la trypsine et de la chymotrypsine (Tableau IX), que cette dernière est celle qui présente le DH le plus élevé (3,29 contre 2,08% pour la trypsine). Notons que le DH de la pepsine (résultat non présenté dans ce tableau) a été mesuré conformément à la méthode de Bellamy *et al.* (1992) utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des hydrolysats (DH=13,5 % pour un rapport E/S =3% et un temps d'incubation de 4 h).

Tableau IX : Degré d'hydrolyse des caséines α S camelines soumises à l'action des enzymes protéolytiques (trypsine et chymotrypsine).

Enzymes	Conditions d'hydrolyse	DH (%)
Trypsine	2 h, E/S : 1%	2,08 ± 0,01
Chymotrypsine	2 h, E/S : 1%	3,29 ± 0,05

Ces données expérimentales confirment que les caséines α S sont plus sensibles à l'action de la chymotrypsine qu'à celle de la trypsine. L'analyse en RP-HPLC appuie ces résultats et les chromatogrammes (Figure 28) montrent bien que l'hydrolysate chymotrypsique présente un plus grand nombre de pics générés par hydrolyse, comparé à l'hydrolysate tryptique dans les conditions adoptées.

Dans ce volet d'investigations, notons que Salami *et al.* (2008) ont signalé que le degré d'hydrolyse des caséines camelines totales par la chymotrypsine est significativement plus élevé que celui obtenu par la trypsine. De même, l'étude de Kumar *et al.* (2016a) sur l'hydrolyse enzymatique des caséines camelines par l'alcalase (ou subtilisine), l' α -chymotrypsine et la papaïne a montré que le DH le plus élevé est obtenu avec l' α -chymotrypsine.

Alors que Srinivas et Prakash (2010), qui ont mené une étude sur l'hydrolyse des α S-CN bovines par la chymotrypsine, les aminopeptidases et les carboxypeptidases ont donné des DH respectifs de 4,6 ; 0,7 et 0,4 % pour un rapport E/S=1/150 après 2 h d'incubation. Par ailleurs, Shanmugan *et al.* (2015) ont rapporté que le DH des caséines du lait de bufflonne après digestion par la trypsine et la chymotrypsine (E/S : 1/100 pendant 3 h) se situe respectivement à 7,9 et 11,2 %.

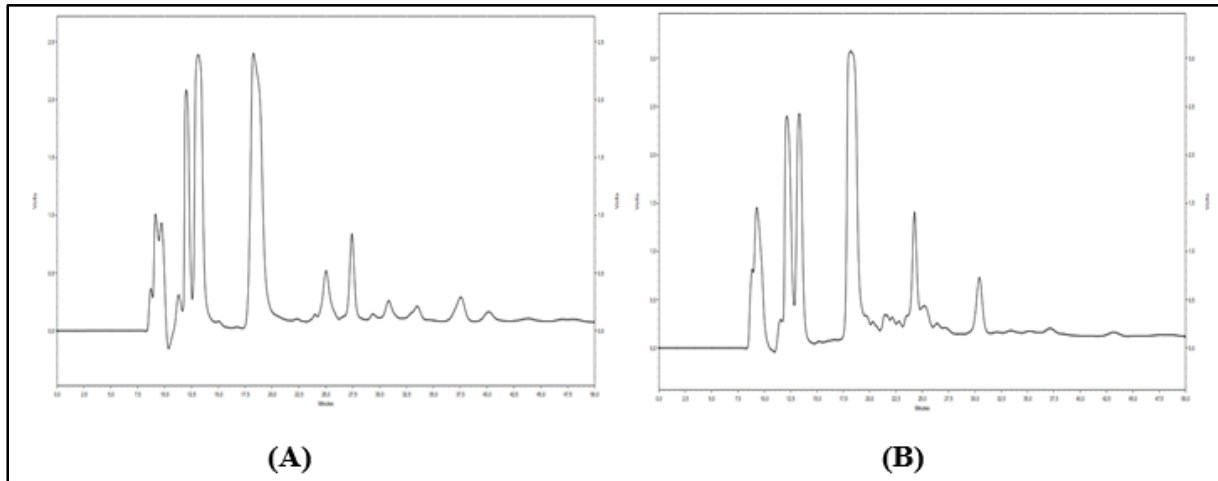


Figure 28 : Chromatogrammes en RP-HPLC sur C8 des hydrolysats trypsiques (A) et chymotrypsiques (B) des caséines α S camelines après 2 h d'incubation. E/S= 1/100 ; conditions d'élution : idem que figure 25.

Les actions combinées de plusieurs enzymes ont été aussi entreprises par différents auteurs. Ainsi, Abu-Tarboush et Ahmed (2005) ont signalé que le DH après 10 h de digestion des caséines camelines par la pepsine (E/S : 2%), suivi de la pancréatine (E/S : 4%) se situe à 31,6%, alors que l'hydrolyse par la trypsine (E/S : 2%) suivie de la chymotrypsine (E/S : 4%) a fait augmenter le DH de plus de 25%.

La différence de DH entre ces hydrolysats pourrait être attribuée à plusieurs facteurs individuels ou combinés tels que la vitesse de la réaction enzymatique, la spécificité de l'enzyme, l'affinité du substrat et l'accessibilité au site de clivage.

La durée de l'hydrolyse est un facteur important à prendre en compte. Carreira *et al.* (2003) ont noté qu'une durée d'hydrolyse qui dépasse 5 h peut favoriser la contamination microbienne des préparations protéiques. De plus, Belitz et Grosch (1999) ont rapporté qu'une hydrolyse allongée peut affecter négativement les propriétés fonctionnelles et organoleptiques des peptides, par conséquent leur utilisation dans les produits alimentaires sera limitée. En revanche, une hydrolyse limitée permet de maintenir la structure active des peptides, mais aussi leur fonctionnalité (Tsou *et al.*, 2010).

En outre, le choix de l'enzyme et le rapport E/S résulte souvent d'un compromis entre les critères d'efficacité et les critères économiques. En effet, une augmentation de la concentration en enzyme engendre souvent une augmentation de la vitesse d'hydrolyse (d'où de DH), mais entraîne en conséquence une augmentation du coût de procédé (Lahl et Braun, 1994).

C'est pour ces raisons que la production d'hydrolysats à des fins industrielles doit tenir compte de tous ces paramètres.

3.2.2. Évaluation des activités biologiques

3.2.2.1. Activité antioxydante

Afin de faire face aux problèmes créés sans cesse au niveau de l'organisme humain par le stress oxydatif qui est impliqué dans la survenue de diverses pathologies, la recherche d'antioxydants naturels, dont ceux provenant des protéines laitières, devient un axe de grande importance en santé publique. Dans ce cadre, la contribution de cette étude vise à tester l'activité antioxydante des caséines α S ainsi que leurs produits d'hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine.

Plusieurs tests antioxydants (test de piégeage des radicaux ABTS et OH, test de chélation du fer et test de blanchissement du β -carotène) ont été utilisés à cet effet. Les résultats (exprimés par les valeurs d'IC₅₀) ont été comparés à ceux obtenus sur des tests réalisés avec des antioxydants synthétiques de référence (BHT, BHA, EDTA et l'acide ascorbique) fréquemment utilisés comme additifs alimentaires.

3.2.2.1.1. Piégeage des radicaux (ABTS et hydroxyle)

Les résultats de ces activités sont consignés dans le tableau X et les principales tendances sont montrées sur la figure 29.

L'activité des α S-CN natives est relativement limitée, comparativement à celles données dans les mêmes conditions par les antioxydants synthétiques (BHT et BHA) mesurés notamment pour le test ABTS.

Par contre, les hydrolysats tryptiques et chymotryptiques possèdent quant à eux un pouvoir de piégeage des radicaux (ABTS/ hydroxyle) appréciable, particulièrement ceux issus de l'action de la chymotrypsine, où la différence d'activité constatée entre la protéine mère et cet hydrolysat dépasse 50%.

Après le fractionnement opéré par ultrafiltration, les résultats montrent une augmentation du pouvoir de piégeage de l'ABTS par les entités protéiques de masse moléculaire inférieure à 10 KDa, qui présentent l'activité la plus significative ($P < 0,001$) avec des valeurs d'IC₅₀ respectivement de $23,66 \pm 0,23$ et $44,76 \pm 0,66$ μ g/mL pour les fractions chymotryptique et tryptique.

Ces résultats sont en concordance avec ceux de Salami *et al.* (2011) et Kumar *et al.* (2016a ; 2016b) qui ont signalé que les caséines totales et la β -CN cameline exercent un effet anti-radicalaire important contre le radical ABTS, en particulier après hydrolyse par la chymotrypsine. Canabady-Rochelle *et al.* (2015) ont précisé que la capacité du piégeage des radicaux ABTS par les peptides est liée à leur capacité à donner un hydrogène.

Le test de piégeage du radical hydroxyle donne les mêmes tendances pour l'hydrolysat chymotryptique, tandis que l'action tryptique induit un effet moins marqué sur cet indice d'activité antioxydante.

Tableau X : Activité de piégeage des radicaux (ABTS et hydroxyle) des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse (moyenne \pm écart type).

Fractions	Test ABTS IC ₅₀ (μ g/mL)		Test Hydroxyle IC ₅₀ (μ g/mL)	
	HT	HC	HT	HC
α S-CN natives	95,40 \pm 0,96 ^{aA}	95,40 \pm 0,96 ^{aA}	> 1000 ^A	>1000 ^A
Hydrolysats bruts	59,88 \pm 0,00 ^{aB}	37,14 \pm 0,06 ^{bB}	948,08 \pm 2,20 ^{aB}	407,18 \pm 4,33 ^{bB}
HPM	66,99 \pm 0,79 ^{aC}	43,62 \pm 0,30 ^{bC}	1230,0 \pm 2,83 ^{aC}	494,75 \pm 14,58 ^{bC}
FPM	44,76 \pm 0,66 ^{aD}	23,66 \pm 0,23 ^{bD}	350,89 \pm 9,82 ^{aD}	93,58 \pm 3,46 ^{bD}
BHT	1,29 \pm 0,30 ^E		NT	
BHA	1,81 \pm 0,10 ^E		NT	
Acid ascorbique	NT		13,86 \pm 0,47 ^E	

Les lettres minuscules indiquent des différences significatives dans les lignes ($P < 0,05$). Les lettres majuscules indiquent des différences significatives dans les colonnes ($P < 0,05$) pour chaque analyse séparément.

BHA: Hydroxyanisole butylé ; **BHT:** Butylhydroxytoluène ; **NT:** non testé ; **FPM:** fraction peptidique de faible poids moléculaire (<10) ; **HPM:** fraction peptidique de haut poids moléculaire (>10) ; **HT:** hydrolyse trypsique ; **CH:** hydrolyse chymotrypsique.

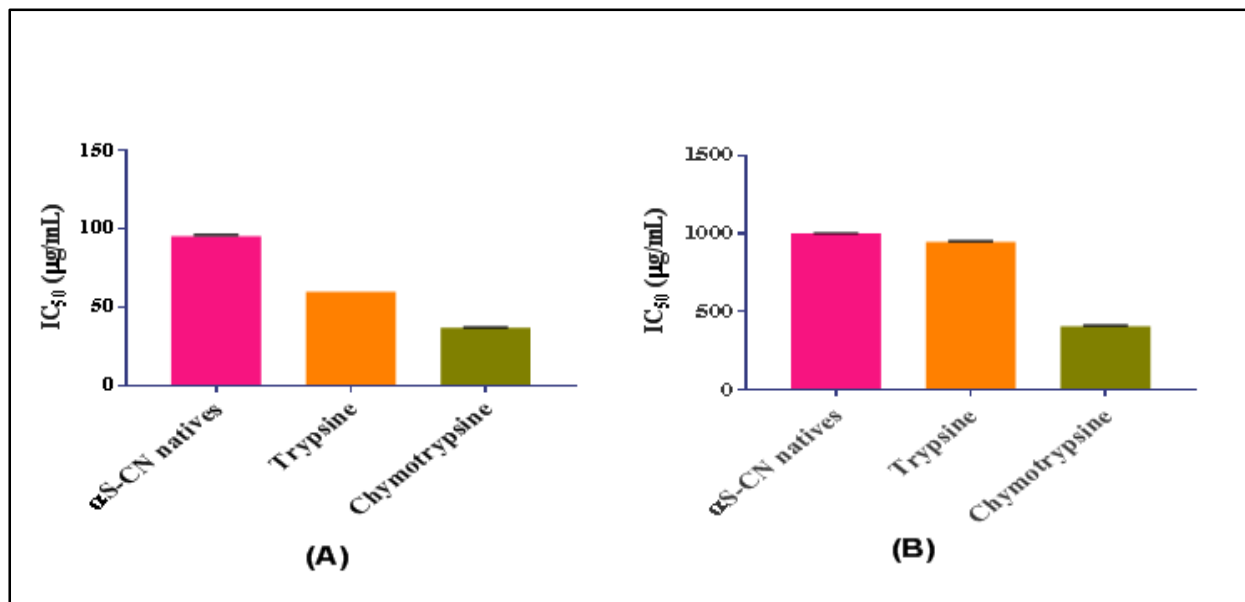


Figure 29 : Effet du traitement enzymatique (trypsine/chymotrypsine) des caséines α S sur l'activité de piégeage des radicaux libre ABTS (A) et hydroxyle (B).

Le test réalisé sur les fragments d'ultrafiltration montrent également que les peptides de faibles poids moléculaires, issus de l'hydrolyse par la chymotrypsine, présentent une capacité de piégeage significativement plus importante ($P < 0,001$) ($IC_{50} = 93,58 \pm 3,46 \mu\text{g/mL}$), que ceux, de même taille, issus de l'action de la trypsine ($IC_{50} = 350,89 \pm 9,82 \mu\text{g/mL}$), ainsi que les peptides de tailles plus élevées ($MM > 10 \text{ kDa}$) ($IC_{50} = 494,75 \pm 14,58 \mu\text{g/mL}$).

Suetsuna *et al.* (2000) ont signalé que les peptides générés durant la digestion gastro-intestinale ou la fermentation des caséines bovines ont une forte activité de piégeage des différents radicaux (DPPH, hydroxyle et de l'ion superoxyde). Parmi ces protéines, Rival *et al.* (2001) ont indiqué que les αS -caséines bovines sont celles qui présentent la meilleure capacité de piégeage des radicaux libres.

Cet effet anti-radicalaire intense des fragments peptidiques pourrait s'expliquer par une accessibilité réactionnelle des résidus cystéine, mais aussi des acides aminés aromatiques vis-à-vis des radicaux libres, alors qu'ils seraient relativement enfouis dans la protéine initiale. Elias *et al.* (2008) ont signalé que ces composés ont une action antioxydante importante suite à leurs interactions avec les radicaux libres.

3.2.2.1.2. Chélation du fer et oxydation de l'acide linoléique

Les résultats obtenus avec ces tests (Tableau XI, dont les principales tendances sont représentées sur la Figure 30 A) montrent que les hydrolysats des caséines αS sont dotés d'une capacité chélatante importante des ions ferreux, qui est relativement plus prononcée dans le cas des fragments issus de l'hydrolyse chymotrypsique, particulièrement ceux qui sont contenus dans la fraction de faible poids moléculaire.

Sachant que les caséines αS sont les protéines micellaires camelines les plus phosphorylées (6 résidus pour $\alpha\text{S}_1\text{-CN}$ et 9 dans le cas de $\alpha\text{S}_2\text{-CN}$), cette activité chélatante marquée serait due à ce potentiel particulier, qui devient plus réactif quand les peptides phosphorylés sont libérés dans le milieu. Dans ce sens, des études menées par Kitts (2005) et Kim *et al.* (2007b) ont montré que les caseinophosphopeptides (CPPs) ont de bonnes propriétés chélatantes, comparativement à d'autres peptides non phosphorylés.

Quant à l'oxydation de l'acide linoléique et au vu des résultats obtenus (Tableau XI ; Figure 30 B), cette dernière a été considérablement inhibée par les $\alpha\text{S-CN}$ et leurs fractions d'hydrolyse. Le traitement enzymatique augmente leur pouvoir inhibiteur et la chymotrypsine est également l'enzyme qui génère les peptides les plus efficaces ($IC_{50} = 2,9 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$). Mais, contrairement aux trois tests antioxydants précédents, aucune différence significative n'est enregistrée après le fractionnement des hydrolysats bruts par ultrafiltration. Ce qui signifie que cette activité inhibitrice n'est pas étroitement liée à la taille du peptide.

Dans une étude similaire, Pownall *et al.* (2010) ont indiqué que l'activité inhibitrice de l'oxydation de l'acide linoléique est corrélée avec la présence d'acides aminés hydrophobes (Val, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp) dans les fragments d'hydrolyse, qui ont plus d'affinité pour la phase lipidique où ils interagissent et piègent les radicaux libres. Ceci est de nature à expliquer les effets protecteurs intéressants obtenus avec l'hydrolysats chymotrypsique.

Tableau XI : Activité chélatante de l'ion ferreux et oxydation lipidique des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse (moyenne \pm écart type).

Fractions	Chélation de l'ion ferreux IC ₅₀ (μ g/mL)		Blanchissement du β -carotène IC ₅₀ (μ g/mL)	
	HT	HC	HT	HC
α S-CN native	237,5 \pm 0,72 ^{aA}	237,5 \pm 0,72 ^{aA}	8,81 \pm 0,00 ^{aA}	8,81 \pm 0,00 ^{aA}
Hydrolysats bruts	36,74 \pm 1,33 ^{aB}	28,77 \pm 0,39 ^{bB}	3,49 \pm 0,19 ^{aB}	3,04 \pm 0,06 ^{bB}
HPM	29,01 \pm 0,19 ^{aC}	30,60 \pm 1,37 ^{aB}	3,17 \pm 0,33 ^{aB}	3,13 \pm 0,02 ^{aB}
FPM	33,80 \pm 0,59 ^{aD}	20,33 \pm 1,83 ^{bD}	3,66 \pm 0,59 ^{aB}	2,90 \pm 0,20 ^{bB}
BHT	NT		1,05 \pm 0,01 ^E	
BHA	NT		0,90 \pm 0,02 ^E	
EDTA	8,80 \pm 0,47 ^E		NT	

Les lettres minuscules indiquent des différences significatives dans les lignes ($P < 0,05$), Les lettres majuscules indiquent des différences significatives dans les colonnes ($P < 0,05$) pour chaque analyse séparément, **BHA**: Hydroxyanisole butylé ; **BHT**: Butylhydroxytoluène ; **EDTA** : Éthylènediaminetétraacétique ; **NT**: non testé ; **FPM**: fraction peptidique de faible poids moléculaire (<10) ; **HPM**: fraction peptidique de haut poids moléculaire (>10) ; **HT**: hydrolyse trypsique ; **HC**: hydrolyse chymotrypsique.

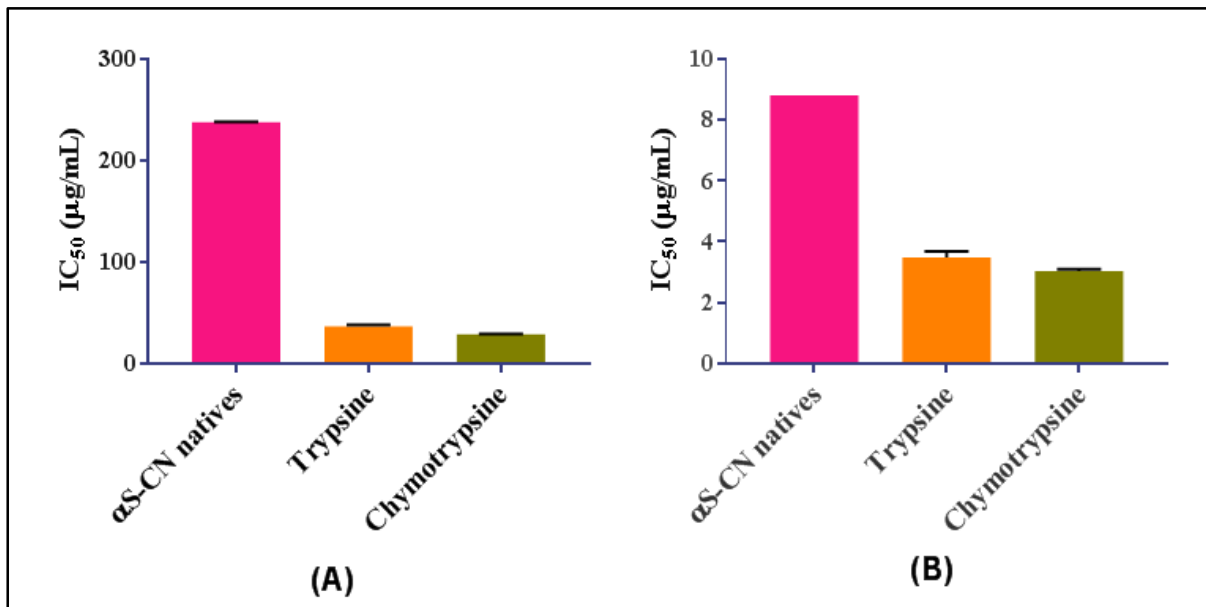


Figure 30 : Effet du traitement enzymatique (trypsine/chymotrypsine) des caséines α S sur leur activité chélatante du fer (A) et sur l'oxydation de l'acide linoléique (B).

Signalons que Hartmann et Meisel (2007), en réalisant une étude sur les caséines bovines, ont mentionné que la plupart des peptides inhibiteurs de la peroxydation lipidique sont dérivés des caséines α S.

Globalement, ces résultats sur l'activité antioxydante des caséines α S du lait camelin ainsi que de leurs fragments d'hydrolyse sont en accord avec ceux rapportés par Salami *et al.* (2011), Kumar *et al.* (2013), Kumar *et al.* (2016a ; 2016b) et Assem *et al.* (2018), qui soulignent que la chymotrypsine génère des peptides présentant une meilleure activité antioxydante à partir des caséines du lait.

Plusieurs études ont montré la capacité des protéines du lait et leurs peptides à inhiber l'oxydation des lipides dans les produits alimentaires (Cervato *et al.*, 1999 ; Diaz *et al.*, 2003 ; Diaz et Decker, 2004 ; Hartmann et Meisel, 2007 ; Homayouni-Tabrizi *et al.*, 2016). Cette activité est attribuée non seulement à la capacité de piégeage des radicaux libres, mais aussi à la chélation des métaux par les résidus phosphorylés (Diaz et Decker, 2004).

Les résultats de la présente étude permettent d'estimer que les caséines α S camelines encryptent dans leurs séquences des peptides dotés d'une activité antioxydante. De plus, l'hydrolyse enzymatique ménagée par les enzymes pancréatiques, notamment la chymotrypsine s'avère un bon moyen pour améliorer cette activité en libérant des peptides ayant un meilleur pouvoir antioxydant.

Il est établi que l'hydrolyse enzymatique perturbe d'une part, la structure tertiaire des caséines et libère, d'autres parts, des fragments peptidiques qui auront une plus grande réactivité du fait d'une meilleure accessibilité à certains acides aminés dont le rôle régulateur de l'activité antioxydante a été montré (Rival *et al.*, 2001).

La chymotrypsine est une endopeptidase à sérine qui clive les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyr, Trp, Phe) ou apolaire (notamment Met) engage sa fonction acide. Ce qui génère la production de peptides hydrophobes, du côté N terminal (Pihlanto, 2006). Notons que la pepsine possède la même spécificité d'action, à la différence, qu'elle hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique engage sa fonction amine, d'où l'obtention de peptides hydrophobes, du côté C terminal (Pelmont, 1989 ; Pihlanto, 2006). Par contre, la trypsine, qui est aussi une endopeptidase à sérine, elle clive en position C-terminale des acides aminés (Arg et Lys) générant ainsi des peptides hydrophiles (Antal *et al.*, 2001).

Ainsi, il est permis de déduire de ces mécanismes que la présence et la teneur en ces résidus d'acides aminés concernés dans ces coupures enzymatiques, est un indicateur appréciable de l'importance ou pas de cette propriété antioxydante des peptides présents dans le milieu, comme l'ont fait observer (Li *et al.*, 2011). Quand le processus a lieu *in vivo*, les peptides libérés, seront encore clivés par d'autres enzymes digestives (peptidases), ce qui facilitera encore plus l'accessibilité et la réactivité des acides aminés qui interagissent pour freiner la réaction d'oxydation.

Le tri moléculaire qui a été opéré par ultrafiltration entre les peptides a montré que les fractions de petites tailles (<10 KDa) sont celles qui ont donné significativement les activités

les plus élevées. Ceci va dans le même sens que les conclusions formulées par certains auteurs (Jeon *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2007b) qui ont estimé que les propriétés antioxydantes des peptides sont fortement influencées par la masse moléculaire.

Ainsi, Moslehishad *et al.* (2013) ; Kumar *et al.* (2016a) et Tagliazucchi *et al.* (2016) ont souligné que les peptides dérivés des caséines, qui ont les propriétés antioxydantes les plus efficaces, ont des tailles moléculaires comprises entre 5 et 10 KDa. Par contre, d'autres auteurs ont mentionné que les peptides de taille moléculaire inférieure à 3 KDa présentent une activité antioxydante appréciable (El-Hatmi *et al.*, 2016 ; Rahimi *et al.*, 2016).

En faisant la compilation des études menées sur ce sujet, nous pouvons relever que les peptides antioxydants du lait sont généralement courts (<11 acides aminés) et contiennent des résidus hydrophobes. Leurs propriétés antioxydantes sont attribuées à différents facteurs, comme la structure, la taille, la composition en acides aminés et l'arrangement de ces derniers dans la séquence. Ces propriétés sont due aussi aux conditions expérimentales liées à la purification de la protéine et à la réaction hydrolytique (pH, force ionique, type d'enzyme, degré d'hydrolyse, nature du substrat et concentration du peptide) (Pihlanto, 2006 ; Sarmadi et Ismail, 2010 ; Zou *et al.*, 2016).

Ibrahim *et al.* (2018) ont souligné en outre que la présence de certaines séquences ou motifs (notamment Glu-Try, Asn-Pro et Pro-Try) contribuent à l'activité antioxydante de peptide.

Comme cette activité, provenant des peptides issus des caséines α S du lait camelin n'est pas abordée jusque-là dans les références bibliographiques consultées, cette étude, qui s'est proposé de l'évaluer, a permis de constater que c'est en fait l'expression combinée de plusieurs mécanismes : piégeage des radicaux libres, chélation des métaux de transition et inhibition de la peroxydation lipidique.

Il nous semble opportun dans des investigations ultérieures d'élucider la part de chacun d'eux dans l'inhibition de la réaction d'oxydation, tout en utilisant le couplage HPLC-spectroscopie de masse notamment pour identifier les peptides à forte activité antioxydante, ce qui donnera un meilleur aperçu sur les possibilités de production de ces peptides et leurs utilisation dans des produits alimentaires fonctionnels.

3.2.2.2. Activités inhibitrices d'enzymes

3.2.2.2.1. Activité inhibitrice de la tyrosinase

Les résultats de l'évaluation de l'activité de la tyrosinase en présence des caséines α S ou de leurs fragments d'hydrolyse sont représentés sur la figure 31. Par rapport à l'acide Kojique, qui est le standard utilisé dans ces conditions pour ses capacités d'inhibition élevées (de l'ordre de 70%, à 200 μ g/mL), l'activité inhibitrice initiale des α S-CN, estimée à 25%, est doublée pour l'hydrolysats à faible poids moléculaire issu de l'action de la chymotrypsine. Paradoxalement, c'est l'hydrolysats brut de cette même enzyme qui a l'activité inhibitrice la plus élevée (estimée à 51% à la concentration de 200 μ g/mL). Les hydrolysats trypsiques quant à eux ont développé une activité inhibitrice moins prononcée (30% au max pour les hydrolysats à faible poids moléculaire).

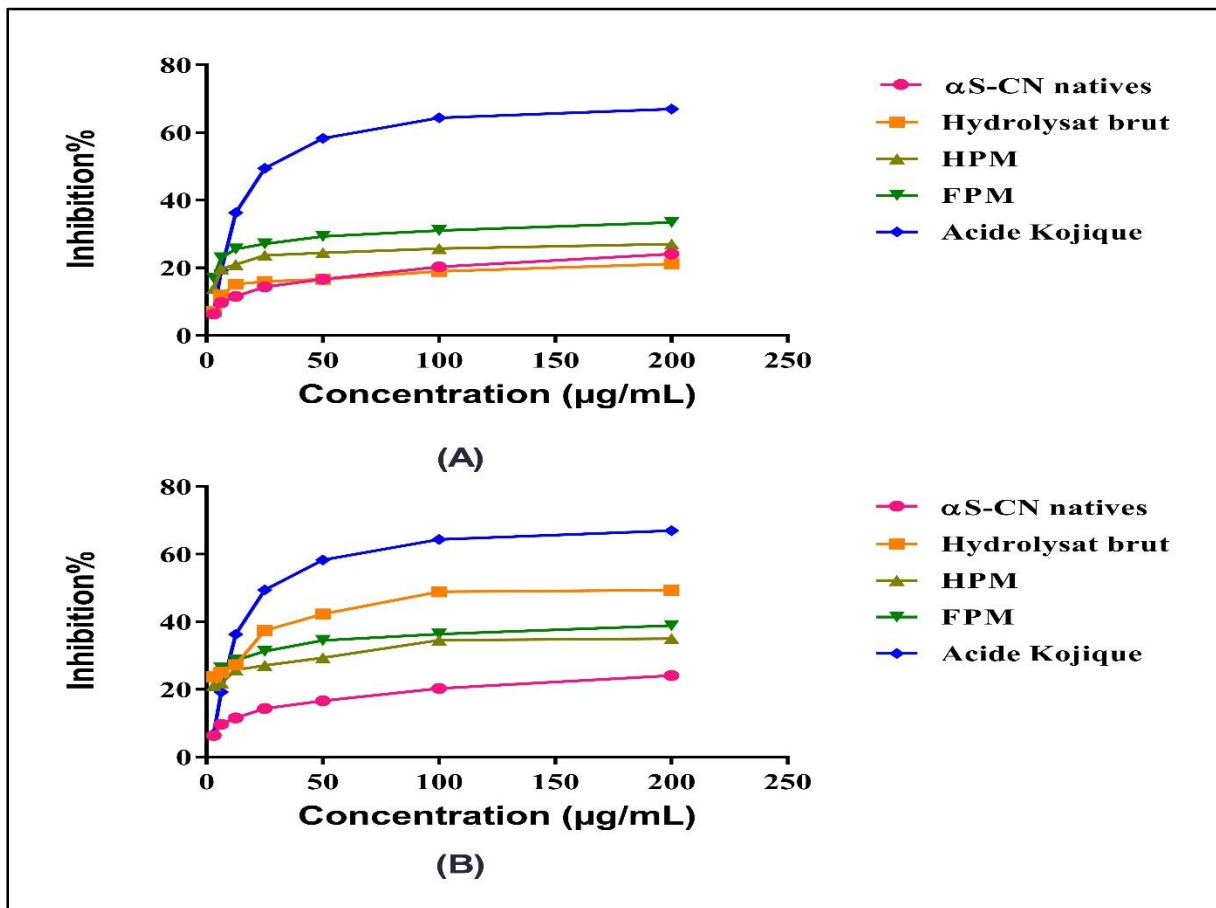


Figure 31 : Activité inhibitrice de la tyrosinase des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse trypsique (A) et chymotrypsique (B) à différentes concentrations.

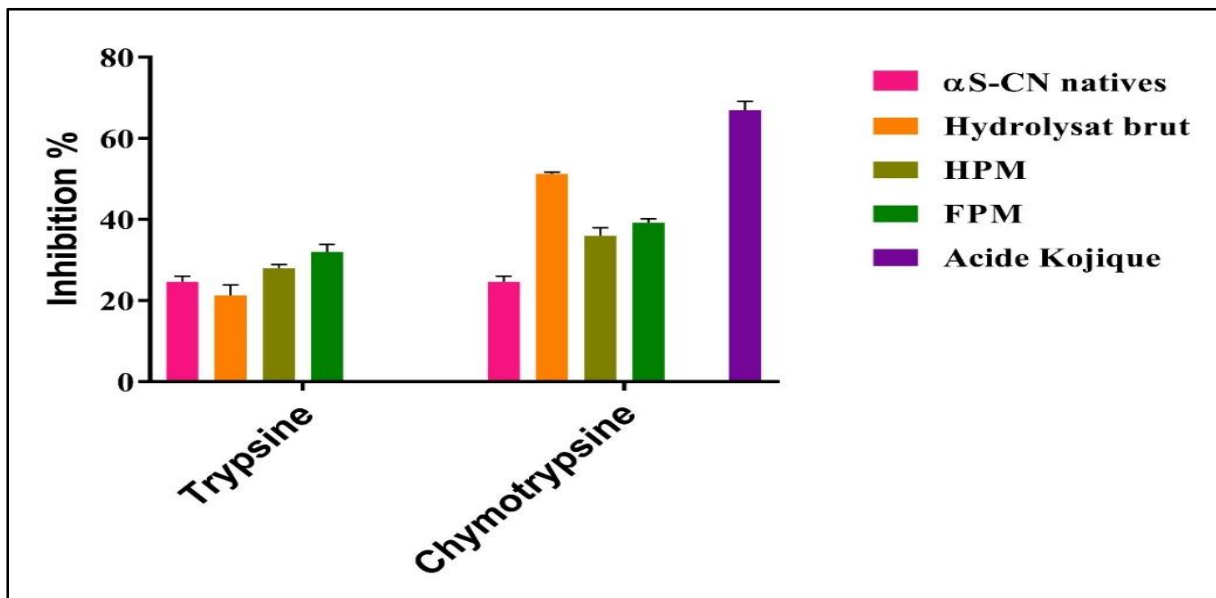


Figure 32 : Activité inhibitrice de la tyrosinase des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse à 200 μ g/mL. **FPM** : fraction peptidique de faible poids moléculaire (<10) ; **HPM** : fraction peptidique de haut poids moléculaire (>10).

Le fait que l'hydrolysats brut, qui est un mélange de petits et de grands fragments, a donné l'activité inhibitrice la plus intense peut suggérer qu'en dehors de l'effet synergique très probable, le mécanisme d'action par lequel l'enzyme est inhibée serait relativement indépendant de la taille, mais plutôt de la nature des peptides présents dans le milieu réactionnel (présence ou pas de certains acides aminés polaires, apolaires, Cys, Pro ...etc), à leur disposition spatiale ...etc) et à leur teneur (Figure 32).

Cette hypothèse semble contredire les conclusions de Schurink *et al.* (2007) qui ont estimé que la taille du peptide, au même titre que son hydrophobicité et sa conformation déterminent son efficacité inhibitrice. Ces auteurs ont souligné par ailleurs que la présence des résidus Pro, Gly, Leu et Phe et des combinaisons de résidus Arg et/ou Phe avec Val, Ala et/ou Leu, au sein de la séquence peptidique, leur confère une bonne activité.

Kahn (1985), en étudiant l'effet des acides aminés individuels sur l'activité inhibitrice, a constaté que le résidu Cys est le meilleur inhibiteur de la tyrosinase.

Différentes protéines et peptides du blé (Okot-kotber, 2001), du miel (Ates et Cokmus, 2001), de la soie (Kato *et al.*, 1998) et du lait (Tomita *et al.*, 1993 ; Nakajima *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2006) ont été signalés pour leur effet inhibiteur de la tyrosinase. Ces dernières peuvent affecter l'activité de cette enzyme de deux façons : soit en réagissant avec les O-quinones produits, soit en chélatant le cuivre essentiel à la fonctionnalité du site actif de la tyrosinase.

Concernant les protéines du lait camelin, aucune étude n'a été entreprise sur ce volet qui puisse nous servir de référence. Par contre, il a été montré que la κ -caséine et la β -lactoglobuline bovines supprimaient la mélanogenèse dans les mélanocytes humaines en culture par inhibition de l'activité tyrosinasiq (Nakajima *et al.*, 1996 ; 1997). D'autres fractions issues des protéines laitières ont été signalées pour leurs activités inhibitrices marquées sur la tyrosinase telles l'hydrolysats de la Lactoferrine (Tomita, 1993 ; 1995) et les peptides issus du lactosérum du kéfir (Chen *et al.*, 2006).

Il est intéressant de remarquer que les hydrolysats chymotrypsiques des caséines α S camelines à faible MM (<10 KDa), sont doués d'activités antioxydantes et inhibitrices de la tyrosinase. Cela pourrait se justifier par la capacité chélatante de ces peptides vis-à-vis de l'ion cuivrique. Ce qui suggère une relation entre l'effet antioxydant et l'effet inhibiteur. Ces observations sont en accord avec celles de Masuda *et al.* (2005) qui ont signalé que certains inhibiteurs de la tyrosinase avaient une forte activité antioxydante, suggérant par là qu'un antioxydant fort peut aussi avoir une forte activité anti-tyrosinase.

3.2.2.2. Activité inhibitrice de l'uréase

En prenant le dérivé soufré de l'urée ou thiocarbamide (thiourée) comme standard pour cette évaluation, les résultats présentés (Figure 33) montrent une inhibition de l'activité de l'uréase par les caséines α S-CN natives ainsi que par leurs hydrolysats, avec un effet qui fluctue entre 20 et 40%.

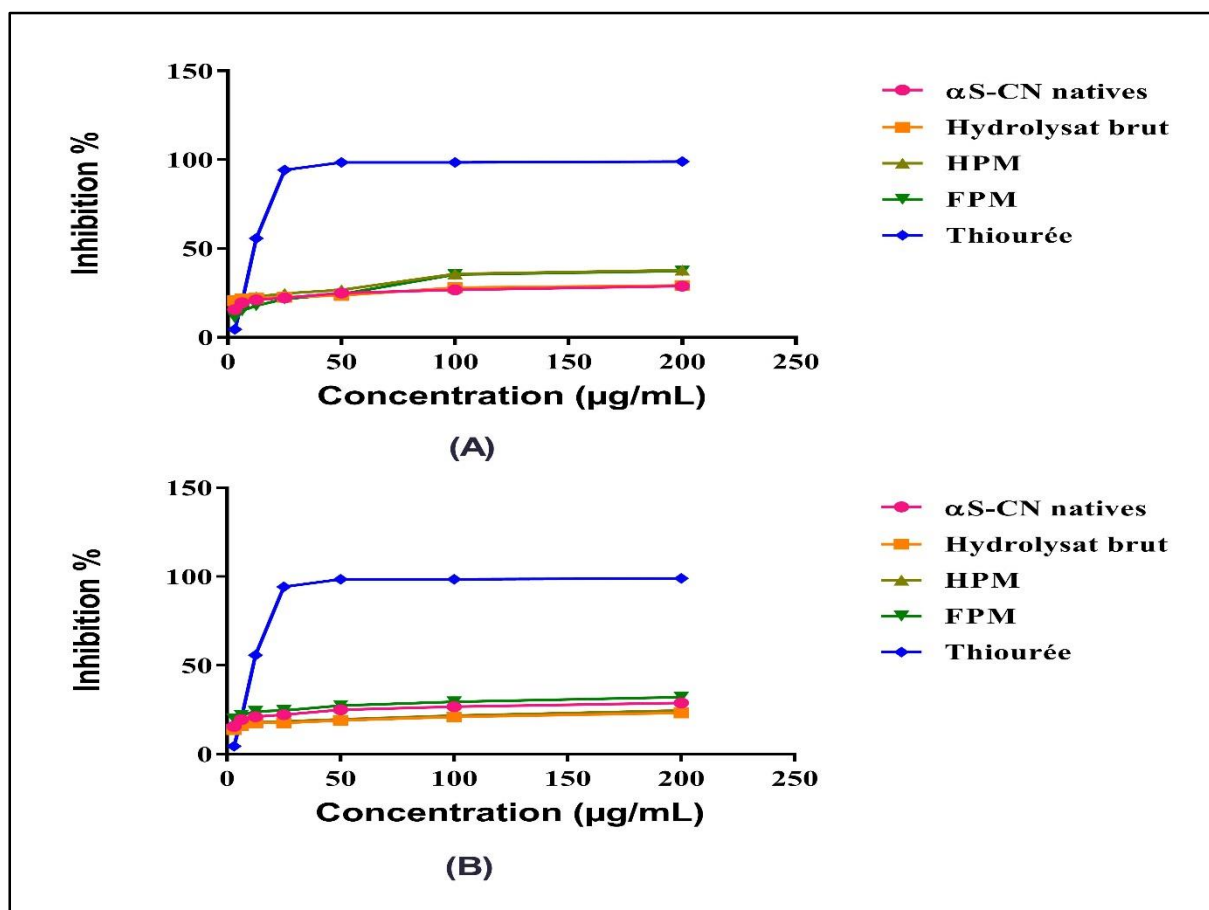


Figure 33 : Activité inhibitrice de l'uréase des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse trypsique (A) et chymotrypsique (B) à différentes concentrations.

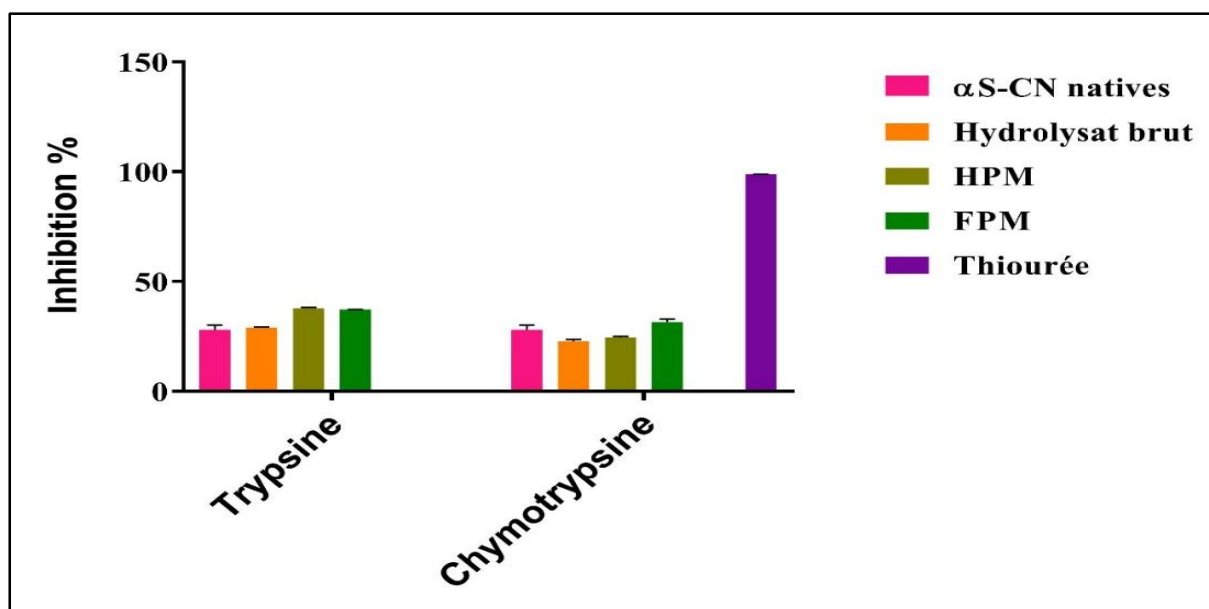


Figure 34 : Activité inhibitrice de l'uréase des caséines α S et de leurs fractions d'hydrolyse à 200 μ g/mL. **FPM** : fraction peptidique de faible poids moléculaire (<10) ; **HPM** : fraction peptidique de haut poids moléculaire (>10).

Après le fractionnement selon la taille moléculaire, ce sont les hydrolysats tryptiques qui ont donné l'effet inhibiteur le plus élevé (notamment à la concentration de 200 µg/mL), alors qu'il n'y a pas de différences significatives qui ont été enregistrées entre le comportement des deux fractions (FPM e HPM) de cette enzyme (Figure 34).

Plusieurs auteurs (Krajewska, 2009 ; Kosikowska et Berlicki, 2011 ; Kafarski et Talma, 2018) ont signalé que la présence des groupements hydroxyle, imidazole, amide ou phosphate, joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité uréasique.

La nature des acides aminés présents dans le squelette peptidique est aussi importante. Ainsi, Kobashi *et al.* (1975) ont rapporté que les acides aminés tels : Phe, Ala, Ser, Gly, His, Thr et Arg participent à la formation de puissants inhibiteurs.

Houimel *et al.* (1999) ont rapporté qu'une étude menée sur l'uréase produite par la bactérie *Helicobacter pylori* a montré que les résidus apolaires d'un hexapeptide, se lient, par des interactions hydrophobes, avec cette enzyme et provoquent son inhibition.

Par ailleurs, en 2012, Upadhyay a rapporté que les peptides peuvent inhiber l'activité uréasique grâce à leur propriété chélatante d'ions nickel. Cependant, il apparaît que d'autres travaux ultérieurs doivent être menés pour élucider les mécanismes d'actions et pouvoir attribuer l'effet mesuré, aux composants protéiques ou aux groupements prosthétiques et autres constituants qui peuvent être présents dans le milieu. Ceci d'autant plus, qu'en dehors des inhibiteurs isolés à partir des plantes (Kosikowska et Berlicki, 2011 ; Modolo *et al.*, 2015), très peu de travaux ont été consacrés jusque-là à cet effet chez les protéines et peptides issus du lait. Encore plus sur le lait de dromadaire, malgré les us et coutumes qui signalent que par traditions, le lait camelin est couramment utilisé par les bédouins pour soigner les ulcères d'estomac.

3.2.2.3. Activité antibactérienne

Partant du fait que plusieurs peptides antibactériens ont été libérés à partir des α S-CN bovines et ovines, nous nous sommes proposés d'explorer ce volet, afin de voir si cette fraction protéique dans le lait camelin pouvait avoir une telle caractéristique recherchée dans la préservation des produits alimentaires et la lutte contre le développement des germes pathogènes. Pour cela, nous avons ciblé préférentiellement la pepsine pour réaliser l'hydrolyse enzymatique, compte tenu du fait que la plupart des travaux ont préalablement signalé son efficacité dans ce sens. De plus, Adoui (2014) ainsi que Theolier *et al.* (2013) ont signalé l'absence d'activité antibactérienne avec les peptides issus de l'hydrolyse tryptique et chymotrypsique aux niveaux des caséines camelines totales et des protéines du lactosérum.

Les α S-CN et leurs fractions d'hydrolyse pepsique soumises à une séparation par ultrafiltration ont été testées aux concentrations (0,5 et 1 mg/mL) selon la méthode de microdilution vis-à-vis de deux souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* CNRZ 3 et *Listeria innocua* ATCC 33090) et une souche à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922).

Les résultats (Figure 35) montrent que les caséines α S camelines natives ainsi que leurs fragments peptidiques inhibent, aux deux concentrations testées, la croissance bactérienne des

trois souches considérées. L'inhibition de la croissance des souches testées montrent que cet effet augmente, d'une part, avec la concentration et, d'autre part, après hydrolyse enzymatique.

Le tableau XII présente le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne des trois souches sous l'effet des différentes fractions utilisées à raison de 1 mg/mL après 24 h d'incubation. Il ressort que les fractions dont la MM est inférieure à 1KDa présentent l'effet inhibiteur significativement ($P < 0,001$) le plus important (58,23 pour *L. innocua*, 36,4 pour *S. aureus* et 28,57 % pour *E. coli* ATCC suivi des fractions ayant une MM comprise entre 1 et 10 KDa (51,98 pour *L. innocua*, 35,58 pour *S. aureus* et 25,33% pour *E. coli*). Ces résultats révèlent aussi que la souche bactérienne *Listeria innocua* est la plus sensible à l'effet des α S-CN et de leurs dérivés peptidiques, suivie de *Staphylococcus aureus*, puis d'*Escherichia coli*.

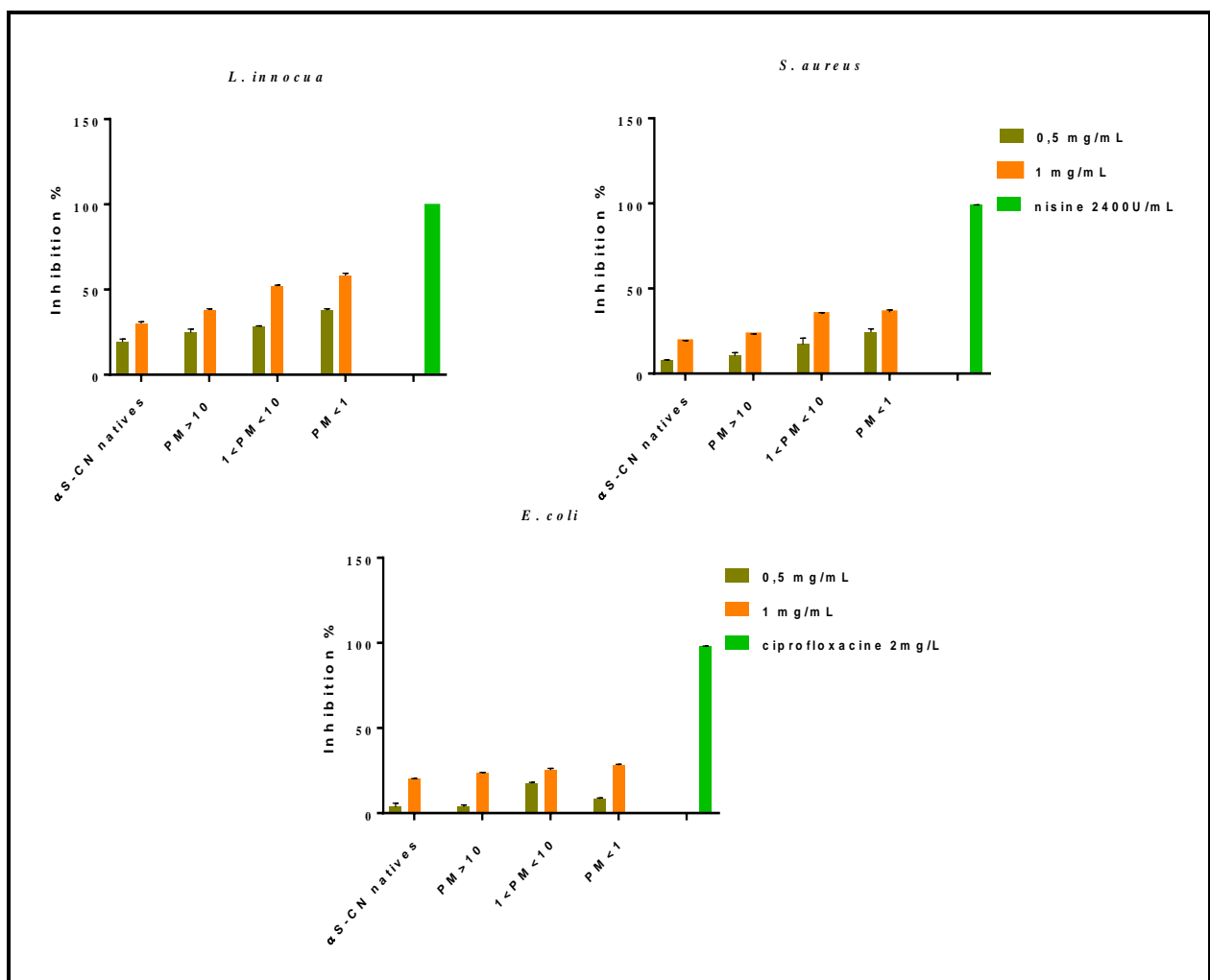


Figure 35 : Pourcentage d'inhibition de *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Staphylococcus aureus* (CNRZ 3) et d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), en présence des caséines α S camelines et de leurs fractions d'hydrolyse par la pepsine après 24 h d'incubation, à 0,5 et 1 mg/mL.

Tableau XII : Pourcentage d'inhibition d'*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (CNRZ 3) et *Listeria innocua* (ATCC 33090) par les caséines α S camelines et leurs fractions d'hydrolyse par la pepsine à 1mg/ mL après 24 h d'incubation.

	α S-CN natives	PM> 10	1<PM<10	PM< 1
<i>E. coli</i>	20,2 \pm 0,1 ^{aA}	23,52 \pm 0,42 ^{aA}	25,33 \pm 1 ^{bA}	28,57 \pm 0,71 ^{bA}
<i>S. aureus</i>	19,06 \pm 0,32 ^{aB}	23,52 \pm 0,36 ^{bB}	35,58 \pm 0,87 ^{cB}	36,4 \pm 1,44 ^{cB}
<i>L. innocua</i>	30 \pm 1,06 ^{aC}	37,95 \pm 0,76 ^{bC}	51,98 \pm 0,61 ^{cC}	58,23 \pm 1,37 ^{dC}

Les lettres minuscules indiquent des différences significatives dans les lignes ($P < 0,05$). Les lettres majuscules indiquent des différences significatives dans les colonnes ($P < 0,05$).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Silva et Malcata (2005) et Jrad *et al.* (2015) qui ont mentionné que les peptides antibactériens dérivés des caséines ont une masse moléculaire comprise entre 0,4 et 6 KDa. Le PM semble être un facteur important dans l'expression de cette activité. Néanmoins, Tavano (2013) a précisé que la composition des fractions peptidiques est un facteur non négligeable dans cette propriété d'inhibition, suggérant que certains acides aminés hydrophobes favorisent les effets bactériostatiques.

De Castro et Sato (2015) ont rapporté que les peptides dont la séquence est riche en Gly et Leu exercent un pouvoir antibactérien puissant du fait de leur hydrophobicité. Aussi, la présence des résidus Arg dans la séquence joue un rôle important, car ils augmentent l'interaction du peptide avec la membrane de la cellule bactérienne, en raison de son caractère cationique.

Il est établi que les peptides antibactériens peuvent exercer leur effet sur les bactéries par différents mécanismes selon leur composition en acides aminés, leurs caractéristiques physico-chimiques et leur diversité structurale (Benkerroum, 2010 ; Park et Hahm, 2005). La plupart de ces peptides sont composés de moins de 50 acides aminés, dont la majorité sont des résidus hydrophobes et chargés positivement, ce qui leur permet d'acquérir des plis tridimensionnels amphipathiques qui peuvent interagir avec les membranes bactériennes (Hancock et Sahl, 2006 ; Sousa *et al.*, 2009 ; Tang *et al.*, 2015).

Cependant, l'interaction de ces peptides avec les membranes bactériennes dépend non seulement du peptide, mais aussi des composants lipidiques de la membrane (Epanand et Vogge, 1999 ; Vogel *et al.*, 2002). Un autre mécanisme de l'activité antimicrobienne de ces peptides est attribué à leur capacité de traverser la membrane bactérienne pour interagir avec une cible à l'intérieur de la cellule (Bahar et Ren, 2013 ; Kamali Alamdari et Ehsani, 2017).

Notons que la nature et la complexité de la membrane bactérienne des germes à Gram négatif fait que ces derniers soient relativement moins sensibles à l'action inhibitrice des fractions protéiques (Lopez-Exposito *et al.*, 2006). Ce comportement a été vérifié par nos essais avec la souche d'*Escherichia coli*, dont le comportement est comparé à *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*.

Partant de là, nous pouvons retenir des références bibliographiques que l'hydrolyse enzymatique des caséines α S bovines et ovines génère différents peptides antibactériens dont la plupart ont été identifiés. C'est le cas notamment des caséidines obtenus par digestion des caséines α S₁ bovines par la chymosine. Ces peptides exhibent une activité antibactérienne, *in vitro*, contre certaines bactéries (Gram positif) telles *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (Zucht *et al.*, 1995 ; Lahav *et al.*, 1971 ; Benkerroum, 2010).

L'isracidine est un autre peptide antibactérien produit à partir de α S₁-CN bovine par la chymosine. Celui-ci serait actif, *in vitro*, contre certaines bactéries (Gram positif et Gram négatif) à des concentrations se situant entre 0,1 et 1 mg/mL (Hill *et al.*, 1974 ; Lahov et Regelson, 1996 ; Kamali Alamdari et Ehsani, 2017). D'autres peptides obtenus de la caséine α S₂ bovine et ovine par digestion pepsique ont donné une activité antibactérienne appréciable contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Recio et Visser, 1999 ; Lopez-Exposito *et al.*, 2006).

Concernant les protéines issues du lait de dromadaire, Jrad *et al.* (2015) ont rapporté que les caséines camelines inhibent *in vitro* la croissance bactérienne des souches de *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus nosoco*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avant et après hydrolyse par les enzymes gastro-intestinales, avec une meilleure activité après hydrolyse.

Kumar *et al.* (2016a) ont évalué l'activité antibactérienne des caséines camelines totales sous l'action de différentes enzymes (papaine, chymotrypsine et alcalase). Ces auteurs ont rapporté que la meilleure activité a été enregistrée avec l'hydrolysate issu de l'alcalase vis-à-vis des souches à Gram positif et à Gram négatif. Ces auteurs ont observé que l'hydrolysate brut est plus efficace, comparativement aux fractions dérivées, ce qui pourrait être dû à l'effet synergétique des différents peptides dans le mélange.

Il ressort de cette investigation, qu'en plus des entités protéiques du lait camelin qui ont des activités antimicrobiennes établies et récapitulées plus haut dans la partie synthèse bibliographique. Les caséines α S dans leur globalité ou leurs fragments peptidiques issus de l'hydrolyse de ces protéines par la pepsine (particulièrement les peptides de MM <1KDa), possèdent la capacité de réduire considérablement le développement des germes de contamination, parmi eux les bactéries pathogènes telles *Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*, avec respectivement des inhibitions évaluées à 36,4 et 58,2 %, à la dose de 1mg/mL.

Ce résultat est fort encourageant dans la perspective de rechercher des produits naturels à utiliser dans la bio-préservation des produits alimentaires aux fins de lutter contre leurs détériorations nuisibles et garantir la sécurité sanitaire des aliments. Néanmoins, d'autres études complémentaires sont nécessaires pour élargir, d'une part, l'éventail des micro-organismes à tester et procéder, d'autres parts, à l'identification précise des entités inhibitrices en utilisant des techniques de séparations de hautes performances (HPLC ou électrophorèse capillaire, HPCE) couplées à la spectroscopie de masse (LC-MS/ CE-MS) ou à la résonance magnétique nucléaire (LC-NMR).



Conclusion

Conclusion générale

Les connaissances établies sur le lait de vache, considéré comme le lait de référence, sur les laits d'espèces rustiques comme l'ovin, le caprin et le camelin, implantées dans des régions du monde où le couvert végétal et les ressources hydriques sont relativement déficientes, ont souvent donné lieu à des particularités structurales et fonctionnelles qui rehaussent leur intérêt.

Ainsi, il en est de la fraction protéique du lait de dromadaire, qui se singularise par des aptitudes technologiques limitées mais aussi par l'existence de nombreuses entités dont les rôles n'ont pas encore été établis.

Partant des allégations santé et des "vertus thérapeutiques" traditionnellement attribuées au lait camelin, en plus de son rôle nutritionnel important qui suscite un besoin sans cesse croissant auprès des populations vivants dans les régions arides et semi-arides de notre pays, nous avons mené la présente étude afin de détecter des entités protéiques douées d'activités biologiques, en ciblant particulièrement les caséines α S de ce lait, pour lesquelles les connaissances scientifiques établies sont limitées, car relativement peu explorées.

La première partie de ce travail a été consacrée à la séparation des caséines camelines totales des protéines du sérum. Ces caséines ont été isolées par précipitation acide à pH = 4,3 puis caractérisées par électrophorèse dans différentes conditions (PAGE-SDS et PAGE-urée). Les profils obtenus ont confirmé la présence de protéines homologues à celles du lait bovin (α S-caséine et β -caséine) à l'exception de la κ -caséine qui n'est pas détectée dans les laits camelins étudiés en raison de sa faible teneur. Ces profils ont montré aussi une différence de comportement électrophorétique des caséines camelines par rapport à leurs homologues bovin, ce qui suppose des modifications d'ordre structurales (substitution d'acides aminés, modifications translationnelles, organisation spatiale...etc), qui sont susceptibles d'induire un changement de comportement physico-chimique et même de fonctionnalité.

L'isolement et la purification des caséines α S ont été réalisés par chromatographie échangeuse d'anions en basse et en haute pression. Pour cela, une méthode de séparation a été mise au point et a permis de dissocier de façon nette et en seule étape, la caséine β des caséines α S. La pureté de ces dernières a été confirmée par analyse électrophorétique (PAGE-urée et PAGE-SDS) et par chromatographie en RP-HPLC sur une C8. Mieux, la combinaison des résultats de ces deux techniques plaide en faveur de la correspondance des deux pics du chromatogramme selon l'ordre d'élution, respectivement à α S₂-CN et α S₁-CN.

Les tests de sensibilité des caséines α S purifiées vis-à-vis de l'action de quelques enzymes gastro-intestinales ont montré que ces protéines sont plus sensibles à l'action de la chymotrypsine, suivis respectivement par la trypsine et la pepsine. Les deux premières ont une action complète après 2 h d'incubation pour un E/S = 1/100 et les chromatogrammes de leurs hydrolysats en RP-HPLC illustrent cette cinétique où l'aire des pics restent pratiquement inchangés après cette limite. Comparativement, La chymotrypsine est l'enzyme qui a présenté le degré d'hydrolyse (DH) le plus élevé (3,29 contre 2,08% pour la trypsine).

L'étude consacrée à la recherche de l'activité antioxydante a montré que le piégeage des radicaux libres (ABTS et hydroxyle) par les caséines α S est relativement limité, comparativement aux antioxydants synthétiques (BHT, BHA, l'acide ascorbique). Après hydrolyse enzymatique, le pouvoir de piégeage devient intense, particulièrement pour l'hydrolysate chymotrypsique, où la différence d'activité constatée entre cet hydrolysate et la protéine mère dépasse 50%.

Après le fractionnement opéré par ultrafiltration, les résultats ont donné une augmentation du pouvoir de piégeage de l'ABTS par les entités protéiques de masse moléculaire inférieure à 10 KDa, qui présentent l'activité la plus significative ($P < 0,001$) avec des valeurs d'IC₅₀ respectivement de $23,66 \pm 0,23$ et $44,76 \pm 0,66$ $\mu\text{g/mL}$ pour les fractions chymotrypsique et trypsique.

Le test de piégeage du radical hydroxyle, réalisé sur les fragments d'ultrafiltration, montre également que les peptides de faibles poids moléculaires, issus de l'hydrolyse par la chymotrypsine, présentent une capacité de piégeage significativement plus importante ($P < 0,001$) (IC₅₀ = $93,58 \pm 3,46$ $\mu\text{g/mL}$), que ceux, de même taille, issus de l'action de la trypsine (IC₅₀ = $350,89 \pm 9,82$ $\mu\text{g/mL}$).

Concernant la chélation du fer, les essais effectués ont permis d'arriver à la conclusion que les hydrolysats des caséines α S sont dotés d'une capacité chélatante importante des ions ferreux, qui est relativement plus prononcée dans le cas des fragments issus de l'hydrolyse chymotrypsique, particulièrement ceux qui sont contenus dans la fraction de faible poids moléculaire (IC₅₀ = $20,33 \pm 1,83$ $\mu\text{g/mL}$) comparativement à ceux, de même taille, issus de l'action de la trypsine (IC₅₀ = $33,80 \pm 0,59$ $\mu\text{g/mL}$).

Quant à l'oxydation de l'acide linoléique, cette dernière a été considérablement inhibée par les α S-CN et leurs fractions d'hydrolyse. Le traitement enzymatique a augmenté leur pouvoir inhibiteur et la chymotrypsine est également l'enzyme qui génère les peptides les plus efficaces, particulièrement ceux qui sont contenus dans la fraction de faible poids moléculaire (IC₅₀ = $2,90 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$) comparativement à ceux, de même taille, issus de l'action de la trypsine (IC₅₀ = $3,66 \pm 0,59$ $\mu\text{g/mL}$).

Ainsi, pour les différents tests antioxydants utilisés, il est permis de retenir que l'hydrolyse améliore considérablement l'activité antioxydante des caséines α S, notamment celle effectuée par la chymotrypsine. De même, les fragments peptidiques contenus dans l'hydrolysate de faible poids moléculaire expriment souvent l'activité la plus marquée.

L'évaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase a été explorée. L'activité inhibitrice initiale des α S-CN, estimée à 25%, a été doublée pour l'hydrolysate à faible poids moléculaire issu de l'action de la chymotrypsine. Néanmoins, c'est l'hydrolysate brut de cette même enzyme qui a donné l'activité inhibitrice la plus élevée (estimée à 51% à la concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$).

L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'uréase a été mesurée. Dans ces essais, les caséines α S natives ainsi que leurs hydrolysats exercent un effet inhibiteur sur cette enzyme qui fluctue entre 20 et 40%. Après fractionnement par ultrafiltration, ce sont les fragments

peptidiques issus de l'action de la trypsine qui ont donné l'effet inhibiteur le plus élevé (de l'ordre de 37%).

Enfin, l'activité antibactérienne des fractions protéiques étudiées, mise en évidence selon la méthode de microdilution, a été testée aux concentrations (0,5 et 1 mg/mL) contre deux souches à Gram positif (*Listeria innocua* ATCC 33090 et *Staphylococcus aureus* CNRZ 3) et une souche à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922.

Les deux concentrations testées ont donné un effet inhibiteur sur les souches. La fraction peptidique de petite taille (<1 KDa) a donné l'effet le plus marqué contre l'ensemble des souches testées. Les pourcentages d'inhibition après 24 h d'incubation à 1mg/mL ont été de : $58,98 \pm 1,37$; $36,4 \pm 1,44$ et $28,57 \pm 0,71\%$, respectivement pour *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

Au vu des résultats obtenus avec les différents tests des activités biologiques, on peut conclure que l'hydrolyse enzymatique par les protéases gastro-intestinales est une approche appropriée à la production des peptides bioactifs à partir des α S-CN camelines. L'activité biologique des peptides et leur efficacité dépendent de la nature et de la taille de ces derniers, eux même sont liés étroitement aux choix de l'enzyme et des conditions d'hydrolyse. L'utilisation d'un système d'ultrafiltration post-hydrolyse semble être une technique intéressante pour l'enrichissement des peptides avec une gamme de poids moléculaires spécifiques.

Cette investigation montre que les α S-CN camelines sont une source de peptides multifonctionnels où la production et la valorisation de ces molécules pourraient donner lieu à l'incorporation de nouveaux produits à usage alimentaire et même pharmaceutique. Néanmoins, pour arriver à cette fin, d'autres investigations complémentaires sont nécessaires, notamment en :

- purifiant et séparant individuelle des caséines α S₁ et α S₂ ;
- procédant à l'identification des peptides impliqués dans les activités les plus intenses, notamment celles générés par l'hydrolyse chymotrypsique ;
- établissant la relation structure/ fonction et en élucidant leurs mécanismes d'action ;
- élargissant le spectre d'action des fractions testées sur une gamme plus étendue de micro-organismes et à des concentrations variées ;
- utilisant des essais combinés de plusieurs enzymes utilisées simultanément ;
- enfin, mener des études *in vivo* et examiner la biodisponibilité de ces peptides au niveau intestinal.



***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

- **Abdalla E. B., Ashmawy A. E. H. A., Farouk M. H., Salama O. A. E. R., Khalil F. A. & Seioudy A. F. (2015).** Milk production potential in Maghrebi she-camels. *Small Ruminant Research*, 123(1), 129-135.
- **Abu-Tarboush H. M. & Ahmed S. B. (2005).** Characterization of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of camel casein and protein isolates of Al-Ban (*Moringa peregrina*) and Karkade (*Hibiscus sabderiffa*) Seeds. *Journal of Saudi Society of Agricultural Sciences*, 4, 61-82.
- **Adams C. M. (2013).** Patient report: autism spectrum disorder treated with camel milk. *Global Advances in Health and Medicine*, 2(6), 78-80.
- **Adler-Nissen J. (1979).** Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- **Adoui F. (2014).** Peptides antimicrobiens : préparation à partir de protéines laitières. Thèse de Doctorat en Sciences (option : sciences alimentaires), Université Constantine 1, Algérie.
- **Adugna M., Asresie A. & Adigrat E. (2014).** Physicochemical and microbiological quality of one humped camel (*Camelus dromedarius*) milk: a review. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4(23), 119-124.
- **Agrawal R. P., Beniwal R., Kochar D. K., Tuteja F. C., Ghorui S. K., Sahani M. S. & Sharma, S. (2005).** Camel milk as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycemic control and reduction in doses of insulin in patients with type-1 diabetes: a 1 year randomized controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 68(2), 176-177.
- **Agrawal R. P., Saran S., Sharma P., Gupta R. P., Kochar D. K. & Sahani M. S. (2007).** Effect of camel milk on residual β -cell function in recent onset type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(3), 494-495.
- **Ahmad N., Imran M., Khan M. K. & Nisa, M. U. (2016).** Degree of hydrolysis and antigenicity of buffalo alpha S₁ casein and its hydrolysates in children with cow milk allergy. *Food and Agricultural Immunology*, 27(1), 87-98.
- **Ajamaluddin M., Abdulrahman A., Ewa S. & Jerzy J. (2012).** A study of the anti-diabetic agents of camel milk. *International Journal of Molecular Medicine*, 30(3), 585-592.
- **Al-Haj O. A. & Al-Kanhal H. A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20 (12), 811-821.
- **Al-Haj O. A., Metwalli A. A., Ismail E. A., Ali H. S., Al-Khalifa A. S. & Kanekanian, A. D. (2018).** Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity and antimicrobial effect of fermented camel milk (*Camelus dromedarius*). *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 27-35.

Références bibliographiques

- **Alim N., Fondrini F., Bonizzi I., Feligini M. & Enne G. (2005).** Characterization of casein fractions from Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 112–116.
- **Alloui-Lombarkia O., Ghennam E. H., Bacha A. & Abededdaim M. (2007).** Physico-chemical and biochemical properties of camel milk and separation of its proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 112-116.
- **Al-Majali A. M., Ismail Z. B., Al-Hami Y. & Nour A. Y. (2007).** Lactoferrin concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 5(3), 120.
- **Ambrosoli R., di Stasio L. & Mazzocco P. (1988).** Content of α S₁-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*, 71(1), 24-28.
- **Antal J., Pál G., Asbóth B., Buzás Z., Patthy A. & Gráf L. (2001).** Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Analytical Biochemistry*, 288(2), 156-167.
- **Assem F. M., Abd El-Gawad M. A. M., Kassem J. M. & Abd El-Salam M. H. (2018).** Proteolysis and antioxidant activity of peptic, tryptic and chymotryptic hydrolysates of cow, buffalo, goat and camel caseins. *International Journal of Dairy Technology*, 71(1), 236-242.
- **Ates S., Pekyardimci S. & Cokmus C. (2001).** Partial characterization of a peptide from honey that inhibits mushroom polyphenol oxidase. *Journal of Food Biochemistry*, 25(2), 127–137.
- **Attia H., Kherouatou N., Nasri M. & Khorchani T. (2000).** Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Le Lait*, 80(5), 503-515.
- **Attia H., Kherouatou N. & Dhouib A. (2001).** Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 263-270.
- **Ayyash M., Al-Dhaheri A. S., Al Mahadin S., Kizhakkayil J. & Abushelaibi A. (2018).** In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 900-911.
- **Bahar A. & Ren D. (2013).** Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- **Barbour E. K., Nabbut N. H., Frerichs W. M. & AL-Nakhli H. M. (1984).** Inhibition of pathogenic bacteria by camel's milk: relation to whey lysozyme and stage of lactation. *Journal of Food Protection*, 47(11), 838-840.

Références bibliographiques

- **Barrefors P., Ekstrands B., Fagerstam L., Larsson-Raznikizwicz M., Schaar J. & Steffner P. (1985).** Fast protein liquid chromatography (FPLC) of bovine caseins. *Milchwissenschaft*, 40(5), 257-260.
- **Beg O. U., von Bahr-Lindström H., Zaidi Z. H. & Jörnvall H. (1984).** A small camel-milk protein rich in cysteine/half-cystine. *Bioscience Reports*, 4(12), 1065-1070.
- **Beg O. U., von Bahr-Lindström H., Zaidi Z. H. & Jörnvall H. (1986).** A camel milk whey protein rich in half-cystine: Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns, and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, 159 (1), 195-201.
- **Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H. & Jörnvall H. (1987).** Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 216(2), 270-274.
- **Belitz H.D. & Grosch W. (1999).** Food Chemistry, Springer, 2 ed. New York.
- **Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992).** Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1121(1-2), 130-136.
- **Benkerroum N. (2010).** Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry: a review, *International Journal of Dairy Technology*, 63(3), 320-338.
- **Benkerroum N., Mekkaoui M., Bennani N. & Hidane K. (2004).** Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 39-43.
- **Bhat Z. F., Kumar S. & Bhat H. F. (2015).** Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5377-5392.
- **Bornaz S., Sahli A. L. I., Attalah A. & Attia H. (2009).** Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: a comparison with goats', ewes' and cows' milks. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 505-513.
- **Bouarab-Chibane L., Ouled-Bouhedda B., Leonard L., Gemelas L., Bouajila J., Ferhout H., Cottaz A., Joly C., Degraeve P. & Oulahal N. (2017).** Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, 243(11), 1997-2009.
- **Brezovečki A., Čagalj M., Filipović Dermić Z., Mikulec N., Bendelja Ljolić D. & Antunac N. (2015).** Camel milk and milk products. *Mljekarstvo*, 65(2), 81-90.
- **Canabady-Rochelle L. L. S., Harscoat-Schiavo C., Kessler V., Aymes A., Fournier F. & Girardet J.-M. (2015).** Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry*, 183, 129-135.
- **Carreira R. L., Ornellas C. B. D., Morais H. A., Da-Motta S. & Silvestre M. P. C. (2003).** Effect of precipitation by trichloroacetic acid (TCA) and ultrafiltration profile on the peptide hydrolysates of casein. *Ciencia Agrotecnologia*, 27, 414-421.

Références bibliographiques

- **Cayot P. & Lorient D. (1998).** Structure et Technofonctions Des Protéines du Lait, ed. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris.
- **Cervato G., Cazzola R. & Cestaro B. (1999).** Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(4), 291-296.
- **Chan E. W. C., Lim Y. Y., Wong L. F., Lianto F. S., Wong S. K., Lim K. K., Joe C. E. & Lim T. Y. (2008).** Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, 109(3), 477-483.
- **Chaoui-Kherouatou N. & Attia N. (2008).** Etude comparative des caséines camelines (*Camelus dromaderius*) et bovines. *Sciences & Technologies*, (28), 73-79.
- **Chen M. J., Liu J. R., Sheu J. F., Lin C. W. & Chuang C. L. (2006).** Study on skin care properties of milk kefir whey. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 19(6), 905-908.
- **Choi S. K., Park K. D., Kim D. A., Lee D. W. & Kim Y. J. (2014).** Preparation of camel milk liposome and its anti-aging effects. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 40(2), 155-162.
- **Christensen T. M. I. E. (1989).** Quantitative fractionation of casein by precipitation or ion-exchange chromatography. *Milchwissenschaft*, 44, 480-484.
- **Contreras M. M., Carrón R., Montero M. J., Ramos M. & Recio I. (2009).** Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19, 566-573.
- **Daliri E., Oh D. & Lee B. (2017).** Bioactive Peptides: a review. *Foods*, 6(5), 32.
- **De Almeida C. R. R. (2011).** Camel milk: Characteristics and perspectives for use in clinical practice. *Revista Chilena de Nutricion*, 38(2), 211-218.
- **De Castro R. J. S. & Sato H. H. (2015).** Biologically active peptides: Processes for their generation, purification, identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185-198.
- **Decker E. A. & Welch B. (1990).** Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
- **Díaz M. & Decker E. A. (2004).** Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8208-8213.
- **Díaz M., Dunn C. M., McClements D. J. & Decker E. A. (2003).** Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2365-2370.
- **Dumas B. R. & Garnier J. (1970).** Structure of the casein micelle. The accessibility of the subunits to various reagents. *Journal of Dairy Research*, 37(2), 269-278.
- **Dziuba B. & Dziuba M. (2014).** Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(1), 5-26.
- **Dziuba M., Dziuba B. & Iwaniak A. (2009).** Milk proteins as precursors of bioactive peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 8(1), 71-90.

Références bibliographiques

- **Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell Jr, H. M., Harwalkar V. R., Jenness R. & Whitney R. M. (1984).** Nomenclature of proteins of cow's milk. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1599-1631.
- **El-Agamy E. I. (2000).** Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *Journal of Dairy Research*, 67(1), 73-81.
- **El-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C. P. & Assaf R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, 59(2), 169-175.
- **EL-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P. & Assaf R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulines from camel's milk. *International Dairy Journal*, 6, 129-145.
- **El-Agamy E. I., Nawar M., Shamsia S. M., Awad S. & Haenlein G. F. (2009).** Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research*, 82(1), 1-6.
- **El-Hatmi H., Jrad Z., Khorchani T., Jardin J., Poirson C., Perrin C., kiefer C. C. & Girardet J. M. (2016).** Identification of bioactive peptides derived from caseins, glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1) and peptidoglycan recognition protein-1 (PGRP-1) in fermented camel milk. *International Dairy Journal*, 56, 159-168.
- **Elias R. J., Kellerby S. S. & Decker E. A. (2008).** Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430-441.
- **El-Salam M. A. & El-Shibiny S. (2013).** Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Reviews International*, 29(1), 1-23.
- **Epand R. M. & Vogel H. J. (1999).** Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1462(1-2), 11-28.
- **Erdmann K., Cheung B. W. Y. & Schröder H. (2008).** The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643–654.
- **Ereifej K. I., Alu'datt M. H., AlKhalidy H. A., Alli I. & Rababah T. (2011).** Comparison and characterization of fat and protein composition for camel milk from eight Jordanian locations. *Food Chemistry*, 127(1), 282–289.
- **Farah Z. (2004).** Milk and Meat from the Camel: Handbook on Products and Pcessing, ed. Vdf Hochschulverlag a Gander ETH Zürich, Zürich, Singen.
- **Farah Z. (2011).** Milk | Camel Milk. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Elsevier, 2 ed. Academic Press, San Diego.
- **Farah Z. & Farah-Riesen M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40(11), 669 -671
- **Farah Z. & Rüegg M. W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8(2), 211-216.

Références bibliographiques

- **Farah Z., Mollet M., Younan M. & Dahir R. (2007).** Camel dairy in Somalia: Limiting factors and development potential. *Livestock Science*, 110(1-2), 187-191.
- **Farrell Jr H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C.L., Hollar C.M., Ng-Kwai-Hang K.F. & Swaisgood H. E. (2004).** Nomenclature of the proteins of cows' milk. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674.
- **Faye B. (2015).** Role, distribution and perspective of camel breeding in the third millennium economies. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 318-327.
- **Giambra I. J., Chianese L., Ferranti P. & Erhardt G. (2010).** Genomics and proteomics of deleted ovine CSN1S1* I. *International Dairy Journal*, 20(3), 195-202.
- **Girardet J. M., Saulnier F., Gaillard J. L., Ramet J. P. & Humbert G. (2000).** Camel (*Camelus dromedarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(1), 19-26.
- **Gobbetti M., Minervini F. & Rizzello C. G. (2007).** Bioactive Peptides in Dairy Products. In: Handbook of Food Products Manufacturing, ed. John Wiley & Sons, Inc, United-states.
- **Gómez-Ruiz J. A., Ramos M. & Recio I. (2002).** Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *International Dairy Journal*, 12, 697-706.
- **Gorban A. M. S., & Izzeldin O. M. (1997).** Mineral content of camel milk and colostrum. *Journal of Dairy Research*, 64, 471–474.
- **Haddadin M. S., Gammoh S. I. & Robinson R. K. (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, 75(1), 8-12.
- **Hailu Y., Hansen E. B., Seifu E., Eshetu M., Ipsen R. & Kappeler S. (2016).** Functional and technological properties of camel milk proteins: a review. *Journal of Dairy research*, 83(4), 422-429.
- **Hancock R. E. & Sahl H. G. (2006).** Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12), 1551.
- **Hartmann R. & Meisel H. (2007).** Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 163-169.
- **Hashim I. B. (2002).** Acceptance of camel milk among elementary school students in Al Ain city, United Arab Emirates. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 54–59.
- **Hata I. (1999).** Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CPP-III, in cell cultures. *Milchwissenschaft*, 54, 3-7.
- **Hill R. D., Lahav E. & Givol D. (1974).** A rennin-sensitive bond in α S₁B-casein. *Journal of Dairy Research*, 41(1), 147-153.
- **Hinz K., O'Connor P. M., Huppertz T., Ross R. P. & Kelly A. L. (2012).** Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. *Journal of Dairy Research*, 79(2), 185-191.

Références bibliographiques

- **Homayouni-Tabrizi M., Shabestarin H., Asoodeh A. & 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(2), 187-195.
- **Horne D. S. (1998).** Casein interactions: casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8(3), 171-177.
- **Houimel M., Mach J. P., Corthesy-Theulaz I., Corthesy B. & Fisch I. (1999).** New inhibitors of Helicobacter pylori urease holoenzyme selected from phage-displayed peptide libraries. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 774-780.
- **Huang X., Dai J., Fournier J., Ali A. M., Zhang Q. & Frenkel K. (2002).** Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(1), 84-92.
- **Ibrahim H. R., Isono H. & Miyata T. (2018).** Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Animal Nutrition*, 4(3), 273-280.
- **Jeon Y. J., Byun H. G. & Kim S. K. (1999).** Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.
- **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. & Oulahal N. (2015).** Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria*, 44(4), 609-616.
- **Kafarski P. & Talma M. (2018).** Recent advances in design of new urease inhibitors: a review. *Journal of Advanced Research*, 13, 101-112.
- **Kahn V. (1985).** Effect of proteins, protein hydrolyzates and amino acids on o-dihydroxyphenolase activity of polyphenol oxidase of mushroom, avocado and banana. *Journal of Food Science*, 50(1), 111-115.
- **Kamali Alamdari E. & Ehsani M. R. (2017).** Antimicrobial peptides derived from milk: a review. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 7(1), 49-56.
- **Kamoun M. (1995).** Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Options Méditerranéennes, Séries Séminaires*, 13, 81-103.
- **Kampa M., Loukas S., Hatzoglou A., Martin P., Martin P. M. & Castanas E. (1996).** Identification of a novel opioid peptide (Tyr-Val-Pro-Phe-Pro) derived from human αS_1 casein (αS_1 -casomorphin, and αS_1 -casomorphin amide). *Biochemical Journal*, 319(3), 903-908.
- **Kappeler S. (1998).** Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Doctorat Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
- **Kappeler S., Farah Z. & Puhan Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65(2), 209-222.

Références bibliographiques

- **Karaki H., Doi K., Sugano S., Uchiwa H., Sugai R., Murakami U. & Takemoto S. (1990).** Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 96(2), 367-371.
- **Kato N., Sato S., Yamanaka A., Yamada H., Fuwa N. & Nomura M. (1998).** Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(1), 145-147.
- **Khalesi M., Salami M., Moslehishad M., Winterburn J. & Moosavi-Movahedi A. A. (2017).** Biomolecular content of camel milk: A traditional superfood towards future healthcare industry. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 49-58.
- **Khan B. B. & Iqbal A. (2001).** Production and composition of camel milk: a review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 38, 64-68.
- **Khaskheli M., Arain M. A., Chaudhry S., Soomro A. H. & Qureshi T. A. (2005).** Physico-chemical quality of camel milk. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 2, 164-166.
- **Kherouatou N., Nasri M. & Attia H. (2003).** A study of the dromedary milk casein micelle and its changes during acidification. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 237-244.
- **Khorshid F. A., Moshref S. S. & Heffny N. T. (2005).** An ideal selective anti-cancer agent *In Vitro*: Tissue culture study of Human lung cancer cells A549. *Journal of King Abdulaziz University-Medical Sciences*, 12, 3-19.
- **Kihal M., Chekroun A., Bensoltane A., Kheroua O. & Saidi D. (1999).** Characterization of Algeria raw camels' milk: proteins content and native lactic acid bacteria. *1st Conference on Camel Research*, may 25-27, Ouargla, Algeria.
- **Kim Y. J. & Uyama H. (2005).** Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723.
- **Kim J. H., Desor D., Kim Y. T., Yoon W. J., Kim K. S., Jun J. S., Pyun K. H. & Shim I. (2007a).** Efficacy of α S₁-casein hydrolysate on stress-related symptoms in women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(4), 536.
- **Kim S. Y., Je J. Y. & Kim S. K. (2007b).** Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31-38.
- **Kitts D. D. (2005).** Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 549-554.
- **Kobashi K., Takebe S., Terashima N. & Hase J. (1975).** Inhibition of urease activity by hydroxamic acid derivatives of amino acids. *The Journal of Biochemistry*, 77(4), 837-843.
- **Konuspayeva G., Loiseau G. & Faye B. (2004).** La plus-value santé du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, 47-50.

Références bibliographiques

- **Konuspayeva G., Faye B. & Loiseau G. (2009).** The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 95-101.
- **Korhonen H. & Pihlanto A. (2006).** Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960.
- **Kosikowska P. & Berlicki L. (2011).** Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(6), 945-957.
- **Kouniba A., Berrada M., Zahar M. & Bengoumi M. (2005).** Composition and heat stability of Moroccan camel milk. *Journal of Camel Practice and Research*, 12(2), 105-110.
- **Krajewska B. (2009).** Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *Journal of Molecular Catalysis*, 59(1-3), 9-21.
- **Krishnankutty R., Iskandarani A., Therachiyil L., Uddin S., Azizi F., Kulinski M., Bhat A. A. & Mohammad R. M. (2018).** Anticancer activity of camel milk via induction of autophagic death in Human colorectal and breast cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(12), 3501.
- **Kula J. (2016).** Medicinal values of camel milk. *International Journal of Veterinary Science Research*, 2(1), 018-025.
- **Kumar S., Chouhan S.V., Sanghi A. & Teotia S.U.V. (2013).** Antioxidative effect of yak milk caseinates hydrolyzed with three different proteases. *International Journal of Livestock Research*, 799-802.
- **Kumar D., Chatli M. K., Singh R., Mehta N. & Kumar P. (2016a).** Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139, 20-25.
- **Kumar D., Chatli M. K., Singh R., Mehta N. & Kumar P. (2016b).** Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 391-404.
- **Kuppasamy A. & Ulagesan S. (2016).** Antimicrobial activity of protein hydrolysate from marine molluscs *Babylonia spirata* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6, 73-77.
- **Laemmli D. K. & Favre M. (1973).** Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, 80, 575-599.
- **Lahav E., Edelsten D., Sode-Mogensen M. T. & Sofer E. (1971).** Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, 26, 489-495.
- **Lahl W. & Braun S. (1994).** Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food technology*, 48(10), 68-71.
- **Lahov E. & Regelson W. (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145.

Références bibliographiques

- **Larsson-Raznikiewicz M. & Mohamed M. A. (1986).** Analysis of the casein content in camel (*Camelus dromedarius*) milk. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 16, 13-18.
- **Li-Chan E. & Nakai S. (1989).** Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 381-390.
- **Li Y.W., Li B., He J. & Qian P. (2011).** Structure-activity relationship study of antioxidative peptides by QSAR modeling: the amino acid next to C-terminus affects the activity. *Journal of Peptide Science*, 17, 454-462.
- **Lindmark-Månsson H., Fondén R. & Pettersson H. E. (2003).** Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, 13(6), 409-425.
- **López-Expósito I., Gómez-Ruiz J. Á., Amigo L. & Recio I. (2006).** Identification of antibacterial peptides from ovine α 2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9), 1072-1080.
- **Loukas S., Varoucha D., Zioudrou C., Streaty R. A. & Klee W. A. (1983).** Opioid activities and structures of Alpha-casein-derived exorphins. *Biochemistry*, 22(19), 4567-4573.
- **Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- **Maeno M., Yamamoto N. & Takano T. (1996).** Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316-1321.
- **Maghraby A. S., Mohamed M. A. & Abdel-Salam A. M. (2005).** Anti-schistosomal activity of colostral and mature camel milk on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14(4), 432.
- **Marco G. J. (1968).** A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.
- **Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L. & Leroux C. (2002).** The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants' milks. *Reproduction Nutrition Development*, 42, 433-459.
- **Mas S., Marchesseau S., Lagaude A. & Cuq J. L. (1999).** Rapid analysis of bovine caseins by reversed phase and anion-exchange HPLC. *Milchwissenschaft*, 54(11), 606-610.
- **Masuda T., Yamashita D., Takeda Y. & Yonemori S. (2005).** Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(1), 197-201.
- **Mati A. (1992).** Les proteose-peptones dans les laits Bovin, Ovin et Caprin : isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction A caractère hydrophobe contenant le composant-3. Thèse de doctorat, université de Nancy 1, France.

Références bibliographiques

- **McCann K. B., Shiell B. J., Michalski W. P., Lee A., Wan J., Roginski H. & Coventry M. J. (2006).** Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine α S₁-casein. *International Dairy Journal*, 16(4), 316-323.
- **McKellar R. C. (1981).** Development of off-flavors in ultra-high temperature and pasteurized milk as a function of proteolysis. *Journal of Dairy Science*, 64(11), 2138-2145.
- **Medrano J. F. & Sharrow L. (1989).** Milk protein typing of bovine mammary gland tissue used to generate a complementary deoxyribonucleic acid library. *Journal of Dairy Science*, 72(12), 3190-3196.
- **Mehaia M. A. & Al-Kahnal M. A. (1989).** Studies on camel and goat milk proteins: nitrogen distribution and amino acid composition. *Nutrition Reports International*, 39, 351-356
- **Mehaia M. A., Hablas M. A., Abdel-Rahman K. M. & El-Mougy S. A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 52(2), 115-122.
- **Merin U., Bernstein S., Bloch-Damti A., Yagil R., van Creveld C., Lindner P. & Gollop N. (2001).** A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrum. *Livestock Production Science*, 67(3), 297-301.
- **Messaoudi M., Lefranc-Millot C., Desor D., Demagny B. & Bourdon L. (2005).** Effects of a tryptic hydrolysate from bovine milk α S₁-casein on hemodynamic responses in healthy human volunteers facing successive mental and physical stress situations. *European Journal of Nutrition*, 44(2), 128-132.
- **Metwalli A.M. & Al-Saleh A.A. (2010).** Susceptibility of camel, buffalo and cow milk caseins to proteolysis by different proteolytic enzymes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 22, 59-69.
- **Miclo L., Perrin E., Driou A., Papadopoulos V., Boujrad N., Vanderesse R., Boudier J. F., Desor D., Linden G. & Gaillard J.L. (2001).** Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α S₁-casein with benzodiazepine-like activity. *The FASEB Journal*, 15(10), 1780-1782.
- **Mietton B., Desmazeaud M., De Roissart H. & Weber F. (1994).** Transformation Du Lait en Fromage, ed. Bactéries Lactiques, Lavoisier, Paris.
- **Migliore-Samour D., Floc'h F. & Jolles P. (1989).** Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Research*, 56(3), 357-362.
- **Miguel M., Manso M. A., López-Fandiño R., Alonso M. J. & Salaices M. (2007).** Vascular effects and antihypertensive properties of kappa-casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 17, 1473-1477.
- **Miguel M., Gómez-Ruiz J. A., Recio I. & Alexandre A. (2010).** Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein derived peptides in spontaneously hypertensive rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1422-1427.

Références bibliographiques

- **Mikkelsen J., Højrup P. & Knudsen J. (1987).** Purification of goats' milk casein by reversed-phase high-performance liquid chromatography and identification of α S₁-casein. *Journal of Dairy Research*, 54(3), 361-367.
- **Minkiewicz P., Slangen C. J., Dziuba J., Visser S. & Mioduszevska H. (2000).** Identification of peptides obtained via hydrolysis of bovine casein by chymosin using HPLC and mass spectrometry. *Milchwissenschaft*, 55(1), 14-17.
- **Modolo L. V., de Souza A. X., Horta L. P., Araujo D. P. & de Fátima Â. (2015).** An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review. *Journal of Advanced Research*, 6(1), 35-44.
- **Mohamed M. A., Mursal A. I. & 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.
- **Mohanty D. P., Mohapatra S., Misra S. & Sahu P. S. (2016).** Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577-583.
- **Molina A. C. T., Allia I., Konishi Y. & Kermasha S. (2007).** Effect of dephosphorylation on bovine casein. *Food Chemistry*, 101(3), 1263-1271.
- **Moslehishad M., Ehsani M. R., Salami M., Mirdamadi S., Ezzatpanah H., Naslaji A. N. & Moosavi-Movahedi A. A. (2013).** The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal*, 29(2), 82-87.
- **Nagasawa T., Kiyosawa I. & Kuwahara K. (1971).** Human casein. III. DEAE-cellulose -urea chromatography of Human casein and dephosphorylation of casein fractions. *Journal of Dairy Science*, 54(7), 987-993.
- **Nakajima M., Shinoda I., JIMA Y. S., Miyauchi H., Fukuwatari Y. & Hayasawa H. (1996).** K-Casein suppresses melanogenesis in cultured pigment cells. *Pigment Cell Research*, 9(5), 235-239.
- **Nakajima M., Shinoda I., Mikogami T., Iwamoto H., Hashimoto S. I., Miyauchi H., Fukuwatari Y. & Hayasawa H. (1997).** β -Lactoglobulin suppresses melanogenesis in cultured Human melanocytes. *Pigment Cell Research*, 10(6), 410-413.
- **Nongonierma A. B., O'Keeffe M. B. & FitzGerald R. J. (2016).** Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. In: *Advanced Dairy Chemistry*, ed. Springer, New York, NY.
- **Ochirkhuyag B., Chobert J. M., Dalgalarrrondo M., Choiset Y. & Haertlé T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian yak, khainak, and bactrian camel. *Le Lait*, 77(5), 601-613.
- **Ochirkhuyag B., Chobert J. M., Dalgalarrrondo M., Choiset Y. & Haertlé T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mangolian yak, khainak and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 105-124.

Références bibliographiques

- **Okot-Kotber M., Liavoga A., Yong K. J. & Bagorogoza K. (2001).** Activity and inhibition of polyphenol oxidase in extracts of bran and other milling fractions from a variety of wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 78(5), 514-520.
- **Omar A., Harbourne N. & Oruna-Concha M. J. (2016).** Quantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 58, 31-35.
- **Omer R. H. & Eltinay A. H. (2009).** Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(5), 607-610.
- **Othman O. E., Nowier A. M. & El-Denary M. E. (2016).** Genetic variations in two casein genes among Maghrabi camels reared in Egypt. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13(1), 473-480.
- **Panwar R., Grover C. R., Kumer V., Ranga S. & Kumer N. (2015).** Camel milk: Natural Medicine. Boon to dairy industry, 10.
- **Pareek K., Shah S. & Arora A. (2012).** Casein protein: phylogeny study of important domestic animals using computational method. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Biosciences*, 2(3), 326-337.
- **Park Y. K. & Hahm K. S. (2005).** Antimicrobial peptides (AMPs): peptide structure and mode of action. *BMB Reports*, 38(5), 507-516.
- **Parker F., Migliore -Samour D., Floch F., Zerial A., Werner G. H., Jollès J., Casaretto M., Zahn H. & Jollès P. (1984).** Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *European Journal of Biochemistry*, 145(3), 677-682.
- **Pelmont J. (1989).** Enzymes, ed. Presses Universitaires, Grenoble.
- **Phelan M., Aherne A., FitzGerald R. J. & O'Brien N. M. (2009).** Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19(11), 643-654.
- **Pihlanto A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- **Power O., Jakeman P. & FitzGerald R. J. (2013).** Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797-820.
- **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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4712-4718.
- **Quan S., Tsuda H. & Miyamoto T. (2008).** Angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130b4 from camel milk in Inner Mongolia, china. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(15), 2688-2692.
- **Rahimi M., Ghaffari S. M., Salami M., Mousavy S. J., Niasari-Naslaji A., Jahanbani R., Yousefinejad S., Khalesi M. & Moosavi-Movahedi A. A. (2016).** ACE-inhibitory and radical scavenging activities of bioactive peptides obtained from

Références bibliographiques

- camel milk casein hydrolysis with proteinase K. *Dairy Science & Technology*, 96(4), 489-499.
- **Ramet J. P. (2001).** The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). Food & Agriculture Organization (FAO), 113. Rome.
 - **Rasmussen L. K., Due H. A. & Petersen T. E. (1995).** Human α S₁-casein: purification and characterization. *Biochemistry and Molecular Biology*, 111, 75-81.
 - **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. & Rice-Evans C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
 - **Recio I., & Visser S. (1999).** Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α S₂-casein. *Biochimica & Biophysica Acta*, 1428, 314-326.
 - **Redwan E. R. M. & Tabll A. (2007).** Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 28(3), 267-277.
 - **Rival S. G., Boeriu C. G. & Wichers H. J. (2001).** Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 295-302.
 - **Rodgers A. D. & Curzon G. (1975).** Melanin formation by human brain *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 24(6), 1123-1129.
 - **Ruiz-Giménez P., Ibáñez A., Salom J. B., Marcos J. F., López-Díez J. J., Vallés S., Torregrosa G., Alborch E. & Manzanares P. (2010).** Antihypertensive properties of lactoferricin B-derived peptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6721-6727.
 - **Sahani M. S., Agarwal R. P., Tuteja F. C., Aminudeen A., Singh R. & Sena D. S. (2005).** Hypoglycemic activity of camel milk in straptozotocin induced hyperglycemia in rats. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 75(12).
 - **Saidi D., Kihal M., Hamama A., Chekroune A., Henni D. & Kheroua O. (2005).** Characterization of Algerian raw camel's milk: identification of dominant lactic acid bacteria and proteins analysis. *Journal Algérien Des Région Arides*, 4, 1-9.
 - **Saito T., Nakamura T., Kitazawa H., Kawai Y. & Itoh T. (2000).** Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
 - **Salami M., Yousefi R., Ehsani M. R., Dalgalarondo M., Chobert J. M., Haertlé T., Razavi S.H., SabouryAA N-N.A. & Moosavi-Movahedi A. A. (2008).** Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18(12), 1097-1102.
 - **Salami M., Moosavi-Movahedi A. A., Moosavi-Movahedi F., Ehsani M. R., Yousefi R., Farhadi 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(04), 471-478.

Références bibliographiques

- **Salmen S. H., Abu-Tarboush H. M., Al-Saleh A. A. & Metwalli A. A. (2012).** Amino acids content and electrophoretic profile of camel milk casein from different camel breeds in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 177-183.F
- **Saltanat H., Li H., Xu Y., Wang J., Liu F. & Geng X. H. (2009).** The influences of camel milk on the immune response of chronic hepatitis B patients. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 25(5), 431-433.
- **Salwa M. Q. & Lina A. K. (2010).** Antigenotoxic and anticytotoxic effect of camel milk in mice treated with cisplatin. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(2), 159-166.
- **Sanogo T., Pâquet D., Aubert F. & Linden G. (1989).** Purification of α S₁-casein by fast protein liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, 72(9), 2242-2246.
- **Sarmadi B. H. & Ismail A. (2010).** Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.
- **Sboui A., Khorchani T., Djegham M., Agrebi A., Elhatmi H. & Belhadj O. (2010).** Anti-diabetic effect of camel milk in alloxan-induced diabetic dogs: a dose-response experiment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(4), 540-546.
- **Schmidt D. G. (1982).** Association of Caseins and Casein Micelle Structure. In *Developments in Dairy Chemistry -I. Proteins*, ed. Applied Science Publishers, Londres & New York.
- **Schurink M., van Berkel W. J. H., Wichers H. J. & Boeriu C. G. (2007).** Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*, 28(3), 485-495.
- **Shabo Y., Barzel R., Margoulis M. & Yagil R. (2005).** Camel milk for food allergies in children. *Immunology and Allergies*, 7(12), 796.
- **Shanmugam V. P., Kapila S., Sonfack T. K. & Kapila R. (2015).** Antioxidative peptide derived from enzymatic digestion of buffalo casein. *International Dairy Journal*, 42,
- **Sharma C. & Singh C. (2014).** Therapeutic value of camel milk: a review. *Advanced Journal of Pharmacie and Life Science Research*, 2(3), 7-13.
- **Shori A. B. (2015).** Camel milk as a potential therapy for controlling diabetes and its complications: a review of *in vivo* studies. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(4), 609-618.
- **Shuiep E. S., El Zubeir I. E. M., El Owni O. A. O. & Musa H. H. (2008).** Influence of season and management on composition of raw camel (*Camelus dromedarius*) milk in Khartoum state, Sudan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(1), 101-106.
- **Shuiep E. T. S., Giambra I. J., El Zubeir I. E. Y. M. & Erhardt G. (2013).** Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of α S₁-casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. *International Dairy Journal*, 28(2), 88-93.
- **Shuiep E. S., Jäger S., El Zubeir I. E. M., Yousif I. A. & Erhardt G. (2016).** Isolation and characterization of three camel (*Camelus dromedarius*) milk casein fractions. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Production*, 6(1), 43-50.

Références bibliographiques

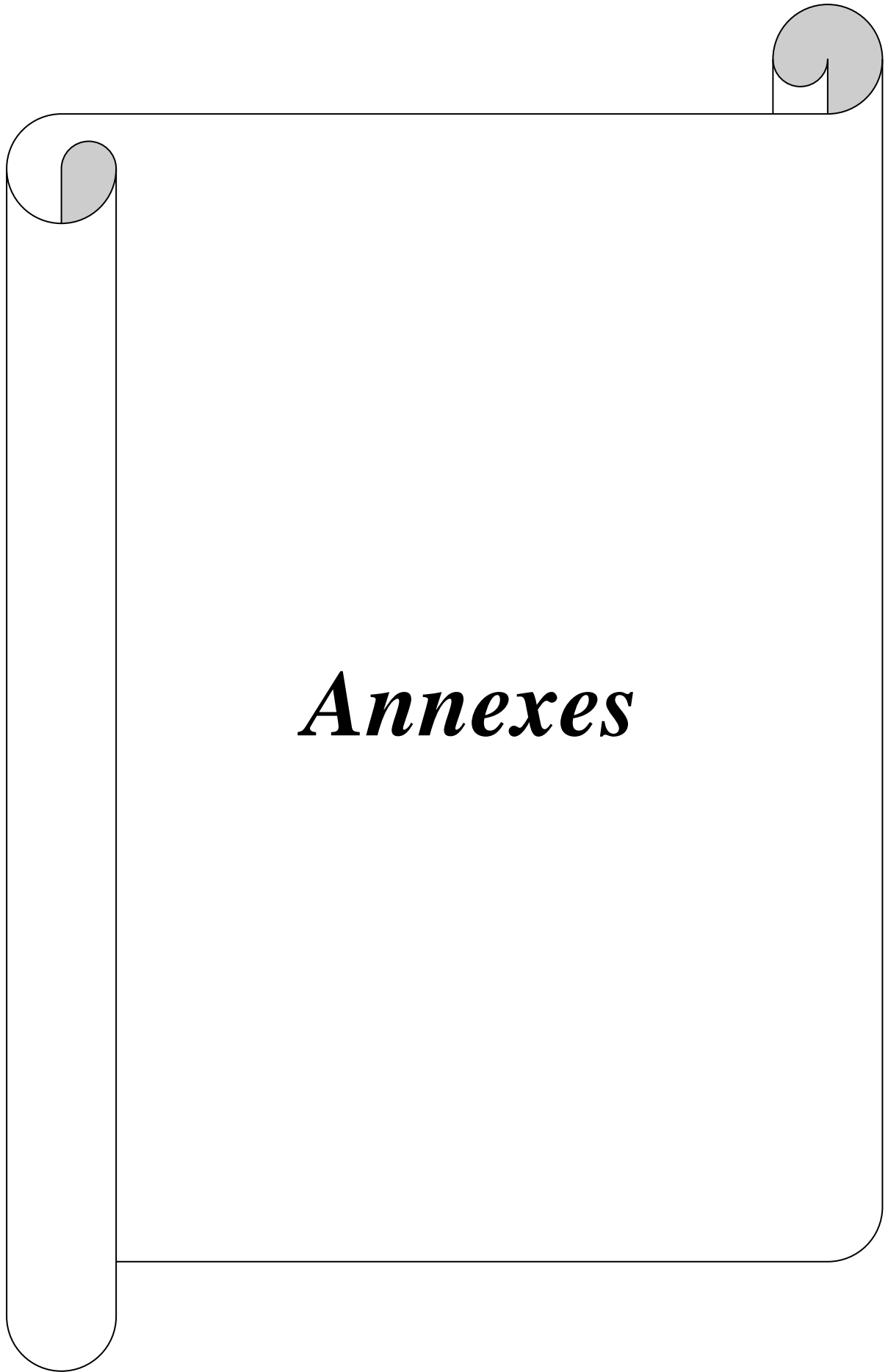
- **Si Ahmed-Zennia S., Almi D., Senoussi C., Boudjenah S.H. & Mati A. (2013).** Separation and characterization of major milk proteins from Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 283-290.
- **Siboukeur O., Mati A. & Hesas B. (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agricultures*, 5(14), 473-478.
- **Silva S. V. & Malcata F. X. (2005).** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15.
- **Singh R., Mal G., Kumar D., Patil N. V. & Pathak K. M. L. (2017).** Camel milk: An important natural adjuvant. *Agricultural Research*, 6(4), 327-340.
- **Smirnoff N. & Cumbes Q. J. (1989).** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- **Solanki D. & Hati S. (2018).** Considering the potential of *Lactobacillus rhamnosus* for producing Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides in fermented camel milk (Indian breed). *Food Bioscience*, 23, 16-22.
- **Sousa J.C., Berto R.F., Gois E.A., Fontenele-Cardi N.C., Honório-Júnior J.E.R., Konno K., et al. (2009).** Leptoglycin: A new glycine/leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). *Toxicon*, 54 (1), 23-32.
- **Srinivas S. & Prakash V. (2010).** Bioactive peptides from bovine milk α -Casein: Isolation, characterization and multifunctional properties. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16(1), 7-15.
- **Strange E. D., Van Hekken D. & Thompson M. P. (1991).** Qualitative and quantitative determination of caseins with reverse-phase and anion-exchange HPLC. *Journal of Food Science*, 56(5), 1415-1420.
- **Suetsuna K., Ukeda H. & Ochi H. (2000).** Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(3), 128-131.
- **Sultan S., Huma N., Butt M. S., Aleem M. & Abbas M. (2016).** Therapeutic potential of dairy bioactive peptides: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(1), 105-115.
- **Tagliazucchi D., Shamsia S. & Conte A. (2016).** Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides during *in vitro* gastro-intestinal digestion of camel milk. *International Dairy Journal*, 56, 119-128.
- **Tang W., Zhang H., Wang L., Qian H. & Qi X. (2015).** Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chemistry*, 168, 115-123.
- **Tavano O. L. (2013).** Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis*, 90, 1-11.

Références bibliographiques

- **Théolier J., Hammami R., Labelle P., Fliss I. & Jean J. (2013).** Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*, 5, 706-714.
- **Thompson M. P. (1966).** DEAE-cellulose-urea chromatography of casein in the presence of 2-mercaptoethanol. *Journal of Dairy Science*, 49(7), 792-795.
- **Tomita M., Shimamura S., Miyakawa H. & Kobayashi S. (1993).** Method for inhibiting tyrosinase activity in treatment of skin. U.S. Patent and Trademark Office, 5214028, Washington.
- **Tomita M., Kawase K., Tamura Y., Takase M., Miyakawa H., Yamauchi K., Saito H., Abe H., Shimamura S. & Kobayashi S. (1995).** Lactoferrin hydrolyzate for use as an antibacterial agent and as a tyrosinase inhibition agent. U.S. Patent and Trademark Office, 5389611, Washington.
- **Trujillo A. J., Casals I. & Guamis B. (2000).** Analysis of major caprine milk proteins by reverse-phase high-performance liquid chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 83(1), 11-19.
- **Tsou M. J., Kao F. J., Tseng C. K. & Chiang W. D. (2010).** Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 122(1), 243-248.
- **Upadhyay L. S. B. (2012).** Urease inhibitors: a review. *Indian Journal of Biotechnology*, 11, 381-388.
- **Veloso A. C. A. & Teixeira N. (2002).** Separation and quantification of the major casein fractions by reverse-phase high-performance liquid chromatography and urea-polyacrylamide gel electrophoresis detection of milk adulterations. *Journal of Chromatography A*, 967(2), 209-218.
- **Vogel H. J., Schibli D. J., Jing W., Lohmeier-Vogel E. M., Epand R. F. & Epand R. M. (2002).** Towards a structure-function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine-containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, 80(1), 49-63.
- **Wang J., Zhang Q. H., Wang Z. H. & Li H.M. (2009).** Determination of major bovine milk proteins by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(11), 1667-1670.
- **Wangoh J., Farah Z. & Puhan Z. (1998).** Iso-electric focusing of camel milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(7), 617-621.
- **Weatherburn M. W. (1967).** Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39(8), 971-974.
- **Yagil R. & Etzion Z. (1980).** Effect of drought condition on the quality of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 47(2), 159-166.
- **Yoshikawa M., Tani F., Shiota H., Suganuma H., Usui H., Kurahashi K. & Chiba H. (1994).** Casoxin D, an opioid antagonist ileum-contracting/vasorelaxing peptide derived from human α S₁-casein. In: β -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments, ed. VCH-Weinheim, Germany.

Références bibliographiques

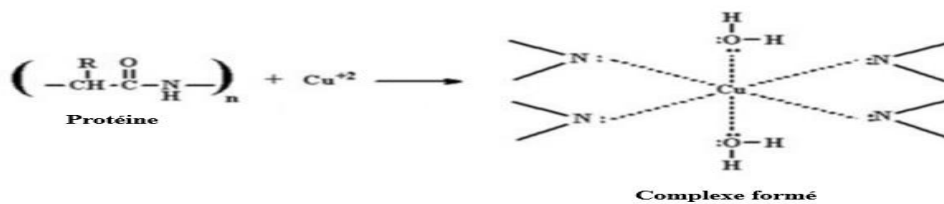
- **Zou T. B., He T. P., Li H. B., Tang H. W. & Xia E. Q. (2016).**The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.
- **Zucht H. D., Raida M., Adermann K., Migert H. J. & Forssmann W. G. (1995).** Casocidin-I: A casein- α S2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 372(2-3), 185-188.



Annexes

Annexe 1 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

1. Réaction



2. Préparation des solutions

- **Solution alcaline A** : 10 mg Na₂CO₃ dans 500 mL de solution NaOH (0,1N).
- **Solution cuivrique B** : 2 mL de CuSO₄, 5H₂O (0,32g/mL) + 2 mL de Tartrate double de Na et de K 1%.
- **Solution C** : 50 mL de la solution A + 1mL de la solution B.
- **Solution mère de la BSA** : 0,1mg/mL.

3. Gamme étalon

A partir de la solution de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous.

Concentration en BSA µg/mL	0	10	25	50	75	100
Solution mère de BSA (µl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (µl)	1000	900	750	500	250	0

4. Méthode

- 1 mL d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum ;
- ajouter 5 mL de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

5. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparée et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration de la protéine inconnue X est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Annexe 2 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

1. Solutions

• **Solution d'acrylamide (A)**

- Acrylamide36 g
- Bis acrylamide1 g
- Eau distillée100 mL

• **Tampon de gel de séparation (S)**

- Tris18,15 g
- Eau distillée100 mL

Ajuster à pH 8.8 avec de HCl 4N

• **Tapon de gel de concentration (C)**

- Tris6 g
- Eau distillée100mL

Ajuster à pH 6.8 avec de HCl 4N

• **Tampon d'électrode**

- Tris1, 2 g
- Glycine5, 75 g
- SDS0,2 g
- Eau distillée200 mL

• **Tampon d'échantillon**

- Solution (C)500µl
- Eau distillée250µl
- SDS (10%)250µl
- 2-mercapthoéthanol50µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon. Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide. Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol.

• **Solution de fixation**

- Acide trichloroacétique (TCA).....12 g
- Eau distillée100 mL

• Solution de coloration

- Bleu de Coomassie R2500,5 g
- TCA4 g
- Méthanol100mL
- Eau distillée100mL

• Solution de décoloration

- Acide acétique37,5mL
- Eau distillée312,5mL
- Méthanol150mL

• Solution de persulfate d'ammonium (PSA)

- Persulfate d'ammonium0,1 g
- Eau distillée1mL

2. Electrophorèse

• Préparation du gel de séparation : T = 17 % et C = 2,07 %

- Solution (A)4,60 mL
- Solution (S)2,51 mL
- Eau distillée2,73 mL

Dégazer pendant 2 mn maximum

- SDS (10%) 100µl
- TEMED13µl
- PSA75µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur

• Préparation du gel de concentration : T= 4,8 % et C = 2,7 %

- Solution (A)1,3 mL
- Solution (C)2,5 mL
- Eau distillée5,8 mL

Dégazer quelques secondes

- SDS (10%)100 µl
- PSA.....10 µl
- TEMED.....20 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne.

- **Dépôt d'échantillon** : 10 à 20 μ l.
- **Mise sous tension** : 20 mA, 250 V.
- **Fixation** : immersion 45 minutes dans la solution de fixation.
- **Coloration** : immersion 1 heure dans la solution de coloration.
- **Décoloration** : immersion dans la solution de décoloration.

Annexe 3 : Electrophorèse en présence d'urée et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-urée)

1. Solutions

• Tampon de gel de séparation (S)

- Tris18, 15 g
- Eau distillée100 m

Ajuster à pH 8,8 avec de HCl 4 N

• Tampon de gel de concentration (C)

- Tris6 g
- Eau distillée100 mL

Ajuster à pH 6,8 avec de HCl 4 N

• Tampon d'électrode

- Tris1,12 g
- Glycine0, 58 g
- Eau distillée200 mL

Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

• Tampon d'échantillon d'échantillon

- Solution (C)100 µl
- Urée700 µl
- 2-mercaptoéthanol 200 µl
- Glycérol (50%).....200 µl
- Bleu de bromophénolune tête d'aiguille

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisés dans 1 mL de ce tampon

2. Electrophorèse

• **Préparation du gel de séparation : T = 13 % et C = 3 % (pour une plaque)**

- Acrylamide2 mL
- Urée (9M)4, 57 mL
- Solution (S)1,33mL

Dégazer environ 2mn maximum

- TEMED90 µl
- PSA 10 µl

Couler à environ 1.5 cm du sommet de la plaque de moindre

- **Préparation du gel de concentration : T= 4.8 % et C = 2.7 % (pour une plaque)**

- Acrylamide0,44 mL
- Urée (9M)2, 72 mL
- Solution (C)0,48mL
- Eau distillée0,33 mL

Dégazer environ 2mn maximum

- TEMED90 µl
- PSA10 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

- **Dépôt d'échantillon** : 10 à 20 µl.
- **Mise sous tension** : 20 mA, 250 V.
- **Fixation** : immersion 45 minutes dans la solution de fixation.
- **Coloration** : immersion 1 heure dans la solution de coloration.
- **Décoloration** : immersion dans la solution de décoloration.



***Valorisation
scientifique***

Valorisation scientifique

Une partie de ce travail a fait l'objet de la valorisation suivante :

➤ **Communications internationales :**

ADDAR L., ISSELNANE S., SI AHMED ZENNIA S. et MATI A. (2016). Séparation chromatographique et caractérisation électrophorétique des caséines alpha S du lait de dromadaire (*Camelus dromaderius*) collecté dans les régions de M'Sila et Laghouat (Algérie). *Fourth Scientific Days in Agrifood (SDAF-2016)*, 20-23 mars, Sousse, Tunisie

(<http://www.amiaa.org/index.php/congres/jsaa-2016>)

ADDAR L., ADT I., DEGREAVE P. et MATI A (2017). Activité antibactérienne de la caséine alpha-s du lait de dromadaire et de ses fractions d'hydrolyse pepsique, *3ème MGIBR Workshop International « Le lait : Production, Conservation et Valorisation »*, 20 novembre 2017, Tlemcen

➤ **Publication internationale :**

ADDAR L., BENSOUICI C., SI AHMED ZENNIA S., BOUDJENAH HAROUN S and MATI A., (2019). Antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities of camel α S-casein and its hydrolysate fractions. *Small Ruminant Research*, 173, 30–35.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448818309829?via%3Dihub>)



Antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities of camel α S-casein and its hydrolysate fractions

Lydia Addar^{a,*}, Chawki Bensouici^b, Saliha Si Ahmed Zennia^a, Saliha Boudjenah Haroun^c, Abderrahmane Mati^a

^a Mouloud Mammeri University, Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology (LABAB), 15000 Tizi Ouzou, Algeria

^b Biotechnology Research Center, P.B E73/UV N° 03 Ali Mendjeli New Town, Constantine, Algeria

^c Kasdi Merbah University, Laboratory for the Protection of Ecosystems in Arid and Semi-Arid Zones, 30000 Ouargla, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Camel milk
 α S-casein
 Pancreatic hydrolysis
 Antioxidant activity
 Tyrosinase inhibitory activity
 Urease inhibitory activity

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of pancreatic enzymes hydrolysis of camel α S-casein on their antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities. Isolated α S-casein was hydrolyzed, fractionated and assayed for their antioxidant properties by using four complementary tests; namely, ABTS^{•+} scavenging, hydroxyl radical scavenging, ferrous ion chelating and β -carotene-linoleic acid assays. The *in vitro* enzymatic inhibitory activity was determined by using L-DOPA as a substrate and indophenol method for tyrosinase and urease inhibitory activity, respectively. After enzymatic hydrolysis, the activities were significantly increased whereas chymotryptic hydrolysis released peptides with higher activity than trypsin. The obtained fraction with low molecular weight (< 10 kDa) exhibited the highest antioxidant and enzymatic inhibitory activities. Results suggested that antioxidant properties of peptides affect their tyrosinase inhibitory activity. This study reveals that camel milk α S-casein is as a great candidate for incorporation into functional foods to help in preventing disorders caused by oxidative reactions in food and human body's.

1. Introduction

Milk proteins are an important and relatively inexpensive food source because of their quantitative and qualitative contribution. They meet the needs of the body and ensure the development of individuals.

Beyond this basic nutritional role, milk proteins are also sought for their techno-functional properties as well as their biological activities. These latter are mainly due to the peptides released from parent proteins (caseins and whey proteins) upon hydrolysis by different enzymes such as pepsin, trypsin and chymotrypsin.

The biological activities of milk proteins and peptides have been investigated by many researchers (Korhonen and Pihlanto, 2006; Brandelli et al., 2015; Nongonierma and FitzGerald, 2015). Recently, these activities have also researched on the proteins and peptides of camel milk in order to explore more their therapeutic potential and to find which components that would be at the origin of this effect (Mati et al., 2017).

Caseins are the main camel milk protein. Although several studies have indicated that camel milk casein-derived peptides display various bioactivities after enzymatic treatment such as antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activities (Salami et al., 2011; Jrad et al.,

2015; Kumar et al., 2016a, 2016b; Rahimi et al., 2016; Assem et al., 2017; Almi-Sebbane et al., 2018) little attention has been given to individual camel's milk caseins, particularly α S-casein (α S-CN).

Therefore, the aim of the present work was to investigate the effect of trypsin and chymotrypsin on α S-casein and its hydrolytic fractions for its liberating multifunctional peptide. The hydrolysates were evaluated for antioxidant, tyrosinase and urease inhibitory activities.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Camel milk was collected from a local healthy dromedary (*Camelus dromedarius*) in Laghouat, Algeria. All chemicals, reagents and enzymes are from Sigma-Aldrich. All the solutions prepared with double-distilled water were kept at 4 °C before use.

2.2. Camel casein preparation

Camel milk was warmed to 35 °C and skimmed immediately by centrifugation (4500 × g for 20 min at 4 °C). Caseins were precipitated

* Corresponding author.

E-mail address: addar.lydia90@gmail.com (L. Addar).

at pH 4.3 by 1 M HCl followed by centrifugation (4500 × g for 20 min at 4 °C). This step was repeated again and the caseins were washed three times with distilled water, and then neutralized with 1 M NaOH. Camel sodium caseinate was dialyzed for 72 h, lyophilized and stored at –20 °C until use.

2.3. Purification of camel αS-casein

Camel αS-CN was purified on an anion-exchange column (DEAE-cellulose) using Bio-Rad System Chromatography (Bio-Rad, Biologic LP, USA). One-half gram lyophilized powder of caseins was dissolved in 30 ml of 20 mM sodium acetate buffer (pH 6.6) containing 4 M urea, 35 mM ethylenediamine tetra acetic acid and 10 mM β-mercaptoethanol. After centrifugation at 20 000 × g for 40 min at 4 °C, the supernatant was mixed with DEAE-cellulose (pre-equilibrate with sodium acetate buffer) for 30 min at 4 °C. The mixture was loaded on column (1.5 × 15 cm) and followed first by a double wash with 100 ml of the sodium acetate buffer, then with 50 ml of the same buffer containing 1 M NaCl. The elution was followed by measuring absorbance at 280 nm under flow rate of 0.5 ml/min. The collected fractions were analyzed using Urea-PAGE and fractions containing more pure αS-CN were collected, dialyzed against distilled water, lyophilized and stored at –20 °C until use.

2.4. Urea-PAGE electrophoresis

Peaks collected from anion-exchange chromatography were analyzed by Urea-PAGE in discontinuous system as reported by [Medrano and Sharrow \(1989\)](#). The stacking gel contains (0.375 M Tris–HCl pH 6.8, 4 M urea, 4,6% polyacrylamide) and the separating gel contains (0.375 M Tris–HCl pH8.9, 4 M urea, 8% polyacrylamide). The electrophoresis was carried out using vertical gel slab cell (Hoefer Scientific Instruments, SE-200, USA).

2.5. Enzymatic hydrolysis

Camel αS-casein was hydrolyzed by trypsin and α-chymotrypsin according to the method of [Salami et al. \(2011\)](#). Briefly, αS-CN was dissolved in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8), and then each enzyme was added at an enzyme/substrate ratio of 1/100 (w/w). The mixture was carried out up to 2 h at 37 °C. After incubation, the enzyme action was stopped by heating at 85 °C for 15 min, and then the hydrolysates were centrifuged at 15 000 × g for 20 min. Supernatants were ultrafiltrated through UF membrane (Millipore corporation, Amicon Ultra-4, cutoff of 10 kDa, USA) for separating out low molecular weight (LMW) from high molecular weight (HMW) peptides. Crude hydrolysates, permeates and retentates were lyophilized and stored at -20 °C until further use.

2.6. Antioxidant activity assay

Due to the complex nature of antioxidants, there is no single technique for measuring the antioxidant activity. Therefore, the four complementary assays below are employed to evaluate the antioxidant activity of αS-CN and its hydrolysate fractions.

2.6.1. 2-2-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS⁺) radical scavenging assay

The scavenging activity against ABTS⁺ radical was determined according to the method of [Re et al. \(1999\)](#). BHA and BHT were used as antioxidant standards.

2.6.2. Hydroxyl radical scavenging assay

The scavenging activity against hydroxyl radical was evaluated according to [Smirnoff and Cumbe \(1989\)](#) method. Ascorbic acid was used as an antioxidant standard.

2.6.3. Ferrous ion chelating assay

The chelating activity of a ferrous ion was measured as reported by [Decker and Welch \(1990\)](#) with slight modifications according to [Öztürk et al. \(2011\)](#). EDTA was used as an antioxidant standard.

2.6.4. β-carotene/linoleic acid assay

The lipid peroxidation inhibition activity was evaluated using β-carotene/linoleic acid bleaching test system ([Marco, 1968](#)) with slight modifications according to [Öztürk et al. \(2011\)](#). BHA and BHT were used as antioxidant standards. The results of the above assays were given as 50 % inhibition concentrations (IC₅₀).

2.7. Enzymatic inhibitory activity assay

2.7.1. Tyrosinase inhibition assay

Tyrosinase enzyme inhibitory activity was measured spectrophotometrically using L-DOPA as substrate according to [Chan et al. \(2008\)](#) method, with slight modification. Phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) was mixed with 10 μL of sample and 20 μL of mushroom tyrosinase solution (150 U/ml). The mixture was shaken and incubated for 10 min at 37 °C. After incubation, 20 μL of L-DOPA (5 mM) was added. Absorbance was measured at 475 nm using a 96-well microplate reader (PerkinElmer, EnSpire Multimode Plate Reader, USA). Kojic acid was used as a standard inhibitor. The results were given as a percentage inhibition (%) of the enzyme at 200 μg/mL concentration of the tested compound. The tyrosinase inhibition activity was calculated using the following equation 1:

$$\text{Tyrosinase inhibition \%} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (1)$$

2.7.2. Urease inhibition assay

Urease inhibitory activity was determined by measuring ammonia production using the indophenol method as described by [Weatherburn \(1967\)](#). Briefly, the reaction mixture containing 25 μl of enzyme solution (Jack bean urease), 10 μl of the tested compound and 50 μl of urea solution was incubated at 30 °C for 15 min in 96-well plate. 45 μl of phenol reagent and 70 μl of alkali reagent were added to each well. After 50 min of incubation, the absorbance was measured at 630 nm using a 96-well microplate reader (PerkinElmer, EnSpire Multimode Plate Reader, USA). Thiourea was used as a standard inhibitor. The results were given as a percentage inhibition (%) of the enzyme at 200 μg/mL concentration of the tested compound. The urease inhibition activity was calculated using the following equation 2:

$$\text{Urease inhibition \%} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2)$$

2.8. Statistical analysis

The results were expressed as mean ± standard deviation (SD) for three replications. The significance of the differences between the values was determined with analysis of variance (ANOVA) using GraphPad Prism7.00. The differences were considered significant with $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Purification of camel αS-CN

The purification chromatogram and the electrophoresis control show that this method is suitable for separation of the αS-CN from the B-CN in one step without contamination. In comparing the electrophoresis profile obtained ([Fig. 1](#)) and the one reported by [Ochirkhuyag et al. \(1997\)](#), the fraction F2 mainly contains αS-CN (αS₁-CN and αS₂-CN). The αS₁-CN is presented in two bands corresponding to the

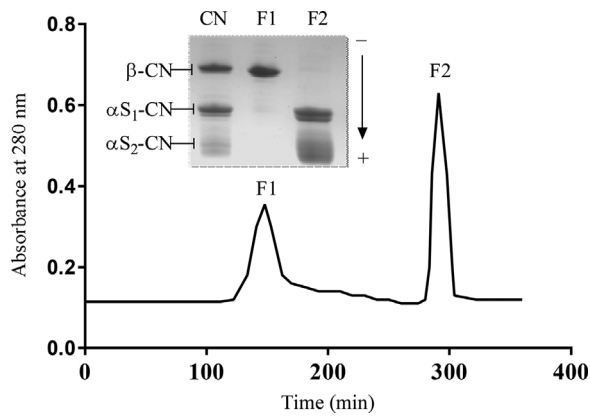


Fig. 1. Anion-exchange chromatography of α S-casein and Urea-PAGE electrophoresis of peaks (F1, F2) and camel sodium caseinate (CN). F1: camel β -casein, F2: camel α S-casein, α S₁-CN: alpha S₁-casein, α S₂-CN: alpha S₂-casein.

different phosphorylation variants probably α S₁-CN A and α S₁-CN B while the diffused band represents the α S₂-CN.

3.2. Antioxidant activity

According to the results obtained by ABTS assay, α S-CN showed a scavenging activity against ABTS⁺ radical before and after hydrolysis with the two enzymes (Table 1). Activity was significantly increased after hydrolysis and chymotryptic crude hydrolysate exhibited the highest activity with IC₅₀ value (IC₅₀ = 37.14 ± 0.06 µg/ml). The highest radical scavenging activity was recorded for the LMW peptides followed by the crude hydrolysates peptides in both enzymatic treatments. But the fraction of chymotryptic hydrolysis (CH) exhibited significantly higher scavenging activity (IC₅₀ = 23.66 ± 0.23 µg/ml) than tryptic hydrolysis (TH) (IC₅₀ = 44.76 ± 0.66 µg/ml).

Hydroxyl radical is the most reactive oxygen radical causing deterioration effects in food and damage in biomolecules. As shown in Table 1, both intact α S-CN and its hydrolysates fractions had the ability to scavenge the hydroxyl radical. The radical scavenging activity was increased significantly after hydrolysis and the highest activity was observed after CH. LMW fraction exhibited significantly higher inhibitory activity with IC₅₀ values (IC₅₀ = 93.58 ± 3.46 µg/ml) and (IC₅₀ = 350.89 ± 9.82 µg/ml) for CH and TH, respectively. Suetsuna et al. (2000) reported that bovine casein hydrolysates show a strong radical scavenging activity against DPPH, hydroxyl and superoxide radicals.

Ferrous ion is an important pro-oxidant metal of oxidative processes in food products. Their chelation helps to delay peroxidation and prevent food rancidity. The results present in Table 2 show that both intact α S-CN and its hydrolysates fractions had the ability to chelate ferrous

ion. This ability increased significantly after hydrolysis and the strongest activity was attributed for CH. Among the fraction of CH; the LMW fraction exhibited significantly the highest ferrous ion chelating activity with IC₅₀ value (IC₅₀ = 20.33 ± 1.83 µg/ml). In the case of TH, the HMW fraction which exhibited significantly the highest ferrous ion chelating activity with IC₅₀ value (IC₅₀ = 29.01 ± 0.19 µg/ml). The α S-CN is the most phosphorylated camel casein (6 phosphoserine residues in α S₁-CN sequences and 9 phosphoserine residues in α S₂-CN sequences), suggesting that chelating activity of α S-CN could be attributed to their potential phosphopeptide.

Uncontrolled lipid oxidation in food not only deteriorates the quality of food but also may cause chronic diseases to consumers due to toxic reaction products. As shown in Table 2, the oxidation of linoleic acid was significantly inhibited by the addition of α S-CN and its hydrolysate fractions. The inhibition was increased significantly after hydrolysis and the highest significantly inhibition was noted for chymotryptic crude hydrolysate. After fractionation statically no significant difference showed between crude hydrolysates and its fractions. However, chymotryptic LMW fraction peptides exhibited significantly the highest inhibition with IC₅₀ value (IC₅₀ = 2.90 ± 0.20 µg/ml). It seems that the inhibition of lipid peroxidation by α S-CN may be due to free radical scavenging activity of peptides. This finding is in good agreement with the finding of Díaz and Decker (2004) who reported that the oxidation of lipid is not uniquely attributed to chelating metals by phosphoserine residues but also to scavenging free radical. Hartmann and Meisel (2007) indicated that the most peptides inhibited enzymatic and non-enzymatic peroxidation of essential fatty acids are derived from α S-casein. Several studies demonstrated the ability of milk protein and peptides to inhibit lipid oxidation in food products (Díaz and Decker, 2004).

To our knowledge, this is the first study to investigate the antioxidant properties of camel α S-CN and its hydrolysate fractions. The different assays confirmed that camel α S-CN encrypt in their sequence peptides with potent antioxidant activity. It suggested that limited pancreatic hydrolysis improves the antioxidant activity of camel α S-casein. The increase in antioxidant activity can be explained by better accessibility to antioxidant amino acids after hydrolysis. The results show also that the CH exhibited higher antioxidant activity than the TH. These results are in agreement with previous findings of Salami et al. (2011), Kumar et al. (2016a, 2016b) and Assem et al. (2017) who reported highest antioxidant activity of camel β -CN and total camel casein hydrolysates after α -chymotryptic digestion. Chymotrypsin cleaves protein after the hydrophobic and aromatic amino acids at the C-terminus position generated hydrophobic peptides (Pihlanto, 2006). In contrast, trypsin has specificity toward arginine and lysine generated hydrophilic peptides (Antal et al., 2001). This result shows the importance of the C-terminal amino acids of the peptide and the specificity enzyme target in determining the antioxidant properties of the peptide. Li et al. (2011) reported that N- and C-terminal amino acids of

Table 1
ABTS and hydroxyl radical scavenging activities of α S-casein and its hydrolysate fractions (mean ± SD).

Fractions	ABTS assay IC ₅₀ (µg/ml)		Hydroxyl radical assay IC ₅₀ (µg/ml)	
	TH	CH	TH	CH
Un-hydrolyzed	95.40 ± 0.96 ^{aA}	95.40 ± 0.96 ^{aA}	> 1000 ^A	> 1000 ^A
Crude hydrolysates	59.88 ± 0.00 ^{aB}	37.14 ± 0.06 ^{bB}	948.08 ± 2.20 ^{aB}	407.18 ± 4.33 ^{bB}
HMW	66.99 ± 0.79 ^{aC}	43.62 ± 0.30 ^{bC}	1230.0 ± 2.83 ^{aC}	494.75 ± 14.58 ^{bC}
LMW	44.76 ± 0.66 ^{aD}	23.66 ± 0.23 ^{bD}	350.89 ± 9.82 ^{aD}	93.58 ± 3.46 ^{bD}
BHT	1.29 ± 0.30 ^E		NT	
BHA	1.81 ± 0.10 ^E		NT	
Ascorbic acid	NT		13.86 ± 0.47 ^E	

Small letters indicate significant difference in rows ($P < 0.05$). Capital letters indicate significant difference in columns ($P < 0.05$) for each assay separately. BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene; NT: not tested; LMW: low molecular weight fraction (< 10 kDa); HMW: high molecular weight fraction (> 10 kDa); TH: tryptic hydrolysis; CH: chymotryptic hydrolysis.

Table 2
Ferrous ions chelating and lipid oxidation activities of α S-casein and its hydrolysate fractions (mean \pm SD).

Fractions	Ferrous chelating ion assay IC ₅₀ (μ g/ml)		β -Carotene-linoleic acid assay IC ₅₀ (μ g/ml)	
	TH	CH	TH	CH
Un-hydrolyzed	237.5 \pm 0.72 ^{aA}	237.5 \pm 0.72 ^{aA}	8.81 \pm 0.00 ^{aA}	8.81 \pm 0.00 ^{aA}
Crude f	36.74 \pm 1.33 ^{aB}	28.77 \pm 0.39 ^{bB}	3.49 \pm 0.19 ^{aB}	3.04 \pm 0.06 ^{bB}
HMW	29.01 \pm 0.19 ^{aC}	30.60 \pm 1.37 ^{aB}	3.17 \pm 0.33 ^{aB}	3.13 \pm 0.02 ^{aB}
LMW	33.80 \pm 0.59 ^{aD}	20.33 \pm 1.83 ^{bD}	3.66 \pm 0.59 ^{aB}	2.90 \pm 0.20 ^{bB}
BHT	NT		1.05 \pm 0.01 ^E	
BHA	NT		0.90 \pm 0.02 ^E	
EDTA	8.80 \pm 0.47 ^E		NT	

Small letters indicate significant difference in rows ($P < 0.05$). Capital letters indicate significant difference in columns ($P < 0.05$) for each assay separately.

NT: not tested; BHA: butylated hydroxyanisole; BHT: butylated hydroxytoluene; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; LMW: low molecular weight fraction (< 10 kDa); HMW: high molecular weight fraction (> 10 kDa); TH: tryptic hydrolysis; CH: chymotryptic hydrolysis.

the peptide are as a predictor of antioxidant activity. In addition the presence of phosphate groups and specific amino acids determine the antioxidant activity.

These results clearly demonstrate that ultrafiltration of crude hydrolysates concentrate the peptides with higher antioxidant activity. The highest antioxidant activities were obtained for LMW peptides (< 10 kDa), suggesting that antioxidant activity depends on the size of the peptides. Kumar et al. (2016b) and Salami et al. (2011) reported that the highest antioxidant activity of camel milk casein hydrolysates was recorded for the peptides with molecular weight distribution ranged between 5 and 10 kDa. It has been suggested that oxidative peptides from milk are generally short (< 11 amino acids) and contain hydrophobic residues (Pro, His, Try and Trp) (Pihlanto, 2006). The use of ultrafiltration system post-hydrolysis seems to be an interesting technique for the enrichment of peptides with a specific molecular weight range. It is relatively less costly than the chromatographic techniques and is easily up-scaled (Bhat et al., 2015).

3.3. Enzymatic inhibitory activity

3.3.1. Tyrosinase inhibitory activity

The inhibitory effect of α S-CN and its hydrolysate fractions on tyrosinase activity are presented in Fig. 2. It can be seen that the tyrosinase inhibitory activity of α S-CN increased after hydrolysis and the better activity was shown with CH (51.21 \pm 0.49%). After size-fractionation an increase in inhibitory activity was reported only for TH and the highest activity was attributed for the LMW peptides (32.02 \pm 1.90%). However, in the case of CH the fractionation decreases the inhibitory activity of crude hydrolysate. This may be attributed to the synergistic effect of the different nature of peptides in the mixture. But, the highest inhibition was recorded for the chymotryptic LMW fraction

(39.26 \pm 0.89%). It is clear that the size of the peptides affects the activity. Results showed that chymotrypsin generates peptides with better tyrosinase inhibitory activity than trypsin. This result suggests the importance of hydrophobic and aromatic amino acids at the C-terminus position of the peptide. This result agrees with Schurink et al. (2007) who demonstrated that the strong tyrosinase inhibiting peptide are hydrophobic contain Val, Ala and/or Leu residues and usually have a combination of Arg and/or Phe with Val, Ala and/or Leu. Previous studies demonstrated that milk protein such as κ -casein and β -lactoglobulin suppressed melanogenesis in cultured human melanocyte by inhibition of tyrosinase activity (Nakajima et al., 1996, 1997).

It seems that peptides with strong antioxidant activity exhibited also strong tyrosinase inhibitory activity, suggesting a relationship between antioxidant effect and tyrosinase inhibitory activity. This result concurs with Masuda et al. (2005) who reported that some tyrosinase inhibitors have strong antioxidant activity, indicating that a strong antioxidant might also have strong tyrosinase activity.

3.3.2. Urease inhibitory activity

As shown in Fig. 3, α S-CN, crude hydrolysates and hydrolysate fractions inhibit urease activity. This inhibition was slightly increased after TH, but decreased significantly after CH. After size-fractionation, the inhibitory activity was increased and the highest inhibition was recorded to tryptic fractions (37.42 \pm 1.21%) and (37.24 \pm 0.84%) for HMW and LMW fractions, respectively. It is clear that the nature of the enzyme and the size of the peptide affect the inhibitory activity. Krajewska (2009) reported that the presence of hydroxyl, imidazole, amide or phosphate groups plays an important role in inhibiting urease activity. This suggests that the inhibitory capacity of peptides may be attributed to the presence of hydroxyl amino acids (Met and Ser), amide amino acids (Gln and Asn) and phosphoserine residues. Potent inhibitors

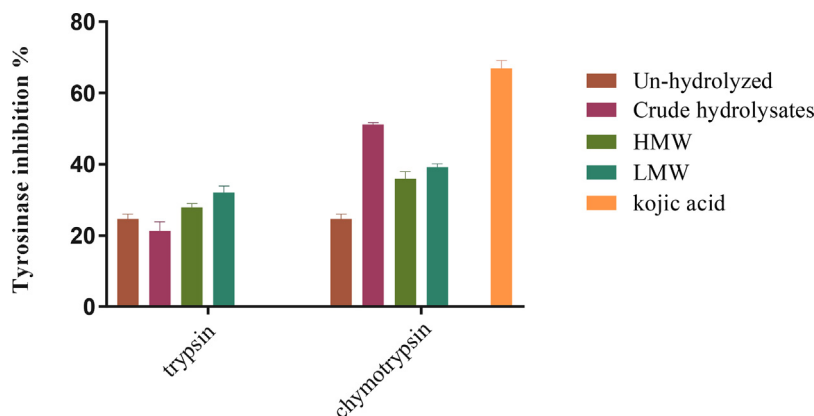


Fig. 2. Tyrosinase inhibitory activity of α S-casein and its hydrolysate fractions at 200 μ g/ml. HMW: high molecular weight fraction (> 10 kDa); LMW: low molecular weight fraction (< 10 kDa).

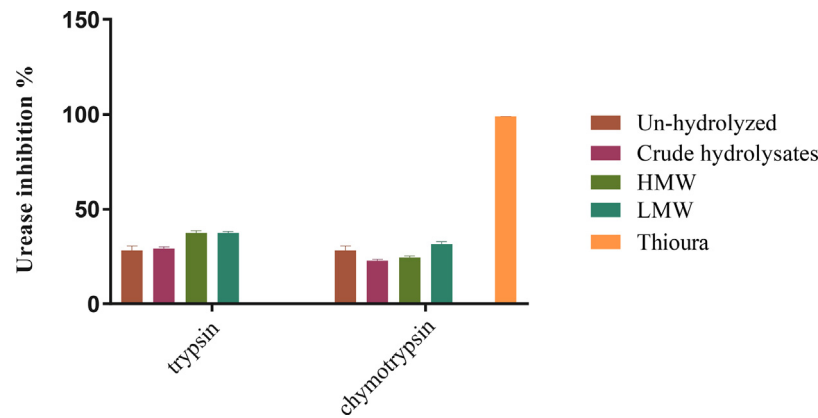


Fig. 3. Urease inhibitory activity of α S-casein and its hydrolysate fractions at 200 μ g/ml. HMW: high molecular weight fraction (> 10 kDa); LMW: low molecular weight fraction (< 10 kDa).

can be derived from amino acids such as phenylalanine, alanine, serine, glycine, histidine, threonine and arginine (Kobashi et al., 1975). It also suggests that the amino acid composition, load and hydrophobicity affect the inhibitory activity. Several urease inhibitors have been isolated from plants (Modolo et al., 2015) while a lack of literature reports the effect and the mechanism of inhibition of the urease activity of peptides.

On the other hand, compared to the most synthetic antioxidant and inhibitor standards; camel α S-CN derived peptides showed the lowest activity. This can be attributed to the presence of different nature of peptides in the hydrolysate, to the peptide-peptide interactions and to the dilution of peptide in the mixture. In contrast, the synthetic ones are pure (Srinivas and Prakash, 2009). However, the advantage of the peptides is that can be used at a higher concentration than the synthetic ones, due to their very restrictive toxicological parameters. In addition, their incorporation into foods could confer desirable nutritional and functional properties (Kim et al., 2007). The results suggest that the use of trypsin and chymotrypsin as the hydrolyzing enzymes could be a suitable approach to generate bioactive peptides from α S-caseins. Enzymatic hydrolysis is preferred to produce milk bioactive peptides, especially in food and pharmaceutical applications, due to the lack of residual organic solvents or toxic substances in the final product (De Castro and Sato, 2015). However, the application of enzyme can increase the cost of process. This investigation contributes to explain the traditional use of camel milk to treat and prevent different diseases such as ulcer, skin diseases and cancer.

4. Conclusion

Based on the results, it can be concluded that pancreatic enzymes hydrolysis improves the biological properties of camel milk α S-casein and each activity depends on the enzyme used, the composition and the size of the peptide. These findings demonstrate that α S-casein and its derived peptides are able to inhibit the oxidative reactions by chelating iron, scavenging free radicals and inhibiting lipid peroxidation as well as the tyrosinase and urease activities. Further works are needed to isolate and identify the bioactive peptides from α S-casein hydrolysates to explore their potential therapeutic effects and their mechanisms of action in more details. Camel milk α S-casein and its hydrolysates may be used as food ingredients for enhancing its functionalities and shelf life. Camel α S-casein may be a source of multifunctional peptides.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr Ouelhadj for their kind help with English.

References

- Almi-Sebbane, D., Adt, I., Degraeve, P., Jardin, J., Bettler, E., Terreux, R., Mati, A., 2018. Casein-like anti-bacterial peptides in peptic hydrolysate of camel milk β -casein. *Int. Dairy J.* 86, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.016>.
- Antal, J., Pál, G., Asbóth, B., Buzás, Z., Patthy, A., Gráf, L., 2001. Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Anal. Biochem.* 288, 156–167. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4886>.
- Assem, F.M., Abd El-Gawad, M.A.M., Kassem, J.M., Abd El-Salam, M.H., 2017. Proteolytic and antioxidant activity of peptic, tryptic and chymotryptic hydrolysates of cow, buffalo, goat and camel caseins. *Int. J. Dairy Technol.* 71, 236–242. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12400>.
- Bhat, Z.F., Kumar, S., Bhat, H.F., 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52, 5377–5392. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73, 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, L.F., Lianto, F.S., Wong, S.K., Lim, K.K., Joe, C.E., Lim, T.Y., 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chem.* 109, 477–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.016>.
- De Castro, R.J.S., Sato, H.H., 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Res. Int.* 74, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.013>.
- Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.* 38, 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>.
- Díaz, M., Decker, E.A., 2004. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem.* 52, 8208–8213. <https://doi.org/10.1021/jf048869e>.
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>.
- Jrad, Z., El Hatmi, H., Adt, I., Khorchani, T., Degraeve, P., Oulahal, N., 2015. Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria* 44, 609–616. <https://doi.org/10.1556/066.2015.44.0034>.
- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., Kim, S.-K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J. Nutr. Biochem.* 18, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.02.006>.
- Kobashi, K., Takebe, S., Terashima, N., Hase, J., 1975. Inhibition of urease activity by hydroxamic acid derivatives of amino acids. *J. Biochem.* 77, 837–843. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130>.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.
- Krajewska, B., 2009. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 59, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.01.003>.
- Kumar, D., Chatli, M.K., Singh, R., Mehta, N., Kumar, P., 2016a. Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Sci. Technol.* 96, 391–404. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0275-9>.
- Kumar, D., Chatli, M.K., Singh, R., Mehta, N., Kumar, P., 2016b. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Rumin. Res.* 139, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.05.002>.
- Li, Y.-W., Li, B., He, J., Qian, P., 2011. Structure-activity relationship study of anti-oxidative peptides by QSAR modeling: the amino acid next to C-terminus affects the

- activity. *J. Pept. Sci.* 17, 454–462. <https://doi.org/10.1002/psc.1345>.
- Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45, 594–598. <https://doi.org/10.1007/bf02668958>.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S., 2005. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 197–201. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>.
- Mati, A., Senoussi-Ghezali, C., Si Ahmed Zennia, S., Almi-Sebbane, D., El-Hatmi, H., Girardet, J.-M., 2017. Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities—a review. *Int. Dairy J.* 73, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.001>.
- Medrano, J.F., Sharrow, L., 1989. Milk Protein typing of bovine mammary gland tissue used to generate a complementary deoxyribonucleic acid library. *J. Dairy Sci.* 72, 3190–3196. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79477-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79477-7).
- Modolo, L.V., de Souza, A.X., Horta, L.P., Araujo, D.P., de Fátima, Â., 2015. An overview on the potential of natural products as ureases inhibitors: a review. *J. Adv. Res.* 6, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.09.001>.
- Nakajima, M., Shinoda, I., Jima, Y.S., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., Hayasawa, H., 1996. K-casein suppresses melanogenesis in cultured pigment cells. *Pigment Cell Res.* 9, 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1996.tb00112.x>.
- Nakajima, M., Shinoda, I., Mikogami, T., Iwamoto, H., Hashimoto, S.-I., Miyauchi, H., Fukuwatari, Y., Hayasawa, H., 1997. β -Lactoglobulin suppresses melanogenesis in cultured human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 10, 410–413. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1997.tb00700.x>.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2015. Bioactive properties of milk proteins in humans: a review. *Peptides* 73, 20–34. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.08.009>.
- Ochirkhuyag, B., Chobert, J.M., Dalgallarrondo, M., Choiset, Y., Haertlé, T., 1997. Characterization of caseins from Mongolian yak, Khainak, and Bactrian camel. *Le Lait* 77, 601–613. <https://doi.org/10.1051/lait:1997543>.
- Öztürk, M., Duru, M.E., Kivrak, Ş., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A., Özler, M.A., 2011. In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1353–1360. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.019>.
- Pihlanto, A., 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16, 1306–1314. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.005>.
- Rahimi, M., Ghaffari, S.M., Salami, M., Mousavy, S.J., Niasari-Naslaji, A., Jahanbani, R., Yousefinejad, S., Khalesi, M., Moosavi-Movahedi, A.A., 2016. ACE- inhibitory and radical scavenging activities of bioactive peptides obtained from camel milk casein hydrolysis with proteinase K. *Dairy Sci. Technol.* 96, 489–499. <https://doi.org/10.1007/s13594-016-0283-4>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A., Moosavi-Movahedi, F., Ehsani, M.R., Yousefi, R., Farhadi, M., Niasari-Naslaji, A., Saboury, A.A., Haertlé, T., 2011. Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *J. Dairy Res.* 78, 471–478. <https://doi.org/10.1017/s0022029911000628>.
- Schurink, M., van Berkel, W.J.H., Wichers, H.J., Boeriu, C.G., 2007. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides* 28, 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>.
- Smirnov, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7).
- Srinivas, S., Prakash, V., 2009. Bioactive peptides from bovine milk α -Casein: isolation, characterization and multifunctional properties. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 16, 7–15. <https://doi.org/10.1007/s10989-009-9196-x>.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* 11, 128–131. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(99\)00083-2](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(99)00083-2).
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974. <https://doi.org/10.1021/ac60252a045>.