REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MEMMERI DE TIZI OUZOU, ALGERIE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Thème

Etude de la caséine béta du lait de dromadaire collecté dans le sud algérien : isolement, caractérisation et recherche de molécules bioactives

Présentée par: Almi-Sebbane Dalila

devant le jury :

Président :	**Mr Houali K.**	**Professeur**	**UMMTO**
Directeur de thèse :	**Mr Mati A.**	**Professeur**	**UMMTO**
Examinateurs :	**Mr Boumendjel M.**	**M.C.A**	**UBM Annaba**
	Mr Khenchouche A.	**M.C.A**	**UFA Sétif**
	Mr Cherifi F.	**M.C.A**	**USTHB**
	Mr Bouazza B.	**M.C.A**	**UMMTO**

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le **bon Dieu**, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;
elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries.
Marcel Proust

Au terme de cette thèse, je tiens vivement à remercier toutes les personnes, qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont accompagné tout au long de ce parcours. Ce travail de recherche n'aurait pu arriver à sa fin sans le soutien, la confiance et la patience dont elles ont fait preuve à mon égard.

Mes premiers remerciements s'adressent à mon directeur de thèse **M^r^ MATI Abderrahmane**, professeur en Biochimie Appliquée à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris.

Je remercie chaleureusement **M^r^ HOUALI Karim,** professeur à l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, de l'honneur qu'il me fait de siéger à ce jury de cette thèse, et en acceptant de présider cette thèse et de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier également les membres du jury d'avoir accepté de juger et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer :

- **M^r^ KHENCHOUCHE Abdelhalim**, maître de conférences de classe A, à l'université Ferhat Abbas Sétif1.
- M^r^ **CHERIFI Fatah**, maître de conférences de classe B, à l'université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger.
- **Mr BOUMENDJEL Mahieddine**, maître de conférences de classe A, à l'université Badji-Mokhtar Annaba.
- **M^r^ BOUAZZA Belaid,** maître de conférences de classe A, à l'université Mouloud Memmeri de Tizi Ouzou.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et 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. Ses conseils, ses orientations et sa patience pour mener à bien ce travail, m'ont été précieux.

Je remercie également **M^me^ 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 **M^me^ 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. Je la remercie également pour la confiance qu'elle m'a témoignée et pour tous ses conseils et remarques constructives. Elle peut être assurée de mon sincère respect et de ma profonde gratitude.

Je tiens également à remercier M^me^ **Lynda BOUARAB Chibane**, doctorante au laboratoire BioDyMIA IUT Lyon1, pour sa gentillesse, sa disponibilité et surtout de m'avoir permis de réaliser la partie « analyses microbiologiques» dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie **M^r^ JULIEN Jardin** de la plateforme d'analyse protéomique du laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO, Rennes) pour les analyses en LC-MS/MS.

Mes remerciements vont également à **M^r^ Emmanuel BETTLER**, **M^r^ Raphaël TERREUX**, membres du pôle PRABI (LBTI, Lyon) pour la réalisation de la partie modélisation.

Je remercie également **M^r^ METNA B,** maître assistant à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour son aide dans la partie statistique.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont également fait bénéficier de leurs conseils et de leurs expériences au sein du Laboratoire de Biochimie Appliquée et Biotechnologies : **Chahra**, **Nassima**, **Samia**, **Lamia**, **Sarah**, **Hassina**, **Hamida**, **Assia**, **Amel**, **Djouza**, **Souad**, pour lesquels je ne trouve pas les mots justes pour décrire ce que j'éprouve envers eux après ces années passées ensemble. J'ai beaucoup apprécié leurs qualités humaines et les échanges scientifiques que nous avons eus et leurs encouragements.

Mes remerciements vont aussi à ma très chère famille qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Je remercie chaleureusement mon mari, Hillal, pour la grande patience, l'encouragement et la confiance. Je tiens à le remercier surtout pour son soutien moral ininterrompu et ses nombreux conseils tout le long de ma thèse.

Grand MERCI à tous

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures
Liste des tableaux
Résumé
Introduction générale ……... 01
I. Synthèse des données bibliographiques
1.1. Aperçu sur le lait de dromadaire « *Camelus domedarius* »……... 03
1.1.1. Propriétés physico-chimiques…… 03
1.1.2. Composition et valeur nutritionnelle…….. 04
1.1.3. Valeurs thérapeutiques……..... 04
1.2. Le système protéique du lait.…… 07
1.2.1. Les protéines sériques……..... 07
1.2.2. Les caséines…… 07
1.2.2.1. Caractéristiques générales…..…… 09
1.2.2.2. Utilisations industrielles……..... 10
1.3. Caractéristiques de la caséine β.....…..……..... 12
1.3.1. Abondance dans le lait……..... 12
1.3.2. Structure moléculaire…….…….... 12
1.3.2.1. Gène de la β-CN…… 12
1.3.2.2. Structure et caractéristiques moléculaires……..... 13
1.3.3. Les peptides bioactifs issus de β-CN……..... 17
1.3.3.1. Peptides à activité antimicrobienne.…… 17
1.3.3.2. Peptides à activité opiacée……..... 18
1.3.3.3. Peptides à activité hypertensive …… 19
1.3.3.4. Peptides à activité immuno-modulatrice…….. 20
1.3.3.5. Peptides à activité antioxydante…… 20

II. Matériel & Méthodes
2.1. Matériel……..... 22
2.1.1 Matériel biologique…… 22
2.1.1.1. Lait de dromadaire…… 22
2.1.1.2. Enzymes et protéines étalons…….. 22
2.1.2 Produits et réactifs..…… 22
2.1.3 Appareillage…...……..... 23
2.1.3.1 Appareillage utilisé au laboratoire LABAB-UMMTO…… 23
2.1.3.2 Appareillage utilisé au laboratoire de BioDymia, France……... 24
2.1.3.3 Appareillage utilisé au laboratoire STLO Science et technologie du lait et de l'œuf, INRA-AgroCampus, Rennes, France……... 25
2.1.3.4 Appareillage utilisé au laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Lyon, France…….. 25
2.2. Méthodes
2.2.1. Mesure du pH…… 25
2.2.2. Dosage des protéines……..... 25
2.2.3. Isolement des caséines totales……. 26
2.2.4. Analyse par Chromatographique Liquide Haute Performance en phase inverse….. 26
2.2.5. Purification de la β-caséine cameline…… 28
2.2.5.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose…….. 28
2.2.5.2. Chromatographie liquide rapide des protéines…….. 28
2.2.6. Méthodes électrophorétiques……. 29

2.2.6.1. Principe…….…… 29
2.2.6.2. Mode d'utilisation ……..... 29
2.2.6.2.1. PAGE-SDS…….. 29
2.2.6.2.2. PAGE-urée…….. 30
2.2.7. Hydrolyse des caséines camelines totales et la β-caséine par les protéases digestives…… 30
2.2.8. Fractionnement de l'hydrolysat pepsique de la β-caséine…… 31
2.2.9. Détermination de degré d'hydrolyse par la méthode de l'acide trinitrobenzène sulfonique…… 32
2.2.10. Détermination de l'activité antioxydante…….. 33
2.2.11. Détermination de l'activité réductrice…… 34
2.2.12. Détermination de l'activité antibactérienne…… 34
2.2.13. Analyse des peptides par spectrométrie de masse en tandem à ionisation Nano-electrospray couplée à la Chromatographie liquide (HPLC/nESI-MS/MS)…….... 36
2.2.14. Modélisation de la structure des peptides et simulation dynamique moléculaire..... 37
2.2.15. Analyse statistique……..... 37

III. Résultats et discussion

Chapitre 1 : Isolement, purification et caractérisation des caséines totales et de la β-caséine

3.1.1. Isolement des caséines totales……..... 37
3.1.1.1. Caractérisations du lait collecté……..... 37
3.1.1.1.1. Mesure du pH…… 37
3.1.1.1.2. Dosage des protéines…… 37
3.1.1.2. Précipitation à pH isoélectrique……..... 38
3.1.2. Isolement de la β-caséine…… 39
3.1.2.1. Chromatographie sur DEAE Cellulose en basse pression……..... 39
3.1.2.2. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)……..….. 40
3.1.2.3. Détermination du poids moléculaire de la β-caséine cameline……. 43
3.1.3. Sensibilité des caséines à l'hydrolyse enzymatique……..... 44
3.1.3.1 Action des enzymes digestives sur les caséines totales…….. 44
3.1.3.2. Degré d'hydrolyse de la β-caséine cameline……. 47
3.1.3.3. Sensibilité de la β-caséine à l'action de la trypsine, chymotrypsine et pepsine.... 48

Chapitre 2 : Activités biologiques de la β-caséine cameline

3.2.1. Activité antioxydante……... 51
3.2.1.1 Test du DPPH ……..... 51
3.2.1.1.1. Effet sur les caséines totales et leurs hydrolysats……... 51
3.2.1.1.2. Effet sur la β-caséine et ses hydrolysats……... 52
3.2.1.2 Activité réductrice du fer …… 54
3.2.2. Activité antibactérienne de la β-caséine cameline et de son hydrolysat pepsique….. 55
3.2.2.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne…… 55
3.2.2.2. Identification des peptides actifs issus de l'hydrolysat pepsique de la β-caséine. 61
3.2.2.3. Modélisation du fragment (193-204) de la β-caséine cameline……. 63
Conclusion…….. 65
Références bibliographiques……..... 67

Liste des abréviations

a.a : acide aminé
α-CN : α-caséine alpha
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ATCC: "American Type Culture Collection"
atm : atmosphère
BSA : l'albumine sérique Bovine
β-CN : β-caséine
C : Rapport (%) : (bisacrylamide/acrylamide)
Ca/CN : calcium / caséine
CN : caséine
Da : Dalton
DEAE : diéthylaminoéthyl
DH : degré d'hydrolyse
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
E/S : rapport enzyme/substrat
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine
EMBL : Laboratoire de Biologie Moléculaire Européen
FPLC : chromatographie liquide rapide des protéines
HPLC : chromatographie liquide de haute performance
κ-CN : κ-caséine
K : Kelvin
LABAB : Laboratoire de Biochimie Analytique et et Biotechnologies, UMMTO
M : molaire
mA : milliampère
MM : masse moléculaire
mm : millimètre
mn : minute
MS : spectrométrie de masse
nm : nanomètre
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PM : poids moléculaire
Prm : perméat recueilli après ultrafiltration
Rt1 : rétentat 1 recueilli après ultrafiltration
Rt2 : rétentat 2 recueilli après ultrafiltration
SDS : dodécyl sulfate de sodium
T : rapport (%) : (acrylamide + bisacrylamide) / volume du gel
TEMD : N, N, N', N'-tetraméthyl-éthylènediamine
TCA : acide trichloracétique
TFA : acide trifluoroacétique
Tris : Tris-hydroxy-methyl-amino-méthane
UI : unité internationale
UFC : unités formant colonies
UV: Ultra-Violet
V/V: Volume par volume

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Modèle de micelle (A), de la submicelle de caséines (B)	**8**
2	Représentation schématique du gène *CSN2* de la β-caséine cameline et bovine	**12**
3	Comparaison de séquences de signal peptides de la β-caséine cameline et bovine	**13**
4	Séquence primaire de la β-caséine cameline (Kappeler *et al.,* 1998)	**13**
5	Comparaison de séquences de caséine β bovine et cameline.	**14**
6	Unité de chromatographie liquide de haute performance (HPLC).	**23**
7	Unité de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)	**24**
8	Eléments composant l'unité de filtration Amicon® et Bioscreen®	**24**
9	Schéma d'un spectromètre de masse couplé à un système HPLC.	**25**
10	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry	**26**
11	Etapes suivies pour l'isolement des caséines du lait	**27**
12	Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS	**30**
13	Schéma de fractionnement de l'hydrolysat pepsique de la β-CN	**31**
14	Réaction du T.N.B.S. avec un groupement α-aminé	**32**
15	Courbe d'étalonnage du dosage des groupements amines libres	**33**
16	Réaction du DPPH avec un antioxydant	**33**
17	Schématisation d'un spectromètre de masse en tandem	**36**
18	Electrophorégramme des caséines camelines et bovines. A : PAGE-SDS, B : PAGE-Urée	**39**
19	Electrophorégramme des fractions collectées après séparation des caséines camelines par chromatographie sur DEAE-cellulose. A) : PAGE-urée ; B : PAGE-SDS .	**40**
20	Chromatogramme FPLC des caséines du lait camelin sur colonne Q-sépharose	**41**
21	Electrophorégramme en PAGE-urée des deux fractions issues de la chromatographie sur Q-sépharose (FPLC)	**42**
22	Chromatogramme en RP HPLC des fractions des caséines camelines obtenues par FPLC sur Q-Sépharose.	**43**
23	Electrophorégramme de la β-CN camelines en PAGE-SDS	**44**
24	Electrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats des caséines camelines	**46**
25	Chromatogramme en RP-HPLC (colonne C8) des hydrolysats des caséines camelines	**47**
26	Electrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action de diverses protéases sur la beta caséine cameline	**50**
27	Chromatogramme de l'hydrolyse de la β-caséine du lait de chamelle par les protéases digestives en RP-HPLC.	**51**
28	Activité antiradicalaire (% inhibition du DPPH) en présence d'hydrolysats de la β-caséine cameline	**54**
29	Pouvoir réducteur des hydrolysats de la β-caséine cameline	**56**
30	Courbes de croissance de *Staphyloccocus aureus* CNRZ3, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Listeria innocua* ATCC 33090 en présence de la β-CN et ses hydrolysats	**57**
31	Alignement des séquences des casécidines 15 et 17 du colostrum bovin avec les peptides f (193-204) et f (193-213) de la β-CN du lait camelin	**64**
32	Modèle d'homologie du fragment (193-204) de la β-caséine cameline à partir de la structure 4O6J PDB	**64**

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Concentration moyenne comparées en vitamines (C et B3) et en potassium du lait de dromadaire et du lait de vache (mg/mL)	**4**
II	Composition du lait de différentes espèces (%) (Al Haj et Al-Kanhal, 2010)	**4**
III	Teneurs en protéines sériques dans lait camelin, bovin et humain	**7**
IV	Caractéristiques physicochimiques des caséines camelines et bovines	**9**
V	Produits commerciaux et ingrédients à base de caséines avec allégations santé ou fonctionnelles contenant des peptides bioactifs (Phelan, 2009 ; Carrasco-Castilla *et al*., 2012 ; Dziuba B et Dziuba M (2014)	**11**
VI	Répétions courtes en tandem de la β-caséine cameline (Ashiq, 1993).	**15**
VII	Profil d'acide aminé de la β-CN du lait chamelle (Majaheim) et du lait de vache (g acide aminé / 100 g de protéine) (Salmen *et al*., 2012)	**16**
VIII	Comparaison des β-casomorphines du lait de différentes espèces avec le prédictif β-casomorphine de la caséine β cameline (Ashiq, 1993).	**18**
IX	Peptides opioïdes de la β-caséine de différentes espèces (Ashiq, 1993)	**19**
X	Comparaison de fragment contenant de la proline alternée de la β-CN cameline avec les peptides inhibiteurs de l'ACE-1 de β-CN de différentes sources (Ashiq, 1993).	**20**
XI	Comparaison du segment de β-CN cameline avec des peptides immunostimulants de la β-CN humaine et bovine (Ashiq, 1993).	**20**
XII	Teneurs moyennes des protéines du lait de chamelle et de vache (g/L)	**37**
XIII	Masse moléculaire (kDa) de la β-caséine mesurée en PAGE-SDS comparée avec quelques données bibliographiques	**43**
XIV	Le degré d'hydrolyse des hydrolysats trypsique, pepsique et chymotrypsique de la β-CN cameline	**47**
XV	Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les caséines camelines et leurs hydrolysats	**51**
XVI	Les pourcentages d'inhibition de *Staph. aureus CNRZ3, L. innocua ATCC 33090* et *E. coli ATCC 25922* en présence de la β-caséine cameline et de ses hydrolysats peptiques.	**57**
XVII	Peptides identifiés dans la fraction de masse moléculaire inférieure à 1 kDa issus de l'hydrolysat pepsique de la β-CN cameline.	**62**

Résumé

Le lait de dromadaire, malgré sa valeur nutritionnelle reconnue, demeure insuffisamment exploré au regard de ses caractéristiques physico-chimiques et des allégations santé, véhiculées depuis des temps très lointains et dont certaines sont mises en évidence récemment par plusieurs travaux scientifiques. Dans ce cadre, il est établi que les caséines, protéines principales du lait, sont connues comme étant une source riche en peptides bioactifs. Qu'en est-il des caséines du lait de dromadaire ? C'est en partie pour avoir des éléments de réponses à cette question que nous avons mené une étude ciblée sur la caséine β, protéine micellaire majeure de ce lait.

À partir du lait camelin collecté dans la région d'El Oued (Algérie), les caséines camelines ont été isolées et la caséine β a été purifiée préférentiellement par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) sur Q-Sépharose, alors que les contrôles électrophorétiques sont réalisés par électrophorèse sur gels de polyacrylamide dans des conditions variées (PAGE native, PAGE-urée et PAGE SDS).

La sensibilité des caséines totales et de la caséine β à l'action de trois enzymes digestives : trypsine, chymotrypsine et la pepsine a été testée. L'activité anti-oxydante des différentes fractions protéiques (avant et après hydrolyse) a été évaluée par deux tests : le DPPH et le pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP). Les résultats ont montré que les caséines totales ainsi que la β-caséine sont plus sensibles à l'action de la pepsine que la trypsine et la chymotrypsine. Les hydrolysats pepsiques ont donné des activités anti-oxydantes les plus élevées (autour de 70 % d'inhibition du DPPH). Au regard de cette forte activité, l'hydrolysat pepsique de la β-caséine a été fractionné en utilisant des membranes d'ultrafiltration (seuil de coupure de 1 et 10 kDa). Sur les perméats obtenus (et sur la protéine initiale), nous avons recherché l'activité antimicrobienne sur 3 souches bactériennes : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* CNRZ 3 et *Listeria innocua* ATCC 33090 par microdilution.

Les bactéries testées n'ont pas été affectées par la β-CN non hydrolysée à 0,5 et 1 mg/mL. Après la digestion par la pepsine, l'ensemble des fractions recueillies (Prm : < 1 kDa, Rt2 : > 1kDa et < 10 kDa, Rt1 : > 10 kDa) ont montré une activité antibactérienne significative. La fraction Prm étant la plus efficace, en particulier contre les bactéries Gram+ : *Staphylococcus aureus* CNRZ 3 et *Listeria innocua* ATCC 33090 (à 1 mg/mL) et les pourcentages d'inhibition sont respectivement : 58,3 et 45,8. Cette fraction analysée par spectrométrie de masse en tandem à ionisation nano-electrospray couplée à la chromatographie liquide (HPLC/nESI-MS/MS) est composée de 129 peptides dont 2 d'entre eux, f (193-204) et f (193-213), présentaient au moins 50 % d'homologie avec les casecidines 15 et 17 de la β-caséine bovine, peptides antibactériens identifiés, dont un modèle de structure tridimensionnel est proposé.

Mots clés : lait, camelin, β-caséine, hydrolysats, casecidine, purification, activité anti-oxydante, activité antimicrobienne

Abstract

The aim of this study is to investigate some of the biological activities of camel (*Camelus dromedarius*) milk caseins and their derived peptides. Camel milk samples were collected in the region of El Oued in the South of Algeria. First, the total casein fraction was isolated from the milk by acid precipitation. Then, the β-casein was purified by fast protein liquid chromatography (FPLC) on the Q-Sepharose column. The sensitivity of the total caseins and β-casein to the action of digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin and pepsin) was studied and the antioxidative activities of the derived peptides were tested by the DPPH and FRAP tests.

The degree of hydrolysis for both fractions (total caseins and β-casein) was very important with pepsin and chymotrypsin than with trypsin. The derived peptides from pepsin hydrolysis exhibited the highest antioxidant activities (80 % DPPH inhibition).

The peptic hydrolysates of β-CN were fractionated by ultrafiltration. The membranes used had cut-offs of 10 and 1kDa, successively. The fractions under 1 kDa showed the highest antioxidative activities with both DPPH and FRAP assays.

The antibacterial activity tests of β-CN and its derived peptides against *Staphylococcus aureus* CNRZ 3, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Escherichia coli* ATCC 25922 showed that the growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria innocua* strains was not inhibited by β-CN while *Escherichia coli* strain growth was slightly inhibited. An antibacterial effect of β-CN hydrolysates was observed, whereas, the fraction whose the molecular mass < 1 kDa had a significant inhibitory effect on both Gram + and Gram – bacteria. The characterization of this active fraction by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography (HPLC / nESI-MS / MS) demonstrated that this fraction is composed of 129 peptides. Interestingly, 2 of them, f (193-204) and f (193-213) presented at least 50 % homology with casecidin-15 and casecidin-17 antibacterial peptides derived from bovine β-casein. This is the first study which reported the presence of two putative antibacterial fragments in camel β-casein peptic hydrolysate.

Keywords: antimicrobial activity, antioxidant activity, β-casein, camel, casecidin, hydrolyzates, milk, purification.

Introduction

Il est établi que les protéines du lait jouent un rôle important dans la nutrition et la santé humaine et animale. En effet, en plus de leur bonne digestibilité et leur richesse en acides aminés essentiels, certaines protéines assurent la défense de l'organisme, particulièrement pour les nouveau-nés, alors que plusieurs peptides, issus de l'hydrolyse de ces dernières, possèdent des activités biologiques avérées (opiacées et anti-opiacées, mitogènes, immuno-modulateurs, anti-hypertenseurs, anti-thrombotiques, bombésiques, transporteurs de minéraux…etc).

Ainsi, en fonction de leurs séquences en acides aminés, les peptides bioactifs peuvent affecter les principaux systèmes corporels, à savoir les systèmes cardiovasculaire, digestif, immunitaire et nerveux. Ces entités protéiques (protéines / peptides) sont de plus en plus recherchées, non pas seulement pour satisfaire les besoins nutritionnels de l'organisme, mais aussi pour être utilisés à bon escient, au regard de leurs activités biologiques ou de leurs propriétés techno-fonctionnelles, dans divers domaines, comme ingrédients alimentaires fonctionnels, nutraceutiques ou pharmaceutiques.

Parmi ces applications d'intérêts, les peptides naturels sont aussi explorés ces dernières années pour remplacer les conservateurs de synthèse utilisés par l'industrie alimentaire pour empêcher la détérioration des aliments. Dans ce registre, les peptides issus du lait et présentant des activités anti-oxydantes et antimicrobiennes sont particulièrement visés. Le recours aux protéines alimentaires comme source de peptides antimicrobiens et antioxydants est l'une des voies prometteuses qui présente l'avantage d'être applicable à grande échelle et avec peu de contraintes pour la matière première.

Dans ce registre, il est à signaler que l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache libère plusieurs peptides à activités biologiques. C'est le cas des protéines du lactosérum, notamment l'α-lactalbumine et la β-lactoglobuline qui ont généré plusieurs peptides antimicrobiens principalement actifs sur des bactéries à Gram+, alors que l'activité antimicrobienne de la lactoferrine, ainsi que celle des peptides issus de son hydrolyse enzymatique ont fait l'objet de larges investigations. Les protéines micellaires du lait (ou caséines) quant à elles libèrent également, par hydrolyse enzymatique, différents peptides antimicrobiens avec un spectre d'action encore plus large (actifs aussi bien sur les bactéries à Gram+ que sur celles à Gram-). Depuis, plusieurs peptides issus des caséine de différentes espèces ont été séparées et identifiés.

Par ailleurs, le transfert des connaissances établies sur le lait bovin aux laits des autres espèces (humain, ovin, caprin, camelin, équin…) a permis de mieux mettre en évidence les caractéristiques structurales et comportementales de ces protéines ainsi que certains de leurs produits d'hydrolyse. Ceci est d'ailleurs valable pour le lait de dromadaire, dont la composition protéique le rapproche du lait humain, mais qui se singularise par l'existence en son sein de molécules propres, dont les rôles ne sont pas encore bien élucidés. Ce lait a été utilisé pendant des temps très lointain comme boisson médicinale dans les sociétés du Moyen-Orient, d'Asie et d'Afrique. C'est une matière alimentaire qui a des propriétés nutritionnelles

précieuses, avec une composition équilibrée en nutriments de base (glucides, lipides, protides), une plus grande teneur en vitamine C et en fer, ainsi que sa richesse en substances antibactériennes (lactoferrine, lysozyme, lactoperoxydase, immunoglobulines) qui lui permet aisément de se conserver quelques jours à 30 °C.

Partant de là et des « vertus thérapeutiques » que les populations des régions arides et semi-arides prêtent à ce lait de dromadaire, ce dernier a connu un regain d'intérêt au niveau recherche ces dernières décennies, en vue de mettre en évidence les spécificités de ses entités protéiques, élucider par la même leur fonction et entrevoir ainsi leur meilleure utilisation.

Dans ce cadre de préoccupations, nous avons jugé utile de mener une étude sur la β-caséine (β-CN) du lait de dromadaire, en raison de son abondance en tant que protéine micellaire, mais surtout du fait qu'elle est susceptible de renfermer des peptides bioactifs, comme ceux qui ont été mis en évidence dans la β-CN du lait bovin.

Dans cette optique, l'objectif de cette étude est d'obtenir des peptides à partir de l'hydrolysat enzymatique de la β-caséine du lait camelin et tester leur activités anti-oxydantes et antimicrobiennes.

Aussi, la présente étude s'articule autour des points suivants :

- isolement, purification et caractérisation des caséines totales et de la β-caséine ;
- étude de la sensibilité de ces entités protéiques à l'action de trois enzymes digestives : pepsine, trypsine, chymotrypsine ;
- évaluation de l'activité anti-oxydante des caséines camelines totales, de la β-caséine et leurs hydrolysats ;
- étude de l'activité antibactérienne de la β-caséine native et de ses hydrolysats pepsiques sur les souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* CNRZ 3, *Listeria innocua* ATCC 33090 et *Escherichia coli* ATCC 25922) ;
- identification par spectrométrie de masse des peptides présents dans les fractions actives de l'hydrolysat de la β-CN.

Synthèse bibliographique

1.1. Aperçu sur le lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*)

Le lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*) fait parties du régime alimentaire de populations vivantes dans les zones arides et semi-arides. Il est même souvent la seule ressource alimentaire d'origine animale pour les peuplades nomades. 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). Ce produit contient tous les nutriments essentiels et sa composition est similaire à celle du lait de vache (Attia *et al*., 2003).

Le lait camelin est connu en Asie et en Afrique depuis des millénaires pour ses bienfaits sur la santé humaine. Il est utilisé pour soulager les patients atteints de maladies comme le diabète, la jaunisse, la tuberculose, l'asthme et la leishmaniose (Yagil, 1982, 2013; El-Agamy, 2006 ; Nikkhah, 2014). Ce lait de par sa composition est le plus proche du lait humain et est sans danger pour les nourrissons (Konuspayeva *et al*., 2011 ; Arab *et al*., 2014).

Les « vertus thérapeutiques » qu'on lui prête suggèrent que le lait de dromadaire contient des protéines protectrices qui pourraient jouer un rôle dans l'amélioration des mécanismes de défense immunitaire. Compte tenu de ses bienfaits pour la santé, la demande en ce lait est en augmentation constante dans le monde. Il a été introduit récemment comme un nouveau aliment fonctionnel sur le marché européen (Carrasco-Castilla *et al*., 2014).

Le lait de dromadaire, malgré des caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles qui suscitent de l'intérêt, est insuffisamment exploré et mis en valeur, notamment dans notre pays où sa production est non négligeable (0,5 % de la production laitière totale estimée à 2,4 millions de litres/an en 2015 ; anonyme 2, 2015). Notons que la population de dromadaire en Algérie se situe autour de 300 000 têtes, dont 1/3 de femelles laitières (anonyme 1, 2009). La moyenne de production laitière se situe entre 3 et 10 kilogrammes / jours, au cours d'une période lactation de 12 à 18 mois (Faye *et al*., 2003).

1.1.1. Propriétés physico-chimiques

Le lait camelin a une couleur blanc-mat, conséquence de sa composition pauvre en matière grasse et en caroténoïde (Farah et Fisher, 2004). Il a un gout légèrement sucré et même salé (Yagil, 1982). Ces aspects dépendant de la nature du fourrage et de la disponibilité en l'eau (Yadav *et al*., 2015).

Ce lait a une densité moyenne de 1,03 g/cm^3 et est moins visqueux que le lait bovin (1,72 vs 2,04 mPa.s à 20°C) (Benyagoub et Ayat, 2016). Cette différence est probablement due au diamètre des micelles de caséines qui est relativement plus large dans le lait de chamelle (Kherouatou *et al*., 2003).

Sa valeur de pH est comprise entre 6,0 et 6,97 (Khaskheli *et al*., 2005). Ce lait s'acidifie plus lentement. Il peut en effet résister sans cailler 3 jours à 30 °C et 15 jours à 7 °C (Omer et Eltinay, 2009). Cette caractéristique est le fait de l'existence en son sein d'un système anti-bactérien puissant (Lactoperoxydase/Lysozyme/Lactoferrine) (El Agamy *et al*., 2009).

1.1.2. Composition et valeur nutritionnelle

Le lait camelin contient tous les nutriments essentiels présents dans le lait bovin (Farah et Atkins, 1992 ; Salmen *et al*., 2012). Mieux, il a des teneurs plus élevées en vitamine C, en niacine, en fer et en potassium (Tableau I). De ce fait et grâce à sa valeur nutritionnelle élevée, ce lait représente un aliment essentiel pour le chamelon pendant ses premiers stades de développement.

Tableau I : Concentrations moyennes comparées en vitamines (C et B3) et en potassium du lait de dromadaire et du lait de vache (mg/mL).

	Lait de dromadaire	Lait de vache	Références
Vitamine C	26,2-50,39	2,91-22,29	El Agamy *et al*. (2009)
Niacine (vit B3)	4,46	0,63	Kappeler (1998)
K	2700	1360	Haddadin *et al*. (2008)
Fe	4,4	0,5	El Agamy *et al*. (2009)

Cette matière alimentaire contient une composition relativement similaire à celle du lait bovin (Tableau II). Néanmoins, cette composition, rapportée dans plusieurs régions du monde, connait des fluctuations qui sont dues à divers facteurs liés à l'effet de la saison, l'alimentation le stade de lactation, l'âge et le nombre de vêlages (Yagil, 1982 ; Khaskheli *et al*., 2005 ; Sanayei *et al*., 2015).

Tableau II : Composition du lait de différentes espèces (%) (Al Haj et Al-Kanhal, 2010).

	Eau	Protéines	Matière grasse	Cendres	Lactose
Chamelle	86-88	3,0-3,9	2,9-5,4	0,6-0,9	3,3-5,8
Vache	85-87	3,2-3,8	3,7-4,4	0,7-0,8	4,8-4,9
Buffle	82-84	3,3-3,6	7,0-11,5	0,8-0,9	4,5-5,0
Brebis	79-82	5,6-6,7	6,9-8,6	0,9-1,0	4,3-4,8
Chèvre	87-88	2,9-3,7	4,0-4,5	0,8-0,9	3,6-4,2
Maternelle	88-89	1,1-1,3	3,3-4,7	0,2-0,3	6,8-7,0

1.1.3. Valeurs thérapeutiques

Le lait de dromadaire a non seulement permis de nourrir (sous forme frais ou fermenté) les populations vivants dans les régions désertiques à travers le monde. Mais, il a été aussi utilisé depuis des temps très lointains pour ses bénéfices santé, dont notamment la guérison de plusieurs pathologies (Abdelgadir *et al*., 1998).

Afin de vérifier le bien-fondé de cet usage traditionnel, diverses études, entreprises ces dernières décennies, ont montré les effets bénéfiques des constituants de ce lait, notamment ses composants protéiques (Gizachew *et al*., 2014 ; Kula, 2014 ; Kumar *et al*., 2015 ; Yadav *et al*., 2015 ; Hailu *et al*., 2016 ; Abrhaley et Leta, 2017 ; Berhe *et al*., 2017; Khatoon et Najam, 2017 ; Mati *et al.*, 2017). Nous récapitulons ci-après les principales conclusions de ces investigations.

1.1.3.1. Propriétés antimicrobiennes et antivirales

L'activité antibactérienne du lait camelin est due à la présence de composés tels le lysozyme, le peroxyde d'hydrogène, la lactoferrine, la lactoperoxydase et les immunoglobulines dont les teneurs sont plus élevées dans ce lait que dans celui de vache ou de bufflonne (Al-Agamy, 2000a).

A titre d'exemple, Conesa *et al.* (200) ont rapporté que la lactoferrine cameline se trouve à une teneur 10 fois plus élevées que dans le lait de vache. Dans ce volet, il est mentionné que le lait camelin a un effet antimicrobien contre les bactéries gram-positif et gram-négatif, y compris *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium* (El-Agamy *et al*., 1992 ; Benkerroum *et al*., 2004).

Les rotavirus sont la cause la plus fréquente de gastro-entérites non bactérienne chez les nourrissons ou les veaux dans la plupart des régions du monde. Une forte activité anti-rotavirus a été rapportée dans le lait et le colostrum camelin (El-Agamy *et al*., 1992, El-Agamy, 2000b, El-Barbary *et al*., 2014). Cela suggère que le lait camelin cru constitue un fort inhibiteur viral du rotavirus humain.

La capacité des protéines du lait de chamelle à inhiber et / ou à bloquer l'entrée et la réplication du virus de l'hépatite C (VHC) dans la cellule a été explorée. Des effets protecteurs sur les paramètres hématologiques et la fonction hépatique des patients atteints d'hépatite C a été observée chez des sujets où l'alimentation est supplémentée avec le lait camelin (Redwan et Tabill, 2007 ; El-Fakharany *et al*., 2012 ; Abbas *et al*., 2014).

1.1.3.2. Activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I

Les peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) sont présents dans plusieurs protéines alimentaires, y compris les protéines du lait. A cet effet, *Lactobacillus helveticus* 130B4 a été utilisé pour libérer les peptides inhibiteurs de l'ACE des protéines du lait camelin et la séquence en acides aminés de ces derniers a été identifiée (Ala-Ile-Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp) (Quan *et al*., 2008).

1.1.3.3. Propriété antidiabétique

Le lait de dromadaire est utilisé traditionnellement chez les bédouins pour traiter le diabète sucré (Yagil *et al*., 1994). Partant de là, des travaux ont été effectués et les résultats des études menées ont montré que la consommation de ce lait entraîne une réduction de la concentration d'insuline pour les patients diabétiques de type 1 (Agrawel *et al*., 2003 ; Hamad *et al*., 2011 ; Ejtahed *et al*., 2015 ; Shori, 2015).

Beg *et al.* (1986) ont relevé la présence de peptides ressemblant à l'insuline dans les protéines de lactosérum du lait camelin.

1.1.3.4. Effet hypocholestérolémiant

Le lait camelin fermenté a été rapporté avoir un effet hypocholestérolémiant *in vivo* chez le rat (Elayan *et al*., 2008). Cet effet n'est toujours pas élucidé, mais différentes hypothèses ont été émises, y compris l'interaction entre les peptides bioactifs dérivés des protéines camelines et le cholestérol ainsi que la présence d'acide orotique, responsable de

l'abaissement du taux de cholestérol chez les sujets humains (Buonopane *et al*., 1992) et chez les rats (Rao *et al*., 1981; Abdel Galil *et al*., 2016).

1.1.3.5. Traitement des cas d'allergies

Les deux principaux composants responsables des allergies d'origine alimentaire ont été identifiés comme étant la β-Lactoglobuline et l'αs1-caséine, qui sont des protéines généralement présentes en quantité dans le lait de vache (Shabo *et al*., 2005). Al-Agamy *et al*. (2009) ont signalé que le lait camelin pourrait être une nouvelle source de protéines pour les enfants allergiques au lait bovin, du fait de l'absence en son sein de la β-Lactoglobuline. Abderrahmane *et al*. (2015) ont exploré dans ce sens la digestibilité *in vitro* des protéines sériques camelines pour les utiliser dans une formulation de lait infantile pour les enfants allergiques au lait.

1.1.3.6. Rôle dans la tuberculose

En raison de la présence de composants antimicrobiens en plus grande quantité dans le lait de chamelle, il pourrait être efficace dans le traitement des maladies chroniques. Une étude a permis de conclure qu'il existe une amélioration significative des symptômes observés par la consommation de lait de chamelle par des patients atteints de tuberculose (Mal *et al*., 2006).

1.1.3.6. Effets thérapeutiques sur le cancer

L'action anticancéreuse est largement répandue chez les guérisseurs bédouins qui utilisent un mélange de lait de chamelle et d'urine dans le traitement de patients souffrant de cancer du sein, du nasopharynx, du poumon…etc.

Dans une série d'expériences *in vitro*, un groupe de recherche dirigé par le Dr Khorshid a montré que l'urine de chamelle lyophilisée arrêtait la croissance de cellules tumorales implantées chez des animaux de laboratoire et la croissance de lignées cellulaires malignes (Khorshid et Moshref, 2006 ; Alghamdi et Khorshid, 2012).

Il a été montré aussi que la lactoferrine cameline a la capacité d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses *in vitro* et la réparation des dommages de l'ADN (Habib *et al*., 2013). Néanmoins et à ce jour, la nature exacte des constituants anticancéreux dans le lait de chamelle ou de l'urine n'a pas été identifiée, bien que la lactoferrine liant le fer soit considérée comme un candidat potentiel (Kanwar *et al*., 2015).

1.1.3.7. Autisme

Le lait camelin a été aussi signalé comme un produit ayant des effets thérapeutiques potentiels chez les patients autistes. Les enfants autistes consommant ce lait ont présenté une amélioration à plusieurs niveaux (capacités motrices, langage, coordination articulaire, santé de la peau…) (Shabo and Yagil, 2005 ; Al-Ayadhi et Elamin, 2013 ; Panwar *et al*., 2015).

1.2. Le système protéique du lait

Les protéines du lait constituent un groupe hétérogène de composés dont la composition et les propriétés diffèrent. Comme pour les autres types de lait, la fraction protéique du lait camelin est composée de deux sous-fractions : caséines et protéines du lactosérum. La teneur totale en protéines varie de 2,15 à 4,90 % (Konuspayeva *et al*., 2008) contre une composition moyenne de 3 % pour le lait de vache.

1.2.1. Les protéines sériques

Elles représentent la fraction du lait qui reste soluble après précipitation au pH isoélectrique (pH 4,6 pour le lait bovin). Les protéines de lactosérum représentent 20 à 25 % de protéines totales (Ereifej *et al*., 1011). Dans le lait de dromadaire, ces protéines sont constituées principalement des Immunoglobulines, de l'Albumine sérique, de l'α-Lactalbumine, de la Lactophorine (appelée aussi molécule d'adhésion cellulaire) de la lactoferrine et d'autres protéines mineures et enzymes.

Au regard de la composition inter-espèces (tableau III), les laits camelin et humain se singularisent par l'absence de la β-Lactoglobuline (protéine sérique majeure du lait bovin) et la présence dans cette fraction de l'α-Lactalbumine et de la lactoferrine, à des teneurs plus élevées.

Tableau III : Teneurs en protéines sériques dans les laits camelin, bovin et humain

	Teneurs (g/L)		
	Camelin	**Bovin**	**Humain**
β-Lactoglobuline	Absente	3,1(53,6%)[a,b]	Absente[c]
α-Lactalbumine	2,3(27%)[c]	1,1(20,1%)[a,b]	3,2(42%)[a]
Sérum albumine	2,2(26%)[c]	0,35(6,2%)[a]	0,57(7,5%)[a]
Immnoglobulines(IgA, IgG, IgM)	1,5(18%)[d]	0,20(3,5%)[e]	1,4(18%)[a,d]
GlyCAM-1	0,95 (11%)[h]	0,30 (5,3%)[e]	Non détectable [g]
Protéines sériques acide	0,16(1,8%)[h]	Absente	Absence
Lacto(trans)ferrine	0,22[i]	0,17	2,3(30%)[j]
Lysozyme C	0,00015[k]	0,00007 [k]	0,13 (1,7%)[g]
Lactoperoxidase	nd	0,03(0,5%)[k]	0,004 (0,1%)[g]

[a] : Malacarne *et al*. (2002) ;[b] : Chatterton *et al*. (2006) ; [c] : Omar *et al*. (2016) ; [d] : Shamsia (2009) ; [e] : Fox (2015) ; [f] : Kappeler *et al*. (1999a) ; [g] : Hettinga *et al.* (2011) ; [h] :Kappeler (1998) ; [i] :Kappeler *et al*. (1999b) ; [j] : Kappeler *et al*. (2004) ; [k] : El Agamy *et al*. (1996).

1.2.2. Les caséines

Les caséines (CN) sont les protéines majeures du lait des ruminants. Elles sont définies comme un groupe de phosphoprotéines précipitées du lait écrémé, à pH 4,6 à 20°C (pour le lait bovin, Thompson *et al.*, 1965) et à pH 4,3 et à 20 °C (pour le lait camelin, Wangoh *et al*., 1998).

Ces protéines sont synthétisées par l'épithélium sécrétoire mammaire et des micelles contenant ces dernières se forment à l'intérieur des vésicules de l'appareil de Golgi (Mercier et Gaye, 1982 ; Patton, 2004). Ces micelles, qui permettent de transporter le phosphate et le calcium dans le lait, sont constituées de diverses entités protéiques, dont les caséines majeures αs1, αs2, β et κ.

Les travaux d'Attia *et al*. (2000) et ceux de Kherouatou *et al*. (2003) ont indiqué que l'organisation de la micelle de caséines du lait camelin est compatible avec le modèle moléculaire proposé par Schmidt (1980, Figure 1) pour le lait bovin. Dans ce modèle, la micelle (qui résulte elle-même d'une association non uniforme de submicelles liées par des ponts phosphocalciques) est constituée d'un cœur hydrophobe de caséines αs1 et β et d'une partie externe hydrophile, formée de caséines αs1, αs2 et κ (Ono et Obata, 1989). La particularité de cette représentation est l'existence des parties polaires de la caséine κ en surface des micelles, ce qui rend sensible ce fragment à l'action de la chymosine (ou présure commerciale) en technologie fromagère.

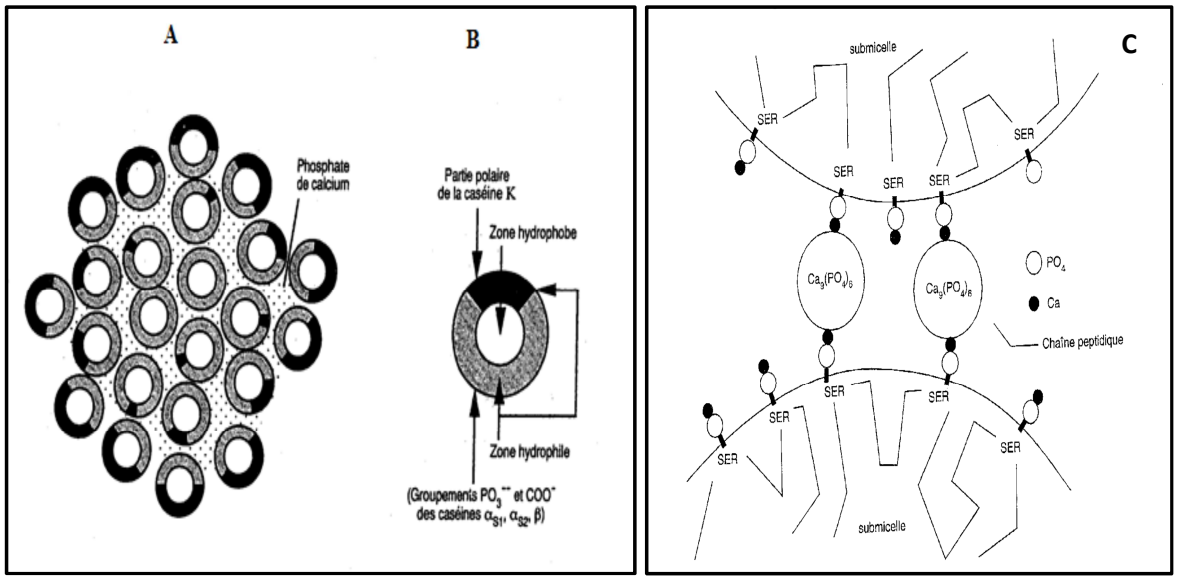


Figure 1 : Modèle de micelle (A), de la submicelle de caséines (B) et pontage de deux submicelles par le phosphate de calcium (C) (Schmidt, 1980).

Toutes les micelles n'ont pas la même composition, ni les mêmes dimensions. Selon Farah et Ruegg (1989) ; Attia *et al.* (2000) et Kherouatou *et al.* (2003), les micelles de caséine camelines possèdent un diamètre moyen (260-300 nm) plus élevé que celui mesuré dans les laits d'autres espèces : bovin (100 à 140 nm) ; caprin (260 nm), ovin (180 nm) et humain (60-80 nm) (Buchheim *et al.*, 1989 ; Bornaz *et al*., 2009). Signalons que Kamal (2016) a quant à lui a rapporté un diamètre égal à 468 (± 0,1) nm pour la micelle de la caséine cameline.

Cette taille de la micelle de caséine est un des facteurs qui explique l'aptitude technologique limitée du lait camelin, notamment sa transformation dans la fabrication de fromage. En effet, il a été montré que la taille de la micelle est inversement proportionnelle

avec la quantité de phosphate de calcium et la concentration de la κ-CN (Brulé *et al*., 2000 ; Bornaz *et al*., 2009). Cette dernière se trouverait en teneur plus faible : 3,5 Vs 13 %, respectivement dans le lait camelin et bovin (Davis et Law, 1980 ; Walsh *et al*., 1998 ; Kappeler *et al*., 2003). Ces différents aspects (teneurs en sels, en caséines et en κ-CN) concourent fortement à l'élévation du temps de coagulation constaté dans le lait de dromadaire (Bornaz *et al*., 2009) et la formation d'un coagulum peu ferme et friable (Ramet 2001, Bornaz *et al*., 2009).

1.2.2.1. Caractéristiques générales

La teneur moyenne en caséines dans le lait camelin varie entre 1,63 et 2,76 %, ce qui constitue 52 à 87 % de protéines totales du lait, contre 83 % dans le lait bovin (Mehaia *et al*., 1995 ; Khaskheli *et al*., 2005). La β-CN est le principal constituant de la caséine du lait de dromadaire et représente environ 65 % de la caséine totale (contre 45 % dans le lait de vache) (Kappeler *et al*., 2003 ; Farrell *et al*., 2004 ; El Agamy, 2006). Cette abondance relative est retrouvée aussi dans le cas du lait humain.

Les fractions de la caséine cameline ont un certain nombre de caractères communs, tels que la présence de phosphore sous forme de groupements phosphosériles et la forte proportion de résidus apolaires. Elles se distinguent les unes des autres par le nombre de groupements phosphorylés, la présence ou non de cystéines, la présence ou non de glucides et leur caractère plus ou moins hydrophobe. Les ressemblances et les dissemblances entre les caséines (αs1, αs2, β et κ) du lait de dromadaire et du lait de vache sont illustrées dans le tableau IV.

Tableau IV: Caractéristiques physico-chimiques des caséines camelines et bovines

Paramètres	CN-αs1		CN-αs2		CN-β		CN-κ		Références
	C	V	C	V	C	V	C	V	
Concentration (g/L)	5 (22%)	12 (40%)	2,2 (9,5%)	3 (10%)	15 (65%)	10 (45%)	0,8 (3,5%)	3,5 (13%)	Kappeler *et al*. (1998) ; Eigel *et al*. (1984)
Résidus d'a.a.	207	199	178	207	217	209	162	169	Kappelr *et al*. (1998) ; Farell et *al*. (2004)
MM (kDa)	24,4	23	22	25	24,9	24	22,6	19	Kappeler *et al*. (1998) ; Farell *et al*. (2004)
Point isoélectrique	4,41	4,26	4,58	4,78	4,76	4,49	4,11	3,97	Eigel *et al*. (1984) ; Kappeler *et al*. (1998)
Résidus cystéine	0	0	2	2	0	0	2	2	Kappeler *et al*. (1998) ; Farell *et al*. (2004)
Groupements phosphosériles /mole	6	8-9	9	10-13	4	5	1	1-2	Kappeler *et al*. (1998) ; Farell *et al*. (2004)
Résidus proline	19	17	8	10	35	35	22	20	Eigel *et al*. (1984) ; Kappeler *et al*. (1998)
Présence de glucides	-		-		-		+		Kappeler *et al*. (1998)
Similitude de structure (%)	39		56		64		56		Kappeler *et al*. (1998)

C : Chamelle ; V : Vache

La composition et les propriétés fonctionnelles des caséines varient en fonction de l'espèce, voire de la race considérée. Les caséines sont assez peu structurées, ce qui les rend très sensibles à la digestion protéolytique. Par contre, l'absence de contraintes conformationnelles les rend peu sensibles aux traitements thermiques.

1.2.2. Utilisations industrielles

Les caséines ont une grande valeur nutritionnelle, en raison de leurs bons apports en acides aminés, notamment essentiels, en calcium et en phosphate (Korhonen, 2011). C'est des protéines qui sont caractérisées aussi par une bonne digestibilité. Elles permettent de ce fait la transformation industrielle du lait en fromage.

Malheureusement, dans le cas du lait camelin, cette transformation bute sur certaines difficultés inhérentes aux particularités de ses constituants (faible proportion en κ-CN, petite taille des globules gras, activité des enzymes coagulantes…etc.). Néanmoins en opérant certains ajustements appropriés, ce lait a été testé avec succès dans la fabrication de variétés de fromages, soit à base de lait camelin seul ou additionnés avec du lait bovin ou ovin (Konuspayeva *et al*., 2014 ; Qadeer *et al*., 2015 ; Habtegebriel et Admassu, 2016).

Bien que la vocation nutritionnelle de ces protéines n'est pas prête à être remise en cause, étant donné que le consommateur y puise des besoins azotés relativement bons marchés (en comparaison avec le prix des viandes et poissons), il y a lieu toutefois de signaler que les caséines sont aussi utilisées au niveau industriel, après neutralisation par des bases diverses, comme caséinates pour renforcer les propriétés fonctionnelles de produits alimentaires variés (produits carnés, confiseries, crèmes , sauces…etc) (Cayot et Lorient, 1998). Cela étant, l'utilisation de caséinates issus du lait de dromadaire n'est pas encore rapportée.

L'autre voie d'utilisation qui se dessine ces derniers temps est relative au fait que les caséines sont également une bonne source de peptides bioactifs, qui sont libérés dans l'estomac pendant la digestion (Chabane *et al*., 1998 ; Silva et Macata, 2005) ou pendant les traitements technologiques par protéolyse. Ces peptides sont retrouvés à l'origine de diverses activités biologiques d'intérêt : antihypertenseurs, antithrombotiques, opioïdes, antimicrobiens, cytomodulateurs, immunomodulateurs (Korhonen et Pihlanto, 2006 ; Mils *et al*., 2011 ; Phelan *et al*. 2009 ; Stuknyte *et al*. 2011).

Les avantages qui résultent de l'utilisation de produits naturels riches en substances bioactives ont suscité un intérêt croissant ces dernières années de la part des industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. Ainsi, des progrès significatifs ont été réalisés dans la recherche en laboratoire sur les peptides bioactifs retrouvés dans les hydrolysats de protéines (Carrasco-Castilla *et al*., 2012).

Pour l'ensemble de ces raisons, le marché mondial des produits de consommation et des ingrédients issus du lait ne cesse de croître. Les peptides bioactifs sont déjà utilisés dans la production d'aliments fonctionnels. Le tableau V répertorie les aliments fonctionnels ou ingrédients alimentaires disponibles dans le commerce qui contiennent des peptides bioactifs dérivés des caséines.

Tableau V : Produits commerciaux et ingrédients à base de caséines avec allégations santé ou fonctionnelles contenant des peptides bioactifs (Phelan, 2009 ; Carrasco-Castilla *et al*., 2012 ; Dziuba B et Dziuba M (2014)

Produit (peptides bioactifs)	Allégations santé / fonction	Marque, fabricant
Comprimés (VPP, IPP de β- et κ-CN)	Diminution de la tension artérielle	Ameal bp®, Ameal peptide ®, Calpis Co., Japon
Lait acide (VPP, I-P-P de β- et κ-CN)		Calpis®/Calpico® ,Calpis Co., Japon
Ingrédient(Caséinophosphopeptides)	Aide l'absorption des minéraux	Calpolac®MM0525, Arla Foods Ingredients Groups P/S, Denmark
Produits de fermentation du lait enrichis avec le Ca (VPP, IPP de β- et κ-CN)	Diminution de la tension artérielle	Evolus®, Valio Oy, Finland
Crèmes à base d'eau (Caséinophosphopeptides)	Anticancérigène	GC toothe mousse, GC Europe N.V., Belgium
Isolat de protéines sériques [κ-CN f(106-169) Glycomacroprotéine]	-Prévenir les caries dentaires ; -Influencer la coagulabilité du sang, l'activité antibactérienne et antivirale.	BioPURE-GMP, Davisco, USA
Hydrolysats de protéines laitières [αs1-CN f(91-100)]	Réduction des effets du stress	Lactium ® Ingredia Nutitional, France
produit laitier aromatisé, confiserie, gélules [αS1-CN : f(91-100)]	Effet sur le stress	PRODIET F200/Lactium Ingredia, France
Fromage à pâte dure à teneur réduite en matières grasses [αS1-CN : f(1-9), αS1-CN : f(1-7), αS1-CN f(1-6)]		Festivo MTT Agrifood Research, Finland
Boisson (Peptide de CN: FFVAPFPEVFGK, FVAPFPEVFGK)	Diminution de la tension artérielle	Casein DP Peptio Drink Kanebo, Japan
Boisson (Phosphopeptides de CN)	Aide l'absorption des minéraux	Tekkotsu Inryou Suntory, Japan
		otsu Kotsu calcium Asahi, Japan
Composant (Phosphopeptides de CN)	Aide l'absorption des minéraux	CE90CPP, DMV International, Holland
Chewing gum (Phosphopeptides de CN)	Prévenir les caries dentaires	Recaldent,Cadbury Enterprises Pte Ltd.
Composants (VPP, IPP from β- et κ-CN)	Diminution de la tension artérielle	Amealbp, Ameal peptide; Calpis Co., Japan
Dentifrice (Caseinophosphopeptides)	Prévenir les caries dentaires	GC tooth mousse, GC Europe N.V.
		Trident extra care,Cadbury Adams, USA
Isolat de protéine de lactosérum au fromage frais [κ-CN f(106–169)]	Anticariogène, Antimicrobien, antithrombotique	Glycomacropeptide (GMP) , Davisco Foods International Inc., USA

1.3. Caractéristiques de la caséine β (β-CN)

1.3.1. Abondance dans le lait

La β-CN est le principal constituant de la caséine du lait de dromadaire et représente environ 65 % de la caséine totale (Kappeler *et al*., 1998). Il y a une abondance relative similaire de β-CN dans le lait camelin et dans le lait humain. D'autres études confirment ces teneurs. L'analyse quantitative effectuée par Kappeler *et al*. (2003) a montré une quantité plus élevée de β-CN dans le lait camelin (15 g/L) contre 10 g/L pour l'homologue bovin, alors que κ-CN (0,8 g/L contre 3,5 g/L) se trouve à des teneurs assez faibles. En 2016, Omar *et al*. ont séparé et quantifié les caséines camelines par électrophorèse capillaire. Les résultats donnent des teneurs protéiques suivantes : β-CN (12,78 ± 0,92 mg/mL), αs-CN (2,89 ± 0,29 mg/mL) et κ-CN (1,67 ± 0,01 mg/mL).

1.3.2. Structure moléculaire

1.3.2.1. Gène de β-CN

Le gène codant pour la β-CN cameline est séquencé et la séquence a été déposée dans EMBL (numéro d'identification : HG969421) (Pauciullo *et al*., 2014). La structure génétique de cette protéine (Figure 2) se caractérise par de nombreuses courtes séquences d'exon, qui sont généralement interrompues par des introns longs.

La séquence du gène de β-CN du lait de chamelle présente 78% d'homologie avec le gène homologue d'autres espèces tels la vache (EMBL ID : X14711), la bufflonne (EMBL ID : FN424088) et la chèvre (EMBL ID : AJ0111018). Avec le gène de β-CN du lait humain, le pourcentage rapporté est légèrement plus faible (70 %), (Kappeler, 1998).

Le gène de β-CN camelin est aussi caractérisé par une teneur élevée en A/T par rapport à G/C (66,5 % contre 33,4 %). Cette singularité se retrouve aussi dans le gène de la κ-CN cameline (Pauciullo *et al*., 2013) et, en général, semble être conservé parmi l'espèce (Ward *et al*., 1997).

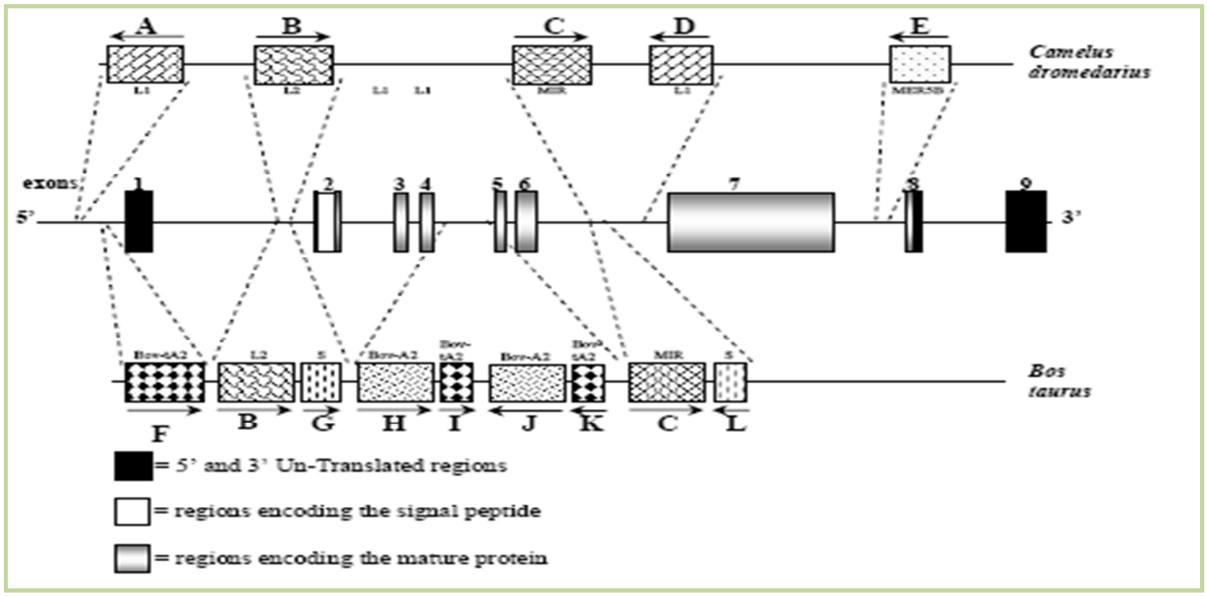


Figure 2 : Représentation schématique du gène *CSN2* de la β-caséine cameline et bovine (Pauciullo *et al*., 2014).

La séquence du peptide signal de toutes les caséines est fortement conservée entre les caséines camelines et bovines. Le peptide signal de la β-CN est constitué de 15 acides aminés (Kappeler *et al.*, 1998) (Figure 3).

Espèces	Séquence du signal peptide
Cameline	MKVLILACRVALALA
Bovine	MKVLILACLVALALA

Figure 3 : Comparaison de séquences de signal peptides de la β-caséine cameline et bovine (Kappeler *et al.*, 1998).

Notons que deux allèles (*CSN2 A* et *CSN2* B) ont été identifiés dans la β-CN cameline (Pauciullo *et al.*, 2014). Récemment, Ryskaliyeva *et al.* (2018) ont confirmé que cette protéine se présente sous la forme de deux variant génétiques A (β-CN-3P, MM 24 891 Da) et B (β-CN-4P, MM 24 970), avec la substitution d'un acide aminé (M186I) donnant une différence de masse de – 18 Da.

Comme la β-CN est l'entité protéique la plus abondante dans le lait considéré, tout allèle détecté au locus *CSN2* pourrait avoir une influence potentielle sur la qualité et les propriétés technologiques de ce lait. A ce titres, l'allèle *CSN2 B* a été jugée plus favorable à la coagulation par la présure et à la qualité du fromage au lait camelin (Di Stasio et Mariani, 2000), alors que les allèles A1 et A2, qui ne diffèrent que par une transversion (A>C) engendrant une substitution d'acides aminés His→Pro (au codon 67), montrent des activités bio-peptidiques divergentes en conséquence d'une variation conformationnelle dans la structure secondaire de la protéine exprimée (Kaminski *et al.*, 2007).

1.3.2.2. Structure et caractéristiques moléculaires

La séquence primaire, étudiée par Kappeler *et al.* (1998) (Figure 4), présente 217 acides aminés, avec une masse moléculaire qui varie de 23800 à 35000 Da (Ochirkhuyag *et al.*, 1997 ; Kappeler *et al.*, 1998 ; Shuiep *et al.*, 2014).

Arg-Glu-Lys-Glu-Glu-Phe-Lys-Thr-Ala-Gly-Glu-Ala-Leu-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu^{21}

Ser-Ile-Thr-His-Ile-Asn-Lys-Gln-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Lys-Ile-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Gln^{46}

Gln-Asp-Lys-Ile-Tyr-Thr-Phe-Pro-Gln-Pro-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Ser-His-Thr-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr-Pro-Ile^{71}

Leu-Pro-Gln-Asn-Phe-Leu-Pro-Pro-Leu-Gln-Pro-Ala-Val-Met-Val-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Lys-Val-Met-Asp-Val^{96}

Pro-Lys-Thr-Lys-Glu-Thr-Ile-Ile-Pro-Lys-Arg-Lys-Glu-Met-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Pro-Phe-Thr^{121}

Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Leu-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Leu-Met-Tyr^{146}

Gln-Ile-Pro-Gln-Pro-Val-Pro-Gln-Thr-Pro-Met-Ile-Pro-Pro-Gln-Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Phe-Lys-Val^{171}

Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Gln-Met-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Ala-Met-Pro-Val-Gln-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Gln-Glu^{196}

Pro-Val-Pro-Asp-Pro-Val-Arg-Gly-Leu-His-Pro-Val-Pro-Gln-Pro-Leu-Val-Pro-Val-Ile-Ala^{217}

Figure 4 : Séquence primaire de la β-caséine cameline (Kappeler *et al.*, 1998).

Cette structure principale présente une amphiphilie conservée. Le domaine N-terminal est riche en résidus polaires, alors que son domaine C-terminal consiste en un résidu non polaire.

Les caséines sont préférentiellement phosphorylées par la caséine kinase de la glande mammaire, qui reconnaît le motif [Ser, (Thr)] - Xaa [SerP, Glu, (Asp)] - Xaa, avec Glu ou Asp en position +1 et +3, améliorant la phosphorylation (Swaisgood, 1992). L'étude de Kappeler (1998) a montré que la β-CN cameline est phosphorylée aux niveaux des Ser^{15}, Ser^{17} et Ser^{18}. En 2014, Saadaoui *et al*. (2014) ont montré la présence d'un autre phosphate, probablement la Ser^{19} comme prédit par Kappeler *et al*. (1998).

Ces éléments concordent avec les données sur la β-CN bovine qui est caractérisée par les mêmes sites de phosphorylation et contient en plus un autre groupement phosphate aux niveaux de Ser^{50} (Farell *et al*., 2004) et Thr^{56} (Li *et al*., 2012). Signalons que cette variabilité du taux la phosphorylation a déjà été démontré dans d'autres espèces, 7 pour la β-CN équine (Girardet *et al*., 2006), 6 pour l'homologue ovin (Mamone *et al*., 2003) et 5 pour celle issue du lait humain (Poth *et al*., 2008).

La β-CN cameline et bovine ont une longueur similaire avec quelques insertions dans la fraction cameline. Les courtes insertions résultent de mutations dans le gène de la fraction cameline plutôt qu'une conséquence d'un épissage alternatif (Kappeler, 1998).

La comparaison de séquences de la caséine β de lait de vache et de dromadaire est illustrée dans la figure 5. Peu de différences structurelles prononcées ont été constatées.

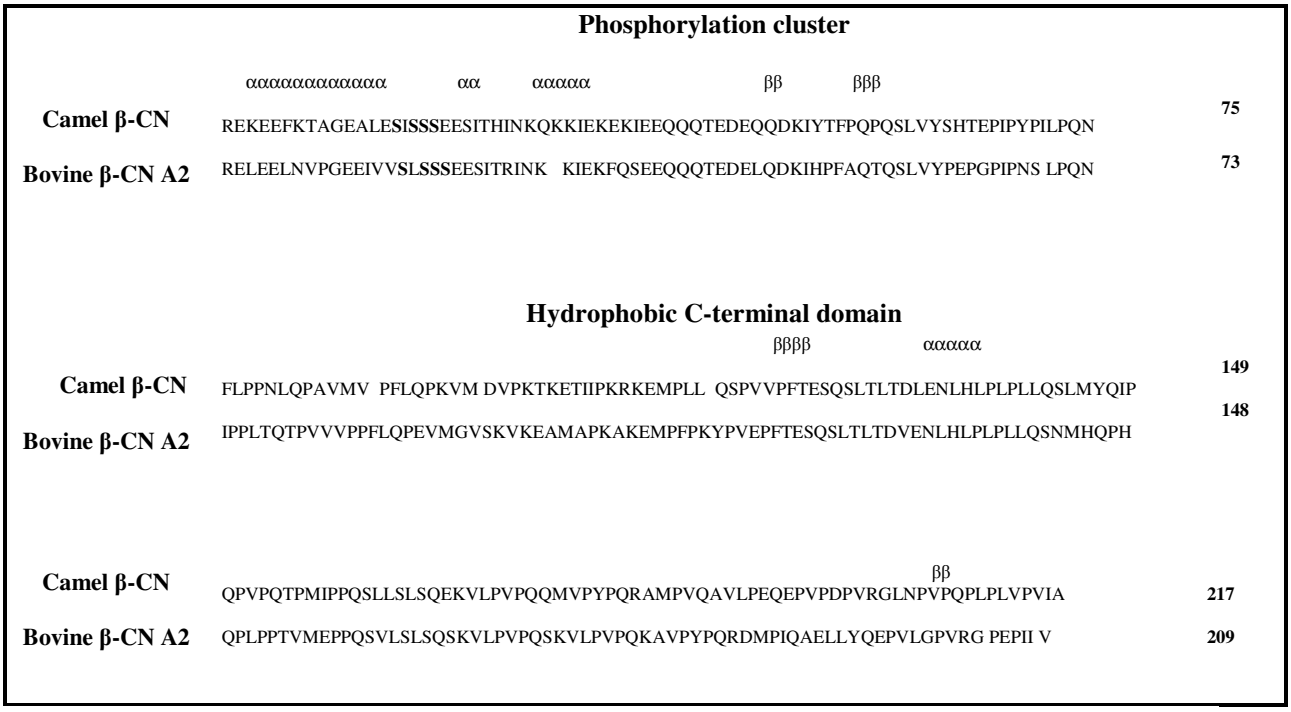


Figure 5 : Comparaison de séquences de caséine β bovine et cameline (Kappeler *et al*., 1998). Au sommet, des structures secondaires probables sont montrées. Les données de la caséine bovine proviennent de la base de données Swissprot (http://expasy.hcuge,ch/sprot/sprot-top.html).

Les études de diffraction des rayons X (Kumosinski *et al*., 1988) et par spectroscopie Raman (Byler *et al*., 1988) montrent que la β-CN a majoritairement une structure désordonnée. Celle-ci résulte de torsion de la chaine polypeptidique imposée par de nombreux résidus de proline (au nombre de 35) et de 9 à 12 % d'hélices α ainsi que 11 à 25 % de feuillets β. C'est la plus hydrophobe des caséines. La séquence N-terminale contient de nombreux résidus d'acides aminés chargés et le cluster phosphorylé.

L'analyse des acides aminés de la β-CN cameline a montré une quantité élevée de résidus hydrophobes (34 %), alors que les acides aminés acides et basiques représentent 17 et 25 %, respectivement (Ashiq, 1993).

Comme dans le cas du lait de référence, la β-CN cameline est la plus hydrophobe des caséines et elle est dépourvue de résidus glucidiques et de cystéines. Sa teneur en proline est légèrement supérieure à celle obtenue dans le lait bovin (17,1 contre 16,7 %, respectivement). Cette teneur en proline plus élevée dans les caséines camelines peut conduire à une déstabilisation des structures secondaires de manière plus prononcée que dans les caséines bovines.

La comparaison des séquences de β-CN de plusieurs espèces a montré qu'elle a pourcentage d'homologie estimé respectivement à 64, 67 et 63, 48 % avec l'homologue de vache, brebis, buffle et femme (Ashiq, 1993). Selon le même auteur, la β-CN cameline contient des teneurs (%) en Pro, Gln, Glu, Leu et Ser estimées respectivement à 34, 24, 20, 27 et 13. Ces résidus sont principalement conservés.

La caractérisation de la β-CN du lait de dromadaire a révélé la présence d'un grand nombre de répétitions en tandem courtes contenant un ou plusieurs acides aminés hydrophobes (Tableau VI). Ces structures périodiques sont destinées à lier les cations comme le fer et le calcium et jouent également un rôle important dans la stabilité marquée de la structure de la molécule de β-CN.

Tableau VI : Répétions courtes en tandem de la β-caséine cameline (Ashiq, 1993).

Répétions courtes en tandem	Position sur la structure primaire
EE	4-5, 19-20, 36-37
SEE	18-20, 35-37
TE	41-42, 63-64
IP	66-67, 71-72, 148-149, 158-159
PI	65-66, 69-70
LT	125-126, 127-128
LS	164-165, 166-167
LP	135-136, 137-138, 172-173
QS	34-35, 113-114, 123-124, 141-142, 161-162
ESI	14-16, 21-23
PVP	151-153, 173-175, 197-199
PLLQS	110-114, 138-142

Comme la β-CN bovine, la β-CN cameline partage un certain nombre d'acides aminés hydrophobes possédant une forte hydrophobicité, ainsi que plusieurs résidus de serine et de thréonine ayant le potentiel d'être des accepteurs de groupe phosphate (Esmaili *et al*., 2011). Ces propriétés et le potentiel de l'auto-assemblage et la formation de nanostructures soulignent la capacité du β-CN cameline à être utilisé comme support de composants hydrophobes. Par exemple, l'encapsulation de curcumine par la β-CN cameline par des interactions hydrophobes augmente de manière significative la solubilité de la curcumine, sa biodisponibilité et aussi son activité antioxydante (Esmaili *et al*., 2011).

Salmen *et al*. (2012) ont montré que la teneur en certains acides aminés essentiels (Val, Phe et His) était significativement plus élevée dans la β-CN du lait de vache par rapport à celle du lait camelin. A l'inverse, d'autres acides aminés (Lys, Thr, Met et Ile) existent en teneurs plus élevées dans la β-CN cameline (Tableau VII). Dans les acides aminés non essentiels, les teneurs rapportées sont relativement comparables à l'exception de la Tyr, plus élevée dans β-CN du lait camelin.

Tableau VII : Profil d'acide aminé de la β-caséine cameline (Majaheim) et bovin (g acide aminé / 100 g de protéine) (Salmen *et al*., 2012).

Acides aminés	Concentration (g d'a.a/100g de protéine)		Nombre de résidus	
	Chamelle	Vache	Chamelle	Vache
Essentiel				
Lysine	8,08 ± 0,02	9,29 ± 0,32	8	11
Threonine	4,30 ± 0,04	3,67 ± 0,04	9	9
Valine	6,88 ± 0,01	7,82 ± 0,04	18	19
Methionine	3,75 ± 0,05	2,88 ± 0,05	9	6
Isoleucine	5,55 ± 0,12	4,12 ± 0,01	11	10
Leucine	10,32 ± 0,17	9,96 ± 0,12	27	22
Phenylalanine	5,32 ± 0,11	5,85 ± 0,13	8	9
Histidine	2,75 ± 0,04	3,53 ± 0,09	6	5
Non essentiel				
a. aspartique	4,84 ± 0,01	4,69 ± 0,09	7	9
a. glutamique	20,15 ± 0,17	20,27 ± 0,13	44	39
Glycine	0,99 ± 0,01	1,42 ± 0,01	2	5
Serine	4,59 ± 0,11	5,36 ± 0, 06	13	16
Tyrosine	4,77 ± 0,1	2,92 ± 0,01	5	4
Arginine	3,25 ± 0,07	2,66 ± 0,07	5	4
Alanine	2,10 ± 0,02	1,85 ± 0,00	7	5
Proline	nd	nd	38	35
Tryptophane	nd	nd	nd	1

nd : non déterminé

1.3.3. Peptides bioactifs issus de β-CN

Les protéines alimentaires constituent une excellente source d'aliments fonctionnels dont le bénéfice santé est de plus en plus recherché ces derniers temps. Ces attributs peuvent être le fait de la protéine entière ou le plus souvent, des peptides issus de ces dernières par hydrolyse enzymatique.

Ainsi, des peptides produits à partir de protéines alimentaires ont montré des effets notables sur la santé, en tant que facteurs de croissance, agent induisant la réduction de la tension artérielle, régulation de l'activité antioxydante, régulation des fonctions immun-modulatrices, effet sur le taux de cholestérol pondéral et propriétés protectrices contre différents microorganismes et virus…etc.

Les peptides bioactifs peuvent être libérés des séquences de protéines du lait par des enzymes protéolytiques de différentes origines (natives, enzymes d'origine animale, végétale ou microbienne) (Hayes *et al*., 2006; Korhonen et Pihlanto, 2006).

Les caséines du lait camelin peuvent être considérées comme une source prometteuse pour la production de peptides à activités biologiques. Plusieurs auteurs ont montré que les hydrolysats de caséines camelines ont des propriétés antioxydantes et suggèrent leur utilisation comme antihypertenseurs et antioxydants (Salami *et al*., 2011 ; Jrad *et al*., 2014 ; Kumar *et al*., 2016 a; Rahimi *et al*., 2016). Cependant, les propriétés cardiovasculaires de ces hydrolysats n'ont pas encore été abordées.

Il est bien connu que la β-CN appartient à un groupe de protéine de lait source de peptides bioactifs, principalement des opioïdes dont on sait qu'ils jouent un rôle dans la réponse au stress et à la douleur (Kaminski *et al*., 2007). Ceci étant, aucun peptide bioactif dérivé de β-CN cameline n'a été identifié jusqu'à l'heure actuelle.

1.3.3.1. Peptides à activité antimicrobienne

Les casécidines sont issues de l'hydrolyse des caséines du lait bovin. Il s'agit de peptides polycationiques de haut poids moléculaire (Lahov et Regelson, 1996). Elles font partie des peptides anti-microbiens les plus purifiés actuellement, qui montrent une activité *in vitro* contre *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (Lahov et Regelson, 1996).

La casécidine 15 et 17 sont deux peptides antimicrobiens purifiés à partir du colostrum bovin qui ont les séquences suivantes : YQEPVLGPVRGPFPI et YQEPVLGPVRGPFPIIV, respectivement et qui sont d'origine C-terminal de β-CN.

L'hydrolyse trypsique de la caséine β de lait de lapin a donné plusieurs peptides antimicrobiens (Baranyi *et al*., 2003). Les peptides identifiés sont le fragment (50-56) (HVEQLLR) et le fragment (64-77) (ILPFIQSLFPFAER) et ce dernier était le peptide le plus actif mais uniquement sur les bactéries à Gram positif.

L'hydrolyse de la β-CN du lait humain par la protéase de *Lactobacillus helveticus* PR4 libéré un peptide correspondant au fragment (184-210) (QELLLNPTHQYPVTQPLAPVHNPISV) (Minervini *et al*., 2003).

1.3.3.2. Peptides à activité opiacée

Des peptides ayant une activité opiacée ont été identifiés dans plusieurs fractions de caséines hydrolysées par des enzymes du tractus digestif (Pihlanto-Leppälä *et al*., 1994). Ces peptides d'origine exogène nommés exorphines en référence aux endorphines, leurs homologues endogènes, possèdent des effets agonistes, et se lient sur les récepteurs de type opiacés μ, d ou k. Ces exorphines présentent des profils d'activité opiacée similaires à ceux des opiacés exogènes (morphine,…) ou endogènes (enképhalines,…). Elles agissent sur la motricité et les échanges intestinaux, possèdent des effets analgésiques, modulent diverses hormones, et agissent sur le système nerveux central et périphérique. Les effets physiologiques des peptides opiacés dérivés du lait ne sont pas encore totalement élucidés (Korhonen et Pihlanto, 2006).

Un fragment de la β-CN connu pour son activité opioïde a été identifié dans la caséine bovine et ovine (Lottspeich *et al*., 1980). Ce fragment est libéré, par action des enzymes comme la trypsine et chymotrypsine, principalement entre le 60ème et le 70ème résidu de la β-CN bovine et ovine et entre 51 et 58^{éme} dans la caséine humaine (Fiat et Joll, 1989). Ce fragment possède dans sa structure des résidus de proline alternés. Un tel résultat a été obtenu pour la β-CN cameline dans la région 60-67ème, mais son activité biologique n'a pas été établie (Ashiq, 1993). Le tableau VIII illustre la comparaison des β-casomorphines du lait de différentes espèces avec le prédictif β-casomorphine de la caséine β cameline.

Tableau VIII : Comparaison des β-casomorphines du lait de différentes espèces avec le prédictif β-casomorphine de la caséine β cameline (Ashiq, 1993).

Sources de β-casomorphine	Structure								Position dans la séquence
Chamelle	Y	S	H	T	G	P	I	P	60-67
Bovine	Y	P	F	P	G	P	I	P	60-67
Buffle	Y	P	F	P	G	P	I	P	60-67
Ovine	Y	P	F	P	G	P	I	P	60-67
Humaine	Y	V	E	P	G	P	I	P	51-58

La comparaison des peptides à activité opioïde présents dans la β-CN cameline intacte avec les peptides des autres espèces montre que cette fraction du lait de chamelle est riche en peptides opioïdes. Elle renferme 9 peptides comme la β-CN humaine tandis que la β-CN bovine et ovine possède 6 et 4 peptides opioïdes, respectivement (Tableau IX).

Tableau IX : Peptides opioïdes de la β-caséine de différentes espèces (Ashiq, 1993).

Sources	Position	Séquence						
Chamelle	52	F	P	Q	P	Q	R	L
	64	Q	P	I	P	Y	P	I
	136	L	P	L	P	L	L	
	148	I	P	Q	P	V	P	G
	172	L	P	V	P	Q	Q	M
	179	V	P	Y	P	Q	R	A
	196	Q	P	V	P	P	P	L
	206	H	P	V	P	Q	P	I
Bovine	60	Y	P	F	P	G	P	I
	110	M	P	F	P	K		
	150	Q	P	L	P	P	Y	
	172	L	P	V	P	E		
	159	V	P	Y	P	N		
Ovine	110	M	P	F	P	K		
	148	P	P	Q	P	L	P	P
	172	L	P	V	P	E	K	
	204	G	P	F	P	I	L	
Humaine	45	N	P	N	P	L	I	
	51	Y	P	F	V	E	P	I
	76	L	P	V	P	Q	P	E
	125	L	P	L	P	L	L	
	138	V	P	Q	P	I	P	Q
	156	V	P	E	P	K		
	162	L	P	I	P	Q	E	V
	196	Y	P	V	P	E	P	S

1.3.3.3. Peptides à activité hypertensive

Les peptides inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) pourraient présenter une activité anti-hypertensive (Yamamoto *et al*., 1994 ; Nakamura *et al*., 1995a, 1995b). L'ECA est une peptidyl-dipeptidase qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, et qui inactive la bradykinine qui a une action vasodilatatrice. Tout ceci a pour conséquence une augmentation de la pression artérielle. Des peptides inhibiteurs de l'ECA issus des caséines, les casokinines, sont générés par hydrolyse de la CN-αs1, de la CN-β et de la CN-αs2 bovines (Maruyama et Suzuki, 1982 ; Maruyama *et al*., 1987; Meisel et Schlimme, 1994 ; Tauzin *et al*., 2002).

Selon Maruyma *et al*. (1987), l'inhibiteur de l'ECA correspond à la région de 178 à 184 de la β-CN bovine. Ce même fragment a été aussi détecté dans la même région de β-CN de buffle, de femme et de brebis. Un tel segment existe dans la β-CN cameline. Le fragment inhibiteur d'ACE-1 prédit dans le lait de chamelle diffère des humains, des ovins, des bovins

dans sa région N-terminale où la méthionine est remplacée par l'alanine. Il a 80 % d'homologie avec celui de la caséine β-bovine et humaine (Tableau X).

Tableau X : Comparaison de fragment contenant de la proline alternée de la β-CN cameline avec les peptides inhibiteurs de l'ACE-1 de β-CN de différentes espèces (Ashiq, 1993).

Sources	Structure							Position
Chamelle	M	V	P	Y	P	Q	R	178-184
Bovine	A	V	P	Y	P	Q	R	178-184
Buffle	A	V	P	Y	P	Q	R	178-184
Humaine	A	V	P	Y	P	Q	R	178-184
Ovine	A	V	Q	Q	P	Q	R	178-184

1.3.3.4. Peptides à activité immuno-modulatrice

Jollès *et al.* (1981) ont été les premiers à mettre en évidence l'activité immunostimulante d'un hydrolysat trypsique de lait humain. Cette activité est portée par le fragment CNβ-f(63-68) (Parker *et al.,* 1984). Ce fragment a été aussi caractérisé dans la β-CN bovine. Ce peptide stimule *in vitro* la phagocytose des macrophages d'origine humaine ou murine et exerce une protection contre *Klebsiella pneumoniae* chez la souris (Migliore-Samour *et al.,* 1989). Un tel peptide a été également détecté dans le cas de la β-CN du lait camelin et se situe dans la région 63-68 de la protéine (Ashiq, 1993).

Dans le lait de dromadaire, ce fragment montre une homologie significative avec les peptides de β-CN humaine et bovine. Le changement n'est observé qu'avec Thr/Val au niveau de son résidu fertile. Le rôle biologique de ce fragment demande à être prouvé mais sur la base de l'homologie, Ashiq (1993) a supposé que ce fragment possède une fonction immunostimulante.

Tableau XI : Comparaison du segment de β-CN cameline avec des peptides immunostimulants de la β-CN humaine et bovine (Ashiq, 1993).

Sources	Structure						Position
Chamelle	T	E	P	I	P	Y	63-68
Humaine	V	E	P	I	P	Y	63-68
Bovine	P	G	P	I	P	N	63-68

1.3.3.5. Peptides à activité antioxydante

Salami et *al*. (2011) ont montré que les activités anti-oxydantes et inhibitrices de l'ACE de la caséine cameline entière et de la β-CN ont été améliorées après hydrolyse enzymatique par la pepsine, trypsine et chymotrypsine. Cheung et *al*. (1980) ont rapporté que les peptides avec des acides aminés C-terminaux hydrophobes avaient une activité inhibitrice élevée de l'ACE. La fraction peptidique de la β-CN obtenue après action de la pepsine a montré une forte inhibition de l'ACE. La pepsine clive les liaisons peptidiques impliquant des

résidus d'acides aminés hydrophobes et aromatiques. La β-CN a 46 sites potentiels de clivage pour la pepsine, plus nombreux que les sites trypsiques et chymotryptiques (http://www.expasy.org). De façon générale, les deux principales caractéristiques structurelles communes des peptides montrant une activité inhibitrice de l'ACE sont la présence d'un acide aminé hydrophobe dans la région C-terminale et la présence de nombreuses proline dans leur séquence (Otte *et al*., 2007).

L'acide aminé le plus abondant dans β-CN cameline est la proline (17 %). Lorsque cette protéine est soumise à la pepsine, certains des peptides qui se produisent possèdent des proline. Cela peut expliquer les importantes activités inhibitrices de l'ACE des peptides de la β-CN cameline. Une activité inhibitrice de l'ACE élevée a également été observée pour les peptides trypsiques de la β-CN. Ces résultats peuvent s'expliquer par la présence d'une quantité élevée de proline dans sa structure primaire.

La chymotrypsine clive les protéines après les acides aminés hydrophobes et aromatiques. L'étude de Salami et *al*. (2011) a monté que les activités antioxydantes les plus élevées ont été observées pour les hydrolysats chymotrypsiques. Des études ont montré que les acides aminés libres ont une activité antioxydante plus petite que les hydrolysats de caséines, ce qui signifie que la structure primaire de la caséine joue un rôle important (Silk *et al*., 1973; Imondi et Stradley, 1974). Le mécanisme principal par lequel les peptides agissent dans le système alimentaire est le balayage des radicaux libres. Les acides aminés les plus efficaces sont Cys, Trp, Tyr, Met, Phe, His, Ile, Leu et Pro. Il faut signaler en outre que non seulement la composition en acides aminés d'une protéine est importante, mais aussi son accessibilité et le positionnement de ces acides aminés (Elias *et al*., 2008; Arcan et Yemenicioğlu, 2007).

Partie expérimentale :

Matériel & méthodes

2. Matériel et méthodes

Le présent travail a été effectué avec la collaboration des structures de recherche suivantes :

- Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie ;
- Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n°3733), IUT Lyon 1, 01000 Bourg en Bresse, France ;
- INRA-AgroCampus Ouest, UMR1253 Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf, 35042 Rennes, France ;
- Université Claude Bernard Lyon 1, LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique), UMR 5305 CNRS, Pôle PRABI-LG, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), 69367 Lyon, France.

Il a été sous tendu par le matériel et les méthodes ci-après présentés.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Lait de chamelle

Les échantillons de lait utilisés proviennent de troupeaux de chamelles saines (*Camelus dromaderius*) de la population *Sahraoui* en élevage extensif dans des parcours naturels d'El-Oued (sud d'Algérie).

Le lait de vache utilisé à titre comparatif provient d'un troupeau de vaches saines de race Holstein (ferme d'élevage de Draa Ben Khedda, Tizi Ouzou).

2.1.1.2. Enzymes et protéines étalons

- Sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA ; USA) pour le dosage des protéines.
- kit d'étalonnage en électrophorèse PAGE-SDS (Mm allant de 14,4 à 67 kDa).
- Pepsine (EC 3.24.3.1), extraite de la muqueuse de l'estomac porcine, activité de 3000-4500 unités/mg de protéine ;
- Trypsine bovine pancréatique (EC 3.4.21.4), type I, 10,000 U/mg de protéine ;
- α-Chymotrypsine bovine pancréatique, ≥ 40 U/mg de protéine.

2.1.1.3. Produits et réactifs spécifiques

Acrylamide, N, N'- méthylène - bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, Dodécyl sulfate de sodium (SDS), β-mercaptoéthanol, persulfate d'ammonium, N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED), acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic (TNBS) , réactif de Folin-Ciocalteu, di-éthyl-aminoéthyl cellulose (DEAE cellulose)… Etc.

2.1.2. Appareillage

Au niveau des laboratoires cités plus haut, l'appareillage listé ci-après a été utilisé pour la réalisation des différentes expérimentations :

2.1.2.1. Appareillage utilisé au laboratoire LABAB-UMMTO

- Centrifugeuse réfrigérée (max 28000 x g, Sigma) ;
- Lyophilisateur à ballons et à plateaux (Telestar LyoQuest) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu) ;
- pH mètre (Metohm, Suisse) ;
- Balance de précision à 0,01 mg (Sartorius) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (Denver Instrument) ;
- Bain Marie (Memmert, Allemagne) ;
- Unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (Hoeffer SE 260, USA) comprenant : cuves d'électrophorèse, générateur de courant (max : 250V et 100 mA), plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm), espaceurs d'épaisseurs variées (0,75 ; 1 ; 1,5 mm) ;
- Unité de chromatographie liquide semi-automatisée en basse pression (Biorad) ;
- Unité de chromatographie haute performance en phase inversée (RP HPLC) avec une colonne analytique Lichrosorb C8 (caractéristiques : 125 x 4,6 mm, 5 µm taille de particules, porosité), équipé d'un détecteur UV-Visible et d'un détecteur à réfractométrie (Figure 6).

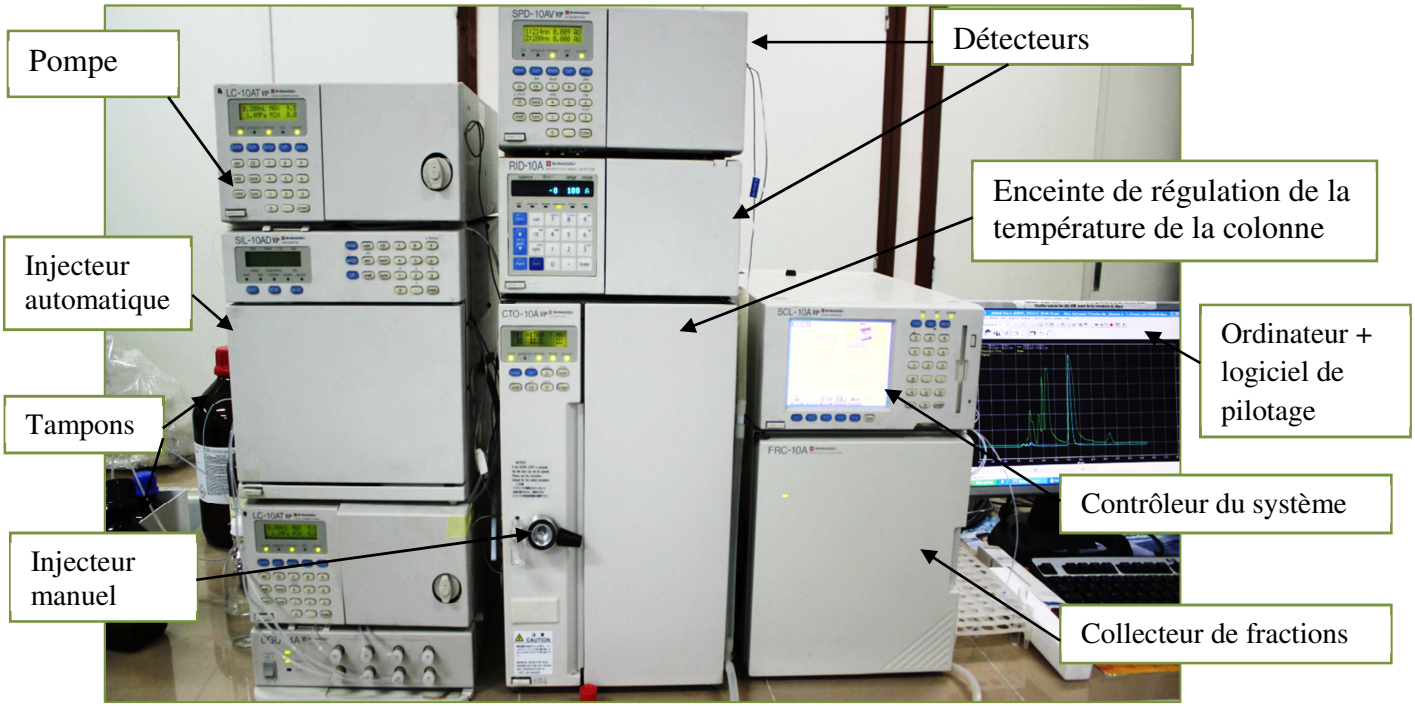


Figure 6 : Unité de chromatographie liquide de haute performance (HPLC).

2.1.2.2. Appareillage utilisé au laboratoire de BioDymia, France

- Lyophilisateur Epsilon à plateaux (Christ) ;
- Unité de chromatographie liquide rapide des protéines (FLPC) Äktapure (GE Healthcare, Suisse) équipé d'une colonne HiPrep 16/10 (Q-sépaharose FF, 16 x 100mm) (Figure 7) ;
- Spectrophotomètre (Biochrom, Nottingham, UK);
- Centrifugeuse réfrigérée (30070 x g, Sigma) ;
- Cellule d'ultrafiltration agitée (Amicon) (Figure 8) ;
- Spectrophotomètre semi-automatique Bioscreen ® (Thermofisher, Illkirch) (Figure 9).

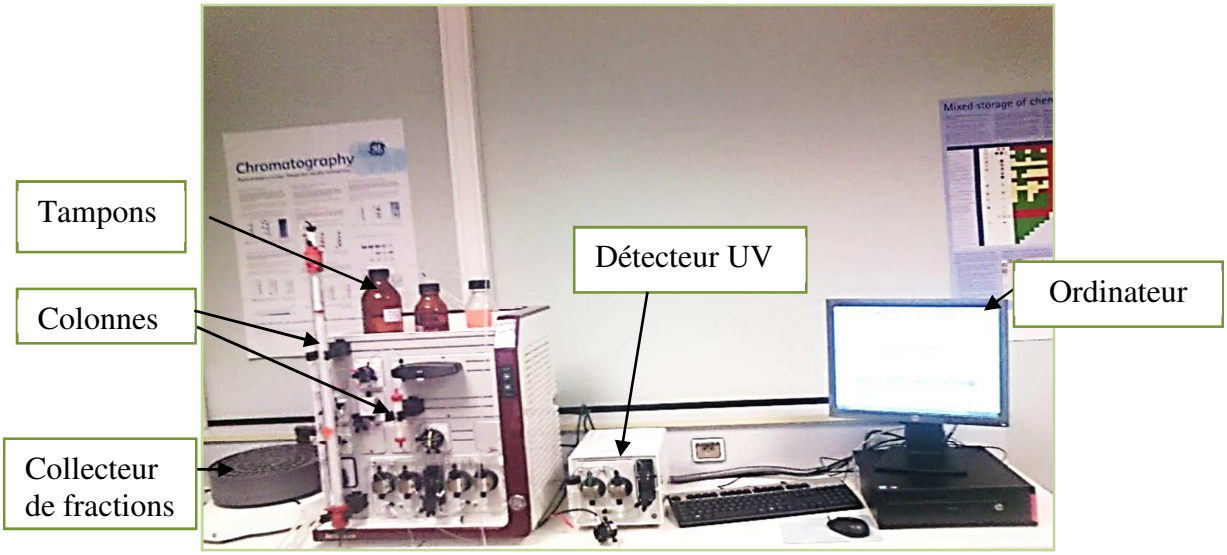


Figure 7 : Unité de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) semi-automatisée ÄKTA pure.

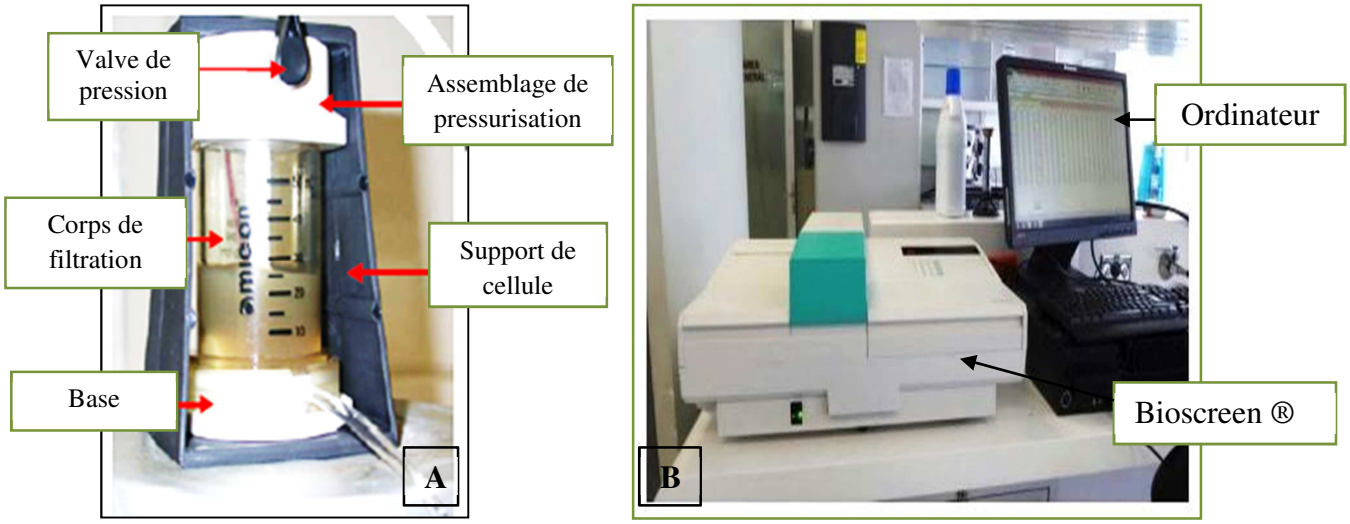


Figure 8 : Eléments composants l'unité de filtration Amicon® (A) et Spectrophotomètre semi-automatique Bioscreen® (B).

2.1.2.3. Appareillage utilisé au laboratoire STLO Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, INRA-AgroCampus, Rennes, France

- Spectrométrie de masse : hybride quadripole-Orbitrap nanoESI QExactive (Thermo Scientific, San Jose, USA) ;
- Nano chromatographie en phase liquide : 2 chaines U3000 Dionex.

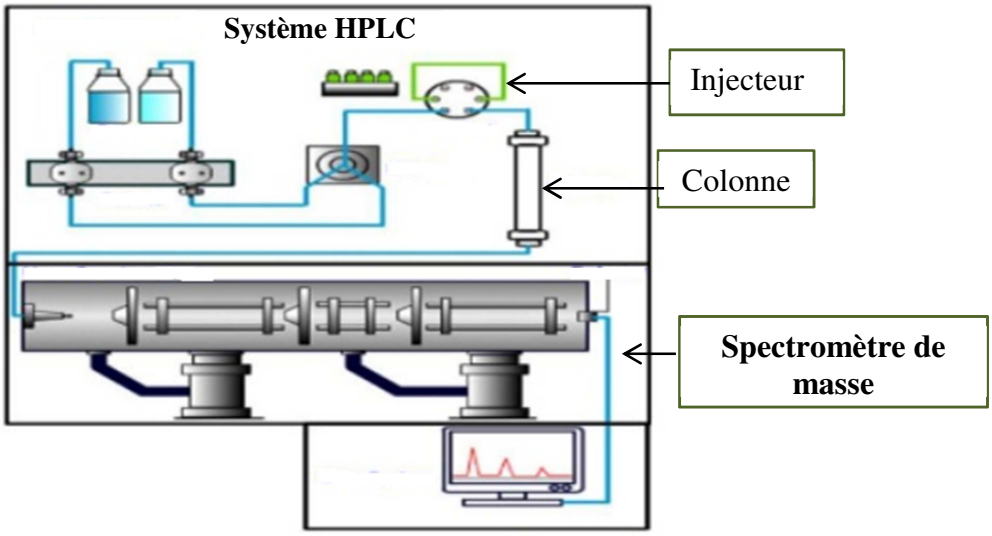


Figure 9 : Schéma d'un spectromètre de masse couplé à un système HPLC.

2.1.2.4. Appareillage utilisé au laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique, Lyon, France

- Outils de modélisation des protéines avec le logiciel YASARA.

2.2. Méthodes

2.2.1. Mesure du pH

Elle est effectuée à une température de + 20°C. La valeur est lue directement sur le pH-mètre après étalonnage avec des solutions appropriées aux pH 4, 7 ou 9 selon les cas.

2.2.2. Dosage des protéines

2.2.2.1 Principe

La détermination de la teneur en protéines des échantillons analysés est réalisée par dosage colorimétrique selon la méthode de Lowry *et al*. (1951) (Annexe 2). Il s'agit d'une évaluation basée sur deux réactions simultanées : une réaction de Biuret par laquelle les protéines donnent en milieu alcalin un complexe cuivrique coloré et une réaction où 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. Pour le cas des protéines du lait, cette méthode est relativement bien corrélée avec la méthode conventionnelle de Kjeldahl.

2.2.2.2 Mode d'utilisation

La coloration développée, proportionnelle à la concentration en protéines, est mesurée à 750 nm. La teneur 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).

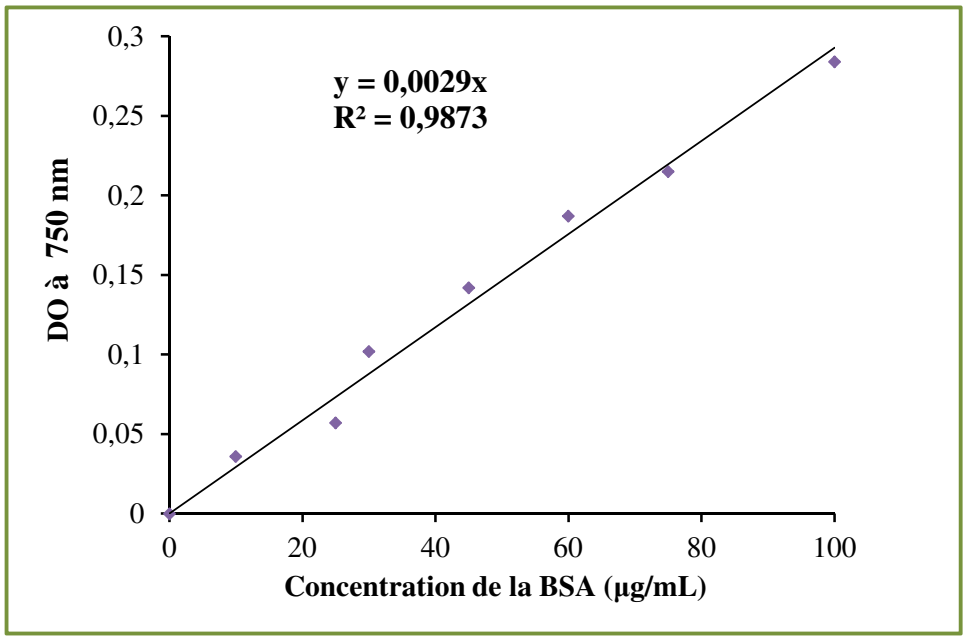


Figure 10: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951). La BSA est utilisée comme protéine étalon.

2.2.3. Isolement des caséines totales

Le lait est chauffé légèrement sous agitation à 30 °C pendant 10 mn puis centrifugé à 3500 x g / 30 mn, à 4 °C. Cette disposition permet une meilleure dispersion des globules gras et leur remontée sous l'effet de la centrifugation. La matière grasse qui se consolide en surface est écartée. Le lait écrémé qui en résulte est acidifié pH 4,3 comme préconisé par Wangoh *et al*. (1998) par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (4 N). Les caséines qui précipitent à leur pH isoélectrique sont séparées des protéines sériques par centrifugation à 3500 x g / 15 mn, à 20°C (Figure 11). Le culot est lavé trois fois sous agitation avec de l'eau distillée puis re-dissous par remontée du pH à 7,0 avec NaOH 1 M. Ce cycle précipitation-lavage-re-dissolution est répété trois fois pour une meilleure séparation des caséines avec les protéines du lactosérum. Les caséines obtenues sont ensuite dialysées 72 h (en changeant l'eau de contre dialyse 2 fois par jour) à température de réfrigération, contre de l'eau distillée, en présence d'azide de sodium (0,005 M) utilisé comme antibactérien. Elles sont versées en couches de faible épaisseur dans des coupelles, puis congelées, lyophilisées et conservées sous cette forme jusqu'à leurs utilisations.

2.2.4. Analyse par Chromatographique Liquide Haute Performance en phase inverse

2.2.4.1 Principe

Conduite dans une colonne où la phase stationnaire est apolaire, la chromatographie liquide de haute performance en phase inversée (RP-HPLC) est l'une des techniques avantageusement utilisée pour la séparation de molécules diverses se trouvant dans un mélange, selon leur hydrophobicités relatives et leurs interactions hydrophobe avec la phase stationnaire et ses chaines plus ou moins longues de chaînes aliphatiques greffées.

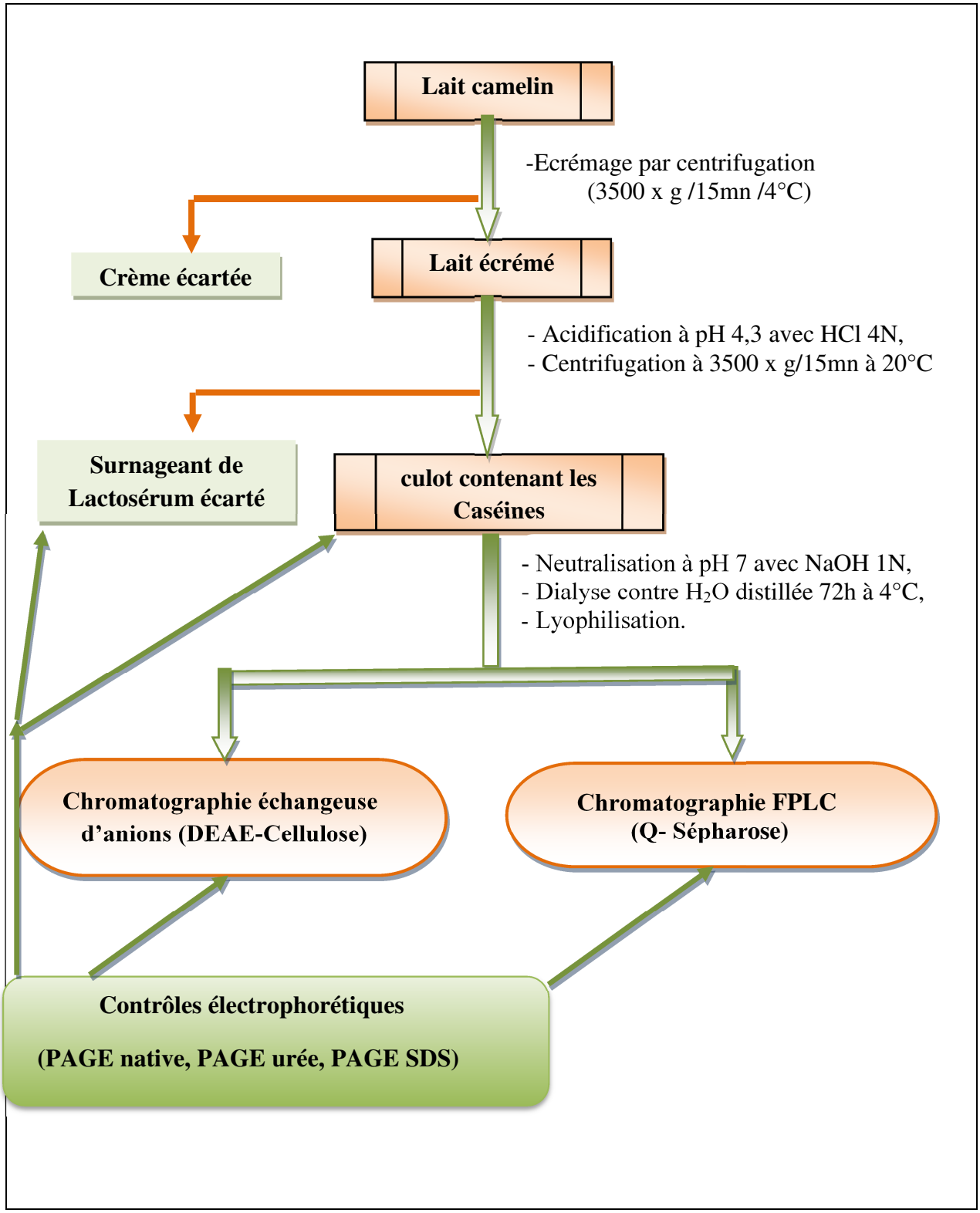


Figure 11: Etapes suivies pour l'isolement des caséines du lait collecté auprès d'un élevage de dromadaires de la population *Sahraoui* implanté à El Oued.

2.2.4.2. Mode d'utilisation

Les caséines (3 mg/mL) sont solubilisées dans un tampon bis-Tris, pH 8 et injectées (à raison de 20 µg/mL) dans une colonne Lichrosorb C8 (5 µm, 125 x 4,1 mm). La phase mobile est constituée d'un solvant A [10 % acétonitrile, 0,1% acide trifluoroacétique (TFA)] et d'un solvant B (60 % acétonitrile, 0,02 % de TFA). L'élution est conduite en utilisant un gradient binaire 0-50 % de solvant B pendant 50 minutes. La détection se fait en UV à 280 et à 214 nm. La température d'élution est de 35 °C.

2.2.5. Purification de la β-caséine cameline

2.2.5.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose

2.2.5.1.1. Principe

La séparation par chromatographie d'échange d'ions se base sur la différence de charge électrique des protéines. La phase stationnaire de la DEAE est une résine de cellulose sur laquelle sont greffés les groupements ammonium quaternaires, qui 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 (NaCl). La chromatographie est réalisée en « batch » : la résine est mise en suspension dans la solution et agitée mécaniquement.

2.2.5.1.2. Mode d'utilisation

Pour l'isolement de la β-CN cameline, la méthode de Rasmussen *et al*. (1995) a été adoptée. La résine est équilibrée avec le tampon de départ (acétate de sodium 20 mM, pH 6,6, 4 M urée, 35 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoétahnol) jusqu'à ce que le pH du filtrat soit confondu avec celui du tampon utilisé.

Les caséines camelines, à raison de 17 mg/mL sont centrifugées à 16 000 x g /1 h à 4°C. Après la centrifugation, le surnageant est mélangé avec la DEAE-cellulose pendant 30 mn à 4°C puis introduit dans un dispositif de filtration sous vide (Chromatographie en batch). L'élution est réalisée à température ambiante par un gradient discontinu de chlorure de sodium dans le même tampon (0, 0,2, 0,3). Les filtrats obtenus sont analysées par PAGE-SDS et PAGE urée.

2.2.5.2. Chromatographie liquide rapide des protéines

La β-caséine cameline est purifiée par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) au moyen d'un appareillage semi-automatisé ÄCTA-pure (Figure 8) sur une colonne Q-sépharose FF (résine échangeuse anionique forte). Le principe est identique à celui utilisé avec la DEAE Cellulose.

Les caséines totales, solubilisées à raison de (5 mg/mL) dans un tampon d'imidazole à 20 mM, pH 7, contenant 4 M d'urée, sont injectées (90 mL) sur une colonne préalablement équilibrée avec ce même tampon. Un gradient linéaire de 0,08-0,2 M de NaCl à pH 7 est appliqué. Le débit est de 2 mL/mn et l'absorbance est mesurée à 280 nm. Les fractions collectées contenant la β-CN cameline sont dialysées contre l'eau pure (milli-Q) pendant 72 h puis lyophilisées. Les lyophilisats sont conservées à 6 °C.

2.2.6. Méthodes électrophorétiques

2.2.6.1. Principe

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 leurs caractères amphotères, peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer ainsi soit vers l'anode ou la cathode et être visualisées sous forme de bandes de migrations distinctes selon leurs charges et leur poids moléculaires.

Le gel de polyacrylamide (PAGE) utilisé est le produit de polymérisation de monomères d'acrylamide (CH_2=CH-CO-NH_2) et d'un agent de pontage le N, N' méthylène-bis-acrylamide (CH_2=CH-CO-NH-CH_2-NH-CO-CH=CH_2). Cette réaction est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium $(NH_4)_2S_2O_8$ et de N, N, N, N-tetraméthylènediamine (TEMED).

2.2.6.2 .Mode d'utilisation

2.2.6.2.1. PAGE-SDS

Ce type d'électrophorèse permet la migration des protéines uniquement selon leur taille et leur forme. Pour ce faire, un détergent anionique (dodécylsulfate de sodium ou SDS,) est rajouté dans le milieu (10 %, p/v) avec un agent réducteur des ponts disulfures (β-mercaptoéthanol (4 %, v/v) et un traitement thermique des échantillons à 100 °C pendant 2-3mn est utilisé.

Le procédé adopté est celui décrit par Laemmli et Favre (1973) qui utilise un système de tampons discontinus comprenant : tampon T1 (Tris/HCl, 0,125 M, pH 6,8 pour le gel de concentration (T = 4 %, C = 2,7 %) contenant 0,1 % de SDS et tampon T2 (Tris/HCl, 3,8 M, pH 8,8 contenant 0,1 % de SDS pour le gel de séparation (T = 15 %, C = 2,7 %). Le tampon d'électrode pH 8,3 est composé de 50 mM de Tris, de 384 mM de glycine et de 0,1 % de SDS. L'échantillon est déposé dans les puits à raison de 10 µL (d'une solution à 1 mg/mL). L'électrophorèse est conduite sur mini-cuves sous des conditions électriques de 20 mA, 10 W et 250 V pendant 1h 30 mn (Annexe 3).

A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont fixées dans une solution d'acide triachloracétique (12 %, p/v) pendant 45 mn, puis colorées pendant 2 h par le bleu de Coomassie R250 à raison de 0,2 % (p/v). La décoloration du gel s'effectue dans des solutions (eau/méthanol/acide acétique, 3,12 : 1,5 : 0,37, v/v/v).

Un kit préparé au laboratoire LABAB de protéines de poids moléculaire (PM) connus est déposé sur l'un des puits. Le kit comprend : l'albumine sérique bovine (67.000), l'ovalbumine (45.000), la β-Lactoglobuline (18.000) et l'α-Lactalbumine (14.000). Une courbe étalon [(Log PM = f (distance parcourue)] est utilisée pour la détermination des PM (Figure 12).

2.2.6.2.2 PAGE-Urée

La PAGE-Urée est une méthode particulièrement adaptée pour la séparation des caséines qui sont difficilement dissociables en conditions natives. L'urée à forte concentration élimine les liaisons faibles, plus particulièrement les liaisons hydrogènes et hydrophobes.

Nous avons utilisé la méthode décrite par Andrew (1983), qui comprend un système biphasique : un gel de concentration (T= 4 % et C = 2,7 %) en tampon (Urée, 0,8 M ; Tris, 0,49 M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T= 13 % et C= 2,7 %) en tampon (Urée, 4 M, Tris, 1,5 M ; pH 8,8). Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0.75 M, pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (Tris, 5 mM ; glycine 77 mM ; pH 8,3) (Annexe 4).

Les échantillons protéiques sont préparés et mis en solution dans le tampon de gel de concentration (8 %, V/V) contenant de l'urée (3,3 M), du 2-ME (0,3 %, V/V) et du glycérol (10 % V/V).

Les échantillons protéiques sont déposés à raison de 10 µL (d'une solution à 1 mg/mL). La migration électrophorétique a lieu sous voltage et ampérage constant (20 mA, 250 V).

La même procédure décrite plus haut est utilisée pour la coloration des protéines.

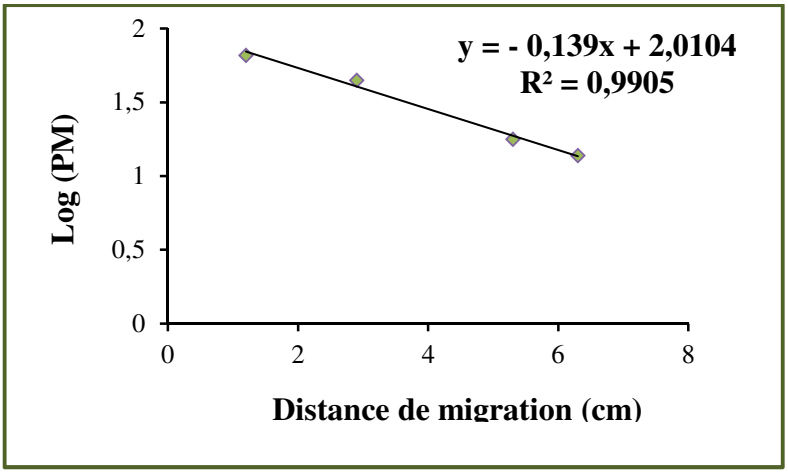


Figure 12 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS ; standard protéique de PM allant de 14 à 67 kDa.

2.2.7. Hydrolyse des caséines totales et la β-caséine par les protéases digestives

Afin d'avoir une idée sur la sensibilité des caséines camelines totales et la β-CN cameline purifiée vis à vis de l'action des protéases digestives, nous avons testé l'activité de trois enzymes différentes : la trypsine, la pepsine et la chymotrypsine.

Nous avons appliqué le protocole décrit par Bellamy *et al.* (1992). Pour chaque enzyme, des cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées. Les protéines sont solubilisées à raison de 5 % (P/V) dans les tampons correspondants puis additionnées des enzymes pour chaque cas.

L'hydrolyse pepsique est réalisée à pH 2 (tampon citrate, 0,1 M) alors que celles de la trypsine et de la chymotrytpsine sont effectuées à pH 8.2 (tampon Tris, 0,2 M). Les trois enzymes sont ajoutées avec un ratio d'enzyme/substrat (E/S) de 3 %. Le mélange est agité soigneusement pendant quelques secondes puis porté à incubation pendant 4 heures à 37 °C au bain Marie. L'arrêt de l'hydrolyse se fait par chauffage des tubes à 80 °C pendant 15 mn dans un bain Marie.

Des prélèvements d'hydrolysats de caséines totales ont été effectués à intervalles de temps suivants : 5, 10, 15, 30 et 45 mn, puis, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 heures sur une durée totale de 24 heures. Pour la caséine β, les prélèvements ont été effectués à intervalles de temps suivants : 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 et 240 mn.

2.2.8.Fractionnement de l'hydrolysat pepsique de la β-caséine

L'hydrolysat pepsique de la β-CN est soumis à un fractionnement par ultrafiltration. réalisée à l'aide de l'unité de filtration de (Amicon® Stirred Cell ; société Millipore) pouvant traiter un volume de 50 mL à chaque fois. Deux membranes avec deux seuils de coupure : 1 et 10 kDa ont été utilisées. Après l'hydrolyse, le surnagent est prélevé et introduit dans la cellule d'ultrafiltration contenant la membrane de 10 kDa. Le système est mis en place, l'agitation est activée et une pression de 2 bars est exercée. Les rétentats et perméats sont recueillis. Cette opération est répétée avec le perméat en utilisant la membrane de 1 kDa. A l'issue de ces essais, trois fractions ont été recueillies : Rt1 correspond aux fractions dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa, Rt2 : fraction de MM supérieure à 1 kDa et Prm : fraction dont MM est inférieure à 1kDa. Ces fractions sont congelées, lyophilisées et conservées sous cette forme pour des analyses ultérieures (Figure 13).

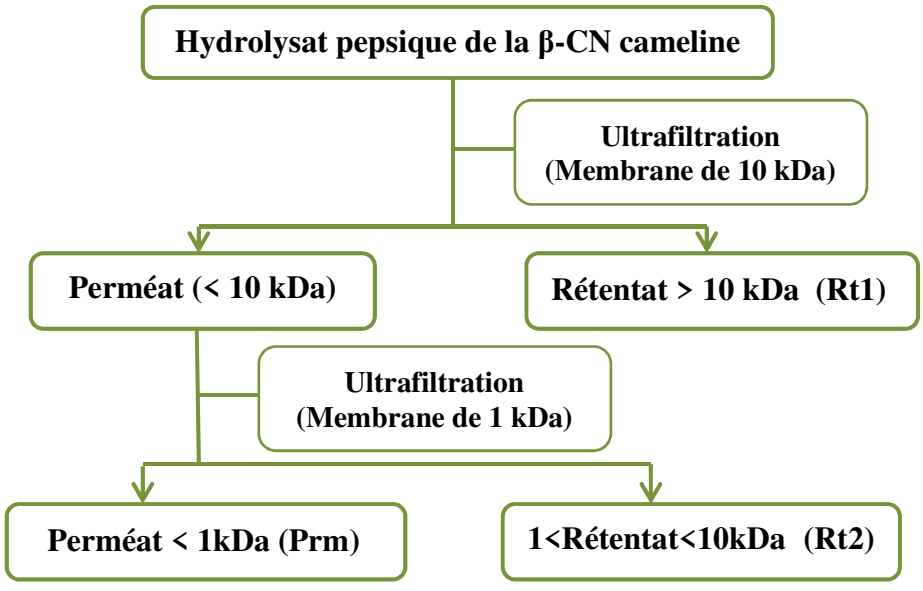


Figure 13 : Schéma de fractionnement de l'hydrolysat pepsique de la β-CN avec les différents rétentats (Rt1 et Rt2) et perméat (Prm) recueillis pour analyses.

2.2.9.Détermination de degré d'hydrolyse par la méthode de l'acide trinitrobenzène sulfonique

Le degré d'hydrolyse (DH) permet de caractériser l'étendue de la dégradation hydrolytique des protéines. Il est considéré comme l'un des indicateurs les plus appropriés pour le contrôle des procédés d'hydrolyse. Pour cela, nous avons utilisé la méthode à l'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS). La réaction de ce réactif sur une amine primaire entraîne la formation d'un composé chromophore quantifiable par spectrophotométrie (Adler-Nissen, 1979) (Figure 14). Dans une solution peptidique, la concentration en peptide est proportionnelle au nombre de fonctions amines primaires des extrémités N-terminales et des chaînes latérales de Lysine.

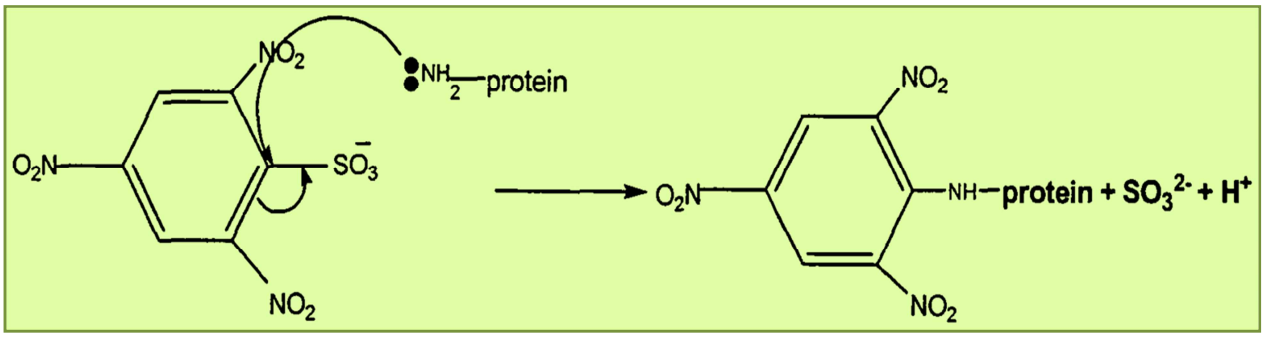


Figure 14: Réaction du T.N.B.S. avec un groupement α-aminé et formation du chromophore (Alder-Nissen, 1979).

Nous avons utilisé la méthode de McKellar (1981) pour la détermination du DH. Une solution de TNBS à 0,01 % (v/v) dans l'eau distillée est préparée juste avant le dosage. Le dosage est réalisé en ajoutant 250 µL de TNBS à une solution constituée de 0,5 mL de l'échantillon peptidique à doser. Après homogénéisation, le mélange est incubé 2 h à 37°C et à l'obscurité. Après l'incubation, 250 µL de SDS 10 % (p/v) sont additionnés et l'arrêt de la réaction se fait par ajout de 125 µL de solution HCl 1N. L'absorbance est lue à 339 nm contre le blanc. Une gamme étalon de Leucine (100 µg/mL) est réalisée (Figure 15).
Les valeurs DH ont été calculées en utilisant la formule suivante:

$$DH\ (\%) = 100\ (AN_2 - AN_1) / Npb$$

- **AN_1** : la teneur en azote aminé du substrat protéique avant hydrolyse (mg/g protéine),
- **AN_2** : 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 de AN_1 et AN_2 ont été obtenues en référence à une courbe standard d'absorbance à 339 nm par rapport à mg/L d'azote aminé (généré avec la L-leucine).

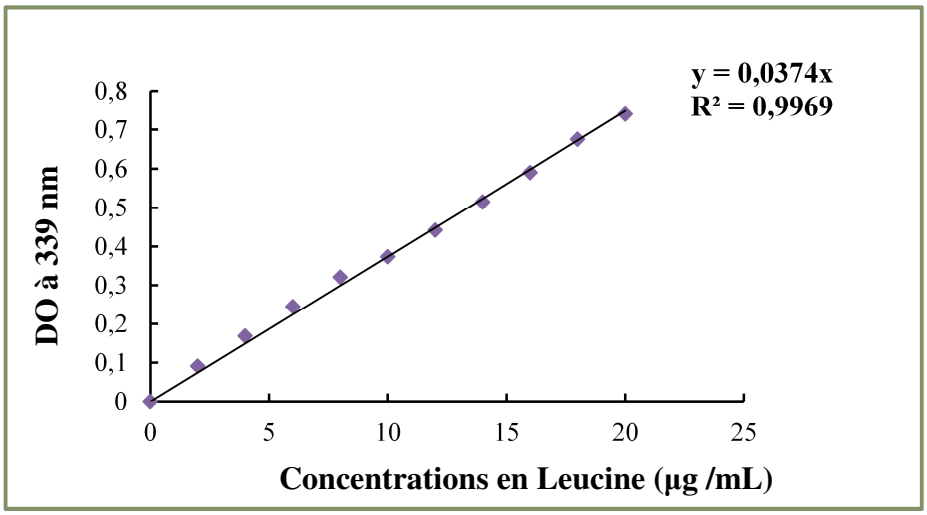


Figure 15 : Courbe d'étalonnage du dosage des groupements amines libres réalisée avec la Leucine.

2.2.10. Détermination de l'activité antioxydante

Le potentiel anti-radicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle (DPPH). En effet, à température ambiante et en solution, ce radical présente une coloration violette intense.

L'activité antioxydante des caséines totales, de la β-CN et leurs hydrolysats a été évaluée in vitro par la mesure du pouvoir de piégeage du DPPH (Figure 16). La capacité de libération des électrons par les fractions protéiques testées est mise en évidence par colorimétrie à 517 nm en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH.

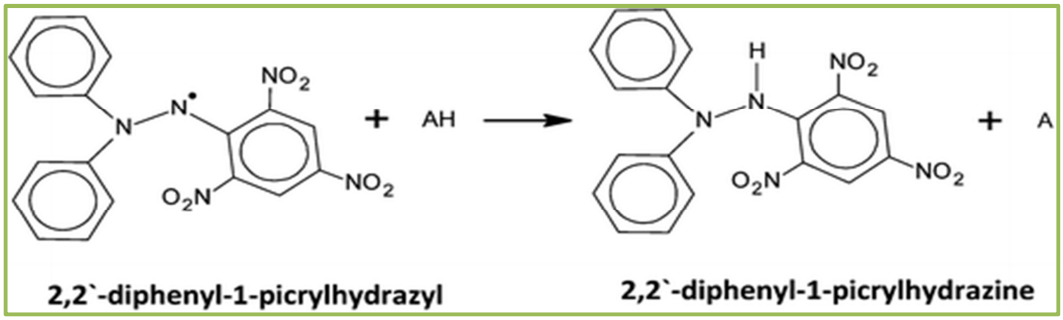


Figure 16 : Réaction du DPPH avec un antioxydant

Le test de DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par Kim *et al*. (2002), où 0,1 ml de chaque échantillon sont mélangées avec 2,9 mL d'une solution méthanolique de DPPH à 0,001 M. Après une incubation de 30 mn à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est lue à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH est calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{I\ (\%) = \frac{A\ (blanc) - A\ (échantillon)}{A\ (blanc)}\ x\ 100}$$

- **A (blanc)** : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol),
- **A (échantillon)** : Absorbance du composé d'essai.

2.2.11. Détermination de l'activité réductrice

L'activité réductrice du fer des caséines totales, de la β-CN et de leurs hydrolysats a été déterminée selon la méthode décrite par Yildirim *et al*. (2001), basée sur la réduction du Fe^{3+} (présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$) en Fe^{2+}.

L'échantillon à analyser (1mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution (1%, P/V) de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$. L'ensemble est incubé au bain Marie à 50°C pendant 30 mn. L'acide trichloracétique (2,5 mL à 10 %, p/v) est rajouté pour arrêter la réaction. Le mélange est centrifugé à 3000 x g pendant 10 mn, puis 2,5 mL du surnageant recueilli sont mélangés à 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution de chlorure ferrique (0,1 %, p/v) préparée extemporanément.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée. Dans ce cas, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur (Benzie et Strain, 1996).

2.2.12. Détermination de l'activité antibactérienne

L'analyse est effectuée en évaluant la croissance bactérienne en cinétique continue en milieu liquide (Bioscreen C), en présence de la β-CN ou de ses hydrolysats pepsiques.

L'évaluation a été effectuée sur trois souches bactériennes. Deux souches à gram positif : *Staphyloccocus aureus* CNRZ 3 et *Listeria innocua* ATCC 33090 et une souche à gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922.

Les souches bactériennes choisies pour cette étude (*Staphyloccocus aureus* et *Escherichia coli*) sont des bactéries pathogènes impliquées fréquemment dans la contamination et l'altération des denrées alimentaires.

2.2.12.1. Préparation des inocula bactériens

Les bactéries sont conservées à -20°C en aliquotes de bouillon Muller Hunter (MH) avec 15 % (v/v) de glycérol. Pour leur activation, les bactéries sont décongelées à température ambiante. 500 µL provenant des tubes du stock sont inoculés dans 9 mL de milieu liquide MH et incubés à 37°C pendant 8 h. 1 mL provenant de la première culture sont inoculés dans 9 mL de MH et incubés 16 h. En fin, 1 mL provenant de la seconde culture sont inoculés dans 9 mL de MH et incubés pendant 3 h. Ensuite les inocula sont préparés par dilution à partir de la troisième culture. La température d'incubation est 37 °C pour *E. coli* et *Staph.aureus* et 30 °C pour *L. innocua*.

Nous avons utilisé la dilution 10^{-2} pour *E. coli et L. innocua* et la dilution 10^{-1} pour *Staph. aureus*.

2.2.12.2. Témoins utilisés

Deux témoins ont été utilisés pour ces cultures : la nisine et la ciplofloxacine :

- **Nisine** : c'est un peptide antibactérien polycyclique de 34 acides aminés. Elle est bactéricide, efficace contre plusieurs bactéries à Gram+, tel que *Staph. aureus*, *Listeria innocua*. Elle est utilisée à 2000 UI / mL.

- **Ciprofloxacine** : c'est un antibiotique bactéricide. Elle neutralise les enzymes bactériennes de réplication empêchant toutes multiplications cellulaires. Elle agit sur les ADN-gyrases et particulièrement sur la topoisomérase II. Elle est efficace contre les bactéries Gram négatives. Elle est utilisée à une concentration de 2 mg/L pour *E. coli*.

2.2.12.3. Préparation des échantillons

Les échantillons utilisés sont : β-CN entière, Fraction Rt1 (> 10 kDa), fraction Rt2 (PM entre 1 et 10 kDa) et la fraction Prm (fraction < 1kDa). Les deux concentrations testées (0,5 et 1 mg/mL) sont préparées avec l'eau distillée stérile. Après la solubilisation, les échantillons sont filtrés par un filtre de 0,2 µm.

2.2.12.4. Conduite de la méthode de dilution en microplaques

La méthode de dilution en micro plaque utilisée, est une adaptation de celle décrite par Bouarab-Chibane *et al*. (2017) en utilisant le lecteur Bioscreen®. Le bioscreen est un appareil de mesure de la densité optique qui permet le suivi de croissance bactérienne, pour 200 échantillons simultanément. Ceci nous permet d'obtenir la courbe de croissance de chacune des souches.

La microplaque du bioscreen® contient 100 puits que l'on remplit de 300 µL de culture. 30 µL de bactéries testées (10^6 UFC) ont été inoculées avec 270 µL de milieu liquide MH et la β-CN ou ses hydrolysats. Les microplaques ont été incubés sous agitation à 30 °C pour *Listeria innocua* et à 37 °C pour *E. coli* et *Staph. aureus* pendant 24 h. La croissance bactérienne a été contrôlée en mesurant la densité optique à 580 nm après agitation. Dans chaque cas, des contrôles négatif (milieu + souche) et positif (milieu + nisine ou ciprofloxacine) ont été effectué.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne après 24 h d'incubation est éstimé par la formule suivante :

$$\textbf{Inhibition (\%)} = [(A_{controle} - A_{échantillon}) / A_{controle}] \times 100$$

- $A_{controle}$: absorbance de la souche.
- $A_{échantillon}$: absorbance de l'échantillon.

2.2.13. Analyse des peptides par spectrométrie de masse en tandem à ionisation Nano-electrospray couplée à la chromatographie liquide

La spectrométrie de masse consiste à mesurer le rapport masse/charge (m/z) d'espèces chargées. Un spectromètre de masse est classiquement constitué de trois modules : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur. Il existe deux types de sources d'ionisation appliquées à la mesure de biomolécules (protéines, peptides), la source MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) et l'electrosray. Dans la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), un ion peptidique sélectionné par un premier analyseur est fragmenté lors de la collision avec les molécules de gaz. Ces ions fragmentés alors produits sont de nouveau séparés dans un second analyseur (Figure 17).

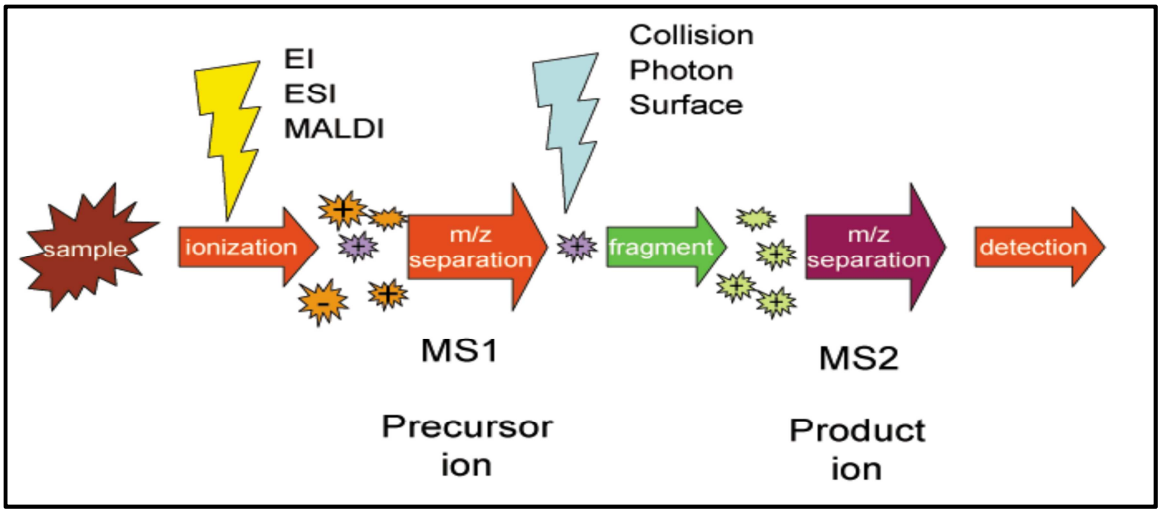


Figure 17 : Schématisation d'un spectromètre de masse en tandem.

Dans cette étude, la source d'ionisation utilisée est l'électrospray qui est une technique d'ionisation en solution à pression atmosphérique. Le couplage utilisé pour identifier les peptides de la fraction pepsique de la β-CN cameline est HPLC/nESI-MS/MS. 0.5 µg de la fraction Prm (peptides dont PM < 1 kDa) sont injectés sur une colonne de chargement (pré-colonne) (C18, taille des particules est 5 µm, 300 µm diamètre intérieur, 5 mm de longueur). Cette colonne permet non seulement de concentrer l'échantillon avant la séparation mais aussi de le dessaler. Ensuite, la colonne de chargement est mise en ligne avec la colonne analytique (C18, 3 µm taille des particules, 75 µm diamètre intérieur, 150 mm de longueur).

Les peptides ont été séparés à 35 °C, en utilisant le solvant A [2 % (v/v) d'acétonitrile, 0,08 % (v/v) d'acide formique et 0,01 % (v/v) de TFA dans de l'eau désionisée] et le solvant B (95 % (v/v) d'acétonitrile, 0,08 % (v/v) d'acide formique et 0,01 % (v/v) TFA dans l'eau désionisée). Un gradient linéaire de 5-35 % du solvant B en 35 minutes est appliqué pour l'élution à un débit de 0,3 µL/mn. Les peptides élués ont été directement envoyés « électrosprayés » dans le spectromètre de masse. Les spectres ont été recueillis dans la gamme de masse sélectionnée de 250 à 2 000 masse/charge.

Les peptides ont été identifiés à partir de spectres MS/MS en utilisant le logiciel de X! Tandem pipeline (http://pappso.inra.fr, Langella *et al.*, 2017).

Les alignements de séquences avec des peptides antimicrobiens connus ont été effectués avec la base de données sur les peptides antimicrobiens disponible sur http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php (mise à jour en janvier 2017).

2.2.14. Modélisation de la structure des peptides et simulation dynamique moléculaire

La modélisation moléculaire permet de simuler la forme d'une molécule et son interaction avec d'autres éléments, à partir d'un modèle du système, et en ayant recours à différentes méthodes de calcul. Un modèle correspond à une représentation schématique de la réalité.

La modélisation homologique du peptide a été effectuée en utilisant la structure YASARA (Venselaar *et al*., 2010) et le champ de force AMBER14 pour la minimisation (Hornak *et al*., 2006).

Les modèles possibles ont été identifiés en utilisant les itérations PSI-BLAST et la matrice de notation spécifique de position (PSSM) à partir de Uni 90. Le modèle a été choisi selon le score total de YASARA correspondant au produit du score d'alignement BLAST, le score de qualité WHAT-CHECK (Hooft *et al*., 1996) dans la base de données PDBFinder2 (Joosten *et al*., 2011) et la couverture cible.

La simulation de dynamique moléculaire de tout atome a été calculée à l'aide du logiciel Amber 14 (Case *et al*., 2005) et de Amber ff14sb en tant que champ de force pour les atomes et les ions. La simulation a été réalisée dans une boîte périodique avec de l'eau TIP5P dans des conditions isobares-isothermiques (NTP) (P = 1 atm, T = 300 K).

Des ions Na^+ et Cl^- ont été insérés (indépendamment des autres ions déjà présents via le processus de modélisation par homologie) pour neutraliser le système. Le système a été chauffé de 100 à 300 K en 100 ps et lorsque le système a atteint son équilibre, une simulation de la dynamique moléculaire NTP de 500 ns a été définie.

2.2.15. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de STAT BOX Excel et les résultats ont été présentés comme valeur moyenne ± écart-type de la moyenne. L'ANOVA à deux voies et $p < 0,05$ ont été utilisés pour l'évaluation statistique.

Partie expérimentale :

Résultats & Discussion

Chapitre 1 : Isolement, purification et caractérisation des caséines totales et de la β-caséine

3.1.1. Isolement des caséines totales

3.1.1.1. Caractérisations du lait collecté

3.1.1.1.1. Mesure du pH

La valeur moyenne du pH mesurée pour les échantillons du lait de dromadaire analysés est légèrement inférieure à celle du lait bovin (6,60 vs 6,70). Cette valeur est similaire à celle rapportée par certains auteurs (Farah, 1993 ; Mehaia, 1994 ; Shamsia, 2009). Néanmoins, nous signalons qu'Ismaili *et al*. (2016) donnent des valeurs inférieures (6 ,47), alors que Khaskhelei *et al*., (2005) mentionnent des valeurs plus élevées (6,77 ± 0,07). Cette baisse de pH serait liée à la teneur relativement élevée en vitamine C de ce lait (Saley, 1993) ainsi qu'à la forte concentration en acide gras volatils (Yagil, 1985). Le lait camelin est caractérisé par un effet tampon plus élevé par rapport au lait bovin (Abutarbousch, 1996).

3.1.1.1.2. Dosage des protéines

Les résultats du dosage des protéines totales du lait camelin analysé (Tableau XII) indiquent une teneur moyenne égale à 34,01 ± 0,55 g/L. Celle-ci est au-dessus de celle enregistrée pour le lait de vache (31,94 ± 0,84 g/L).

Tableau XII : Teneurs moyennes des protéines du lait de chamelle et de vache (g/L).

	Lait de dromadaire	Lait de vache
Protéines totales	34,01 ± 0,55	31,94 ± 0,84
Protéines sériques	7,46 ± 0,17	6,44 ± 0,15
Caséines	26,6 ± 0,38	25,5 ± 0,08

Ces résultats sont assez comparables à ceux obtenus par d'autres auteurs (Kamoun, 1994 ; Sboui *et al*., 2009 ; Shamsia, 2009). Il est à noter toutefois que des teneurs plus basses ont été rapportées : 20,60 (Attia *et al*., 2001) ; 22,1 (Khaskheli *et al*., 2005) ; et 26, 9 g/L (Haddadin *et al*., 2007). Par contre, la valeur obtenue est inférieure à celles rapportées par Mohamed *et al*. (1989) ainsi que Sanayei *et al*. (2015) (34, 01 vs 46 g/L).

Concernant la variation de la teneur protéique, Konuspayva *et al*. (2008), Abbas *et al*. (2013) et Sanayei *et al*., (2015) ont rapporté que celle-ci est affectée par des facteurs environnementaux tels que l'alimentation, le climat, la saison et stade de lactation. Yagil et Etzion (1980a) signalent qu'elle est maximale juste après le pâturage et arrive à atteindre 11,6 %, puis elle diminue et atteint des valeurs comprises entre 4,6 et 5,7 % (en régime hydraté) ou entre (2,5 et 3,3 %) en régime peu hydraté. Selon Kamoun (1994), les deux premiers mois de lactation se caractérisent par une diminution des taux protéinique et butyreux du lait camelin.

La teneur moyenne des caséines du lait camelin analysé est égale à 26,85 ± 0,38 g/L, ce qui représente environ 78,23 % des protéines totales. Ce taux se situe dans les fourchettes citées par la bibliographie (52 à 87 % des protéines totales) (Farag et Kabary, 1992 ; Khaskheli *et al*., 2005 ; Mehaia *et al*., 1995).

La valeur obtenue se rapproche aussi de celle des caséines du lait bovin (24,4 ± 0,08 g/L, soit 79,8 %). Ces résultats sont en accord avec ceux de Guo *et al*. (2007) et Shamsia (2009) qui trouvent que, comme dans le lait de référence, les caséines sont majoritaires dans le lait camelin, comparativement aux protéines du sérum.

3.1.1.2. Précipitation à pH isoélectrique

La précipitation des caséines camelines a été réalisée en portant le pH à 4,3 au lieu de 4,6 usuellement utilisé pour le lait bovin ainsi que celui d'autres espèces (ovin, équin, humain…etc). A cette valeur de pH, les micelles de caséines des laits analysés perdent totalement leur stabilité dans le milieu. Elles floculent et donnent un précipité net et stable après centrifugation, comme signalé par d'autres auteurs Wangoh *et al*. (1998), Kherouatou *et al.* (2003) et Alim *et al.* (2005). Notons que pour le lait caprin, le pH isoélectrique des caséines se situe à 4,2 (Mati *et al.*, 1991).

Afin de contrôler l'état de pureté de nos préparations, nous avons analysé les fractions isolées (après dialyse et lyophilisation) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dissociantes en présence d'urée (PAGE-urée) et en conditions disssociantes et dénaturantes en présence du dodécyl sulfate de sodium (PAGE-SDS).

Les profils obtenus (Figure 18) entre les échantillons issus des laits des deux espèces (camelin/bovin) montrent une certaine similitude dans le nombre et l'intensité des bandes majeures obtenues, mais avec des niveaux de migrations relativement différents.

Selon les données bibliographiques, les caséines bovines migrent en PAGE-urée suivant l'ordre croissant de leurs mobilités électrophorétiques comme suit :

γ-CN < κ-CN < β-CN < αs_2-CN < αs_1-CN

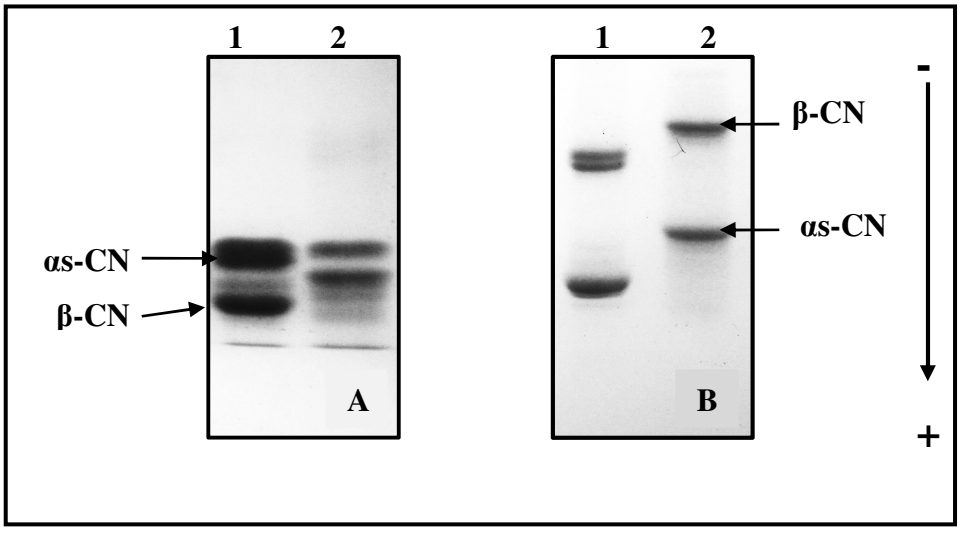


Figure 18 : Electrophorégramme des caséines camelines et bovines. 1 : Caséines bovines ; 2 : Caséines camelines. A : PAGE-SDS, Gel de séparation : T = 15 %, C = 2,7 % ; Gel de concentration : T = 4 %, C=2,7 %. B : PAGE-Urée, Gel de séparation : T = 13 %, C = 2,7 % ; Gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %.

Comparées aux caséines bovines, les caséines du lait de dromadaire montrent des mobilités électrophoretiques plus faibles (Metwali et Al-Saleh, 2010 ; Yelubaeva *et al*., 2017). Cela serait lié à leur faible degré de phosphorylation (Mohamed et Larsson-Raznikiewiez, 1991).

Les électrophoregrammes obtenus sont similaires à ceux rapportés par plusieurs auteurs (Larsson-Raznikiewiez et Mohamed, 1986 ; Metwalli et Al-Saleh, 2010 ; Elhaj et Freigoun, 2015 ; Yelubaeva *et al*., 2017). Ces auteurs ont mentionné que la caséine β-cameline correspond à la bande qui présente une faible mobilité électrophorétique, contrairement à la caséine αs qui migre plus loin, au même niveau que la κ-CN bovine.

Nous remarquons l'absence de bande protéique correspondant au niveau de migration de la κ-caséine. Cette constatation avaient été faite précédemment par d'autres chercheurs qui n'avaient pas pu identifier la κ-caséine dans leurs profils (Farah et Farah-Riesen, 1985 ; Al-Saleh, 1996 ; Alim *et al.*, 2005 ; Elhaj et Freigoun, 2015). Farah et Atkins (1992) mentionnent que cette protéine peut échapper à la détection en raison de sa faible concentration dans les protéines du lait camelin.

3.1.2. Isolement de la β-caséine

3.1.2.1. Chromatographie sur DEAE Cellulose en basse pression

Le profil électrophorétique en PAGE-urée et PAGE-SDS des fractions éluées en chromatographie échangeuse d'ions relève 2 fractions (notées de F1 et F2) (Figure 19).

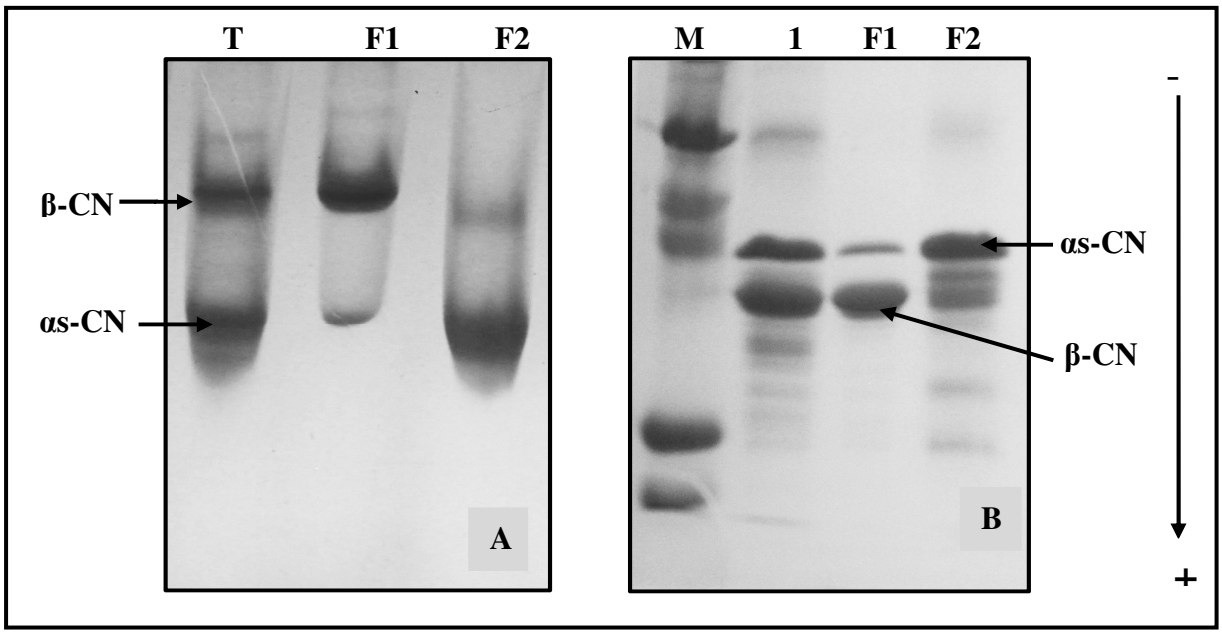


Figure 19 : Electrophorégramme des fractions collectées après séparation des caséines camelines par chromatographie sur DEAE-cellulose. A : PAGE-urée ; B : PAGE-SDS ; T : Caséines camelines totales ; F1 : Fraction collectée à 0,2 M NaCl ; F2 : 0,3 M NaCl.

La première (F1) contient en grande proportion la β-CN avec une contamination par d'autres protéines, alors que la seconde (F2) est composée majoritairement des caséines αS.

La force ionique (0,2 M NaCl) qui nous a permis d'isoler la β-CN est supérieure à celle rapportée par certains auteurs. En effet, Si Ahmed *et al.* (2013) en séparant les caséines camelines sur DEAE-Cellulose ont obtenu la β-CN à 0,09 M de NaCl, alors que Larsson-Raznikiecz et Mohamed (1986) recommandent d'utiliser une teneur en sel égale à 0,1 M pour isoler cette protéine.

Mercier *et al*. (1968) ont déjà signalé que la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE- cellulose permet le fractionnement séquentiel des caséines bovines en γ-, κ-, β-, αs2 et αs1-caséine, respectivement. NG-Kwai-Hang et Pelissier (1989) ont fractionné les caséines bovines par chromatographie d'échange d'ions sur QAE ZetaPrep 250 où la β-CN est éluée à 0,20 M NaCl. Concernant le lait camelin, très peu de travaux sont consacrés à la purification des caséines camelines par chromatographie d'échange d'ions en basse et haute pression.

Les résultats de l'étude menée par Ochirkhuyage *et al*. (1997) sur la caractérisation des caséines de ruminants de Mongolie (yak, khainak et chameau), sur QAE-Sépharose, a montré que le profil d'élution des caséines camelines est différent que celui des caséines bovines. Selon ces auteurs, les caséines issues du lait de dromadaire renferment principalement αs1-CN, αs2-CN et β-CN. La κ-CN n'est que faiblement représentée dans le mélange. La β-CN cameline est éluée dans ces conditions à 0,21 M en NaCl.

La fraction β-CN obtenue, en utilisant le protocole décrit plus haut, présente un pourcentage de contaminants non négligeables que nous n'avons pas pu réduire, malgré la variation des conditions opératoires pour l'obtention d'entités protéiques à haut degré de pureté. Ce résultat nous a incités à entrevoir une séparation en utilisant les moyens de la chromatographie en haute performance.

3.1.2.2. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

Le profil chromatographique en FPLC d'échange d'ions sur une colonne Q-sépharose (Figure 20) montre que la β-CN cameline est éluée à 0,18 M NaCl et la caséine αs à 0,25 M.

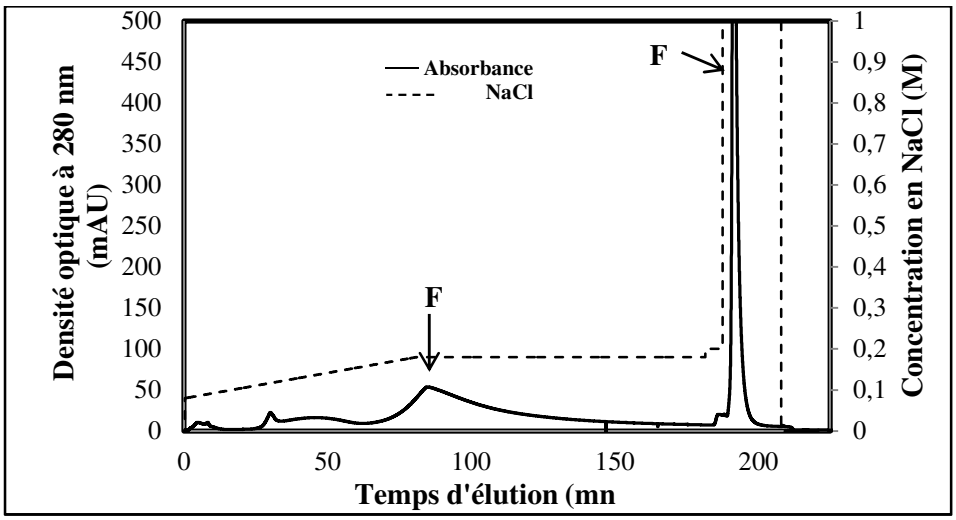


Figure 20 : Chromatogramme FPLC des caséines du lait camelin sur colonne Q-sépharose HiPrep Q FF(16/10). Tampon d'élution : (imidazole 0,02 M, pH 7,0 ; urée 4 M) ; gradient en NaCl 0,08 à 1 M ; débit : 5 mL/mn à 20°C. 1 et 2 : fractions de caséines éluées.

La concentration en sel qui nous a permis de purifier la caséine β est inférieure à celle rapportée par Chaoui-Kherouatou et Attia (2008), qui est de 0,29 M NaCl. Ces auteurs avaient fractionné les caséines issues du lait camelin par FPLC sur une colonne Mono Q HR5/5.

Un contrôle électrophoretique des deux fractions collectées, en PAGE-urée, a été réalisé (Figure 21). Le profil montre clairement que les deux fractions sont séparées avec un haut degré de pureté, comparé à ce que nous avons obtenu en utilisant la chromatographie en basse pression.

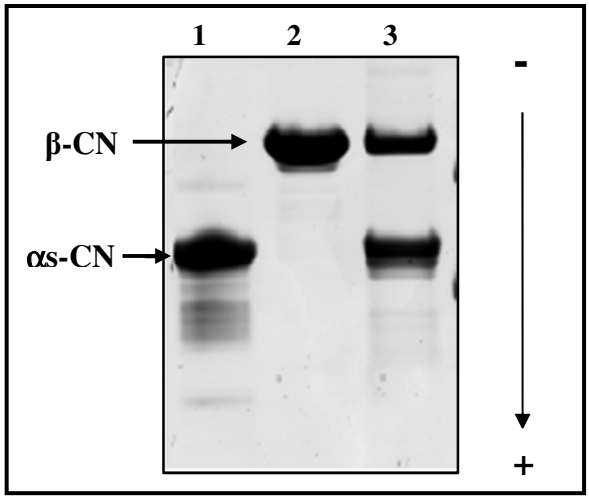


Figure 21: Electrophoregramme en PAGE-urée des deux fractions après fractionnement des caséines camelines par chromatographie sur Q-sépharose (FPLC) ; 1 et 2 : fractions éluées à 0,18 M et 0,25 M en NaCl, respectivement et 3 : Caséines camelines totales. Gel de séparation : T = 13 %, C = 2,7 % ; Gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %.

Le développement des techniques chromatographiques sous pression a ouvert de nouvelles perspectives pour l'analyse des caséines. Ces dernières, issues du lait de référence, ont été séparées avantageusement par chromatographie sur colonne de phase inverse (Diosady *et al*., 1980 ; Pearce, 1983) ainsi que par chromatographie d'échange d'ions sur colonnes Mono Q ou Mono S (Andrews *et al.*, 1985).

Ces techniques ont notamment permis de séparer des entités moléculaires qui sont voisines, soit au niveau de leur potentiel de charges globales, soit au niveau de leur poids moléculaire. Et comme les caséines (et leurs variants) ne sont pas très éloignées l'une de l'autres au niveau de ces critères, les méthodes de séparation en basse pression se heurtent à cette difficulté.

Les données de la littérature ont rapporté que la principale protéine de la fraction caséinique du lait de chamelle est la β-caséine (Kappeler *et al*., 1998 ; Al Haj et Al Kanhal, 2010 ; Ereifej *et al*., 2011). Récemment, Omar *et al*. (2016) ont quantifié les caséines camelines par électrophorèse capillaire et ils ont confirmé que la β-CN est la protéine majoritaire avec une concentration de 12,78 ± 0,92 mg/mL, comparée à son homologue dans le lait bovin (11,66 ± 0,87 mg/mL).

Les différentes fractions issues de la chromatographie d'échange d'anions sur Q-Sépharose ont été aussi analysées par RP HPLC (Figure 22) pour vérifier leur pureté et leur homogénéité. Dans ce diagramme, αs-CN est éluée à 18 mn (B) et β-CN à 29,5 mn (A). La séparation en RP HPLC montre que la β-CN cameline, comme dans le cas sur le lait bovin, est la protéine la plus hydrophobe.

La séparation des caséines du lait de vache par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée a été rapportée par plusieurs auteurs. L'ordre d'élution de ces protéines est le suivant : κ-CN, αs_2-CN, αs_1-CN et β-CN (Visser *et al*., 1995 ; Bobe *et al*., 1998 ; Bonafatti *et al*., 2008). Le temps de rétention de la β-CN bovine déterminé par ces auteurs sur une colonne C8 est 29,5 mn. Le temps de rétention de β-CN du lait caprin sur une colonne C8 rapporté par Montalbano *et al*. (2014) est de 27,5 mn.

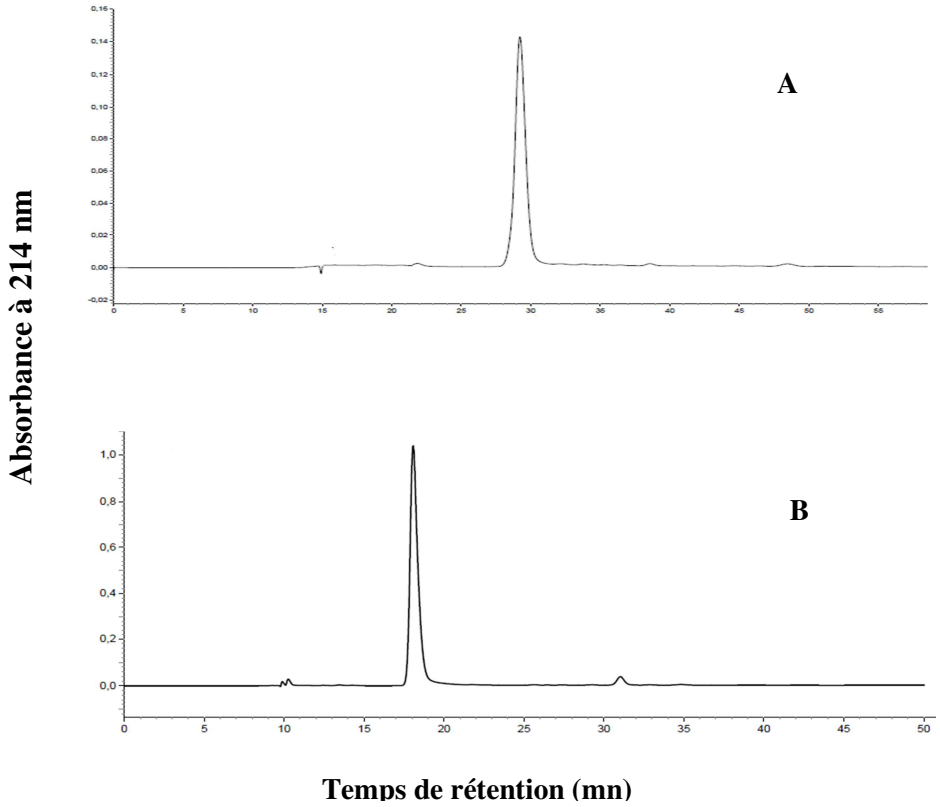


Figure 22 : Chromatogramme en RP HPLC des fractions des caséines camelines obtenues par FPLC sur Q-Sépharose. A : fraction obtenue avec 0,18 M NaCl ; B : Fraction éluée avec 0,25 M NaCl. Colonne utilisée : C8 ; gradient : 0 à 50 % ; débit : 0,2 mL/mn ; température : 38°C ; Détecteur UV : 214 nm.

3.1.2.3. Détermination du poids moléculaire de la β-caséine cameline

La fraction contenant la β-CN cameline a été analysée en PAGE-SDS afin de déterminer son poids moléculaire (Figure 23).

Farell *et al*. (2004) donnent l'ordre croissant des caséines bovines en PAGE-SDS comme suit : αs_2-, αs_1-, β-, κ-.

Afin de comparer la taille de β-CN du lait camelin analysé avec celles relevées par d'autres auteurs, nous avons récapitulé dans le tableau (XIII) les différents travaux qui ont donné une estimation des PM de cette fraction protéique.

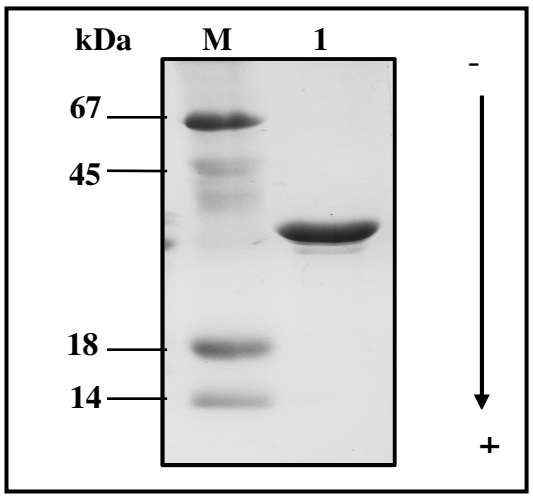


Figure 23 : Electrophorégramme de la β-CN camelines en PAGE-SDS ; gel de séparation : T = 15 %, C = 2,7 % et gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %. M : marqueurs de taille ; 1 : β-CN cameline.

Tableau XIII : Masse moléculaire (kDa) de la β-caséine mesurée en PAGE-SDS comparée avec quelques données bibliographiques.

	Présente étude	Références bibliographiques						
PM	30,34	32 (a)	24,9 (b)	31 (c)	31,6 (d)	31,7 (e)	35 (f)	23,8 (g)

(a) : Farah et farah-Riesen (1985) ; (b) : Kappeler *et al*. (1998) ; (c) : Alim *et al*. (2005) ; (d) : Si Ahmed *et al.* (2013) ; (e) : Si Boukeur (2007), (f) : Omar *et al*. (2016), (g) : Yelubaeva et *al*. (2017).

Il ressort de ce tableau que l'estimation de PM de la caséine β cameline analysée est assez comparable à celles signalées par Alim *et al*. (2005), Si Boukeur (2007) et Si Ahmed (2009) pour le lait camelin algérien, mais se différencient des valeurs rapportées par Kappeler *et al.* (1998) et Omar *et al*. (2016).

Yelubaeva *et al*. (2017) ont rapporté que la teneur relative de la β-CN cameline est de 64,5 % contre 24,28 % pour la β-CN bovine.

3.1.3. Sensibilité des caséines à l'hydrolyse enzymatique

3.1.3.1. Action des enzymes digestives sur les caséines totales

La sensibilité des caséines totales du lait camelin collecté a été testée en examinant l'action de trois protéases digestives (trypsine, pepsine et chymotrypsine) parmi celles les plus couramment utilisées dans ce type d'essais.

Dans les essais réalisés et dans les conditions des cinétiques optimisées, le contrôle électrophorétique en PAGE-SDS des caséines camelines hydrolysées par les trois enzymes digestives montre (Figure 24) la disparition progressive des bandes correspondantes aux caséines majeures et apparition de plusieurs fragments peptidiques. Notons que les caséines camelines disparaissent totalement après 15 mn (pepsine et chymotrypsine) et 20 mn (trypsine) d'incubation.

Ce résultat est confirmé par les profils des hydrolysats analysés par uchromatographie liquide de haute performane en phase inverse (RP-HPLC) (Figure 25) qui montrent l'apparition de plusieurs pics correspondant aux peptides liberés après l'action des enzymes.

La grande sensibilité des caséines camelines à la pepsine peut être attribuée aux nombres de sites coupure sur ces protéines (41, 36, 45 et 23 pour la αs_1-, αs_2-, β- et κ-, respectivement, Swiss-Prot. Numéros d'accès : O97943, O97944, Q9TVD0 et P79139, respectivement).

Les principaux composants protéiques du lait, (αs-CN et β-CN), contiennent un nombre différent de groupements phosphate, (liés aux résidus sérine et thréonine) (Dickson et Perkins, 1971 ; Medina *et al*., 1992). Ces groupements influencent de nombreuses propriétés fonctionnelles de ces protéines, y compris leur digestibilité, la biodisponibilité des cations divalents et l'immunogénicité (Tezcucano *et al*., 2007).

Les travaux de Salami *et al.* (2011) sur l'hydrolyse trypsique des caséines camelines montrent que ces dernières sont hydrolysées plus rapidement que les caséines bovines. Ceci serait lié au nombre de groupement phosphoryles présents dans la molécule. En effet, l'hydrolyse enzymatique dépend de la présence de sites potentiels de coupure mais aussi de l'accessibilité de l'enzyme à ces sites. Dans ce cadre, la présence de résidus phosphorylés (20 et 24 pour le lait camelin et bovin respectivement) est un facteur limitant pour l'hydrolyse enzymatique (Li chan & Nakai, 1989 ; Movahedi, 2011).

Les travaux récents d'Assem *et al*. (2018) sur la protéolyse trypsique, pepsique et chymotrypsique des caséines de différentes espèces (bovine, caprine, cameline, ovine) montrent que les caséines camelines sont plus sensibles à l'hydrolyse par la trypsine et la pepsine que les caséines issues des laits des autres espèces.

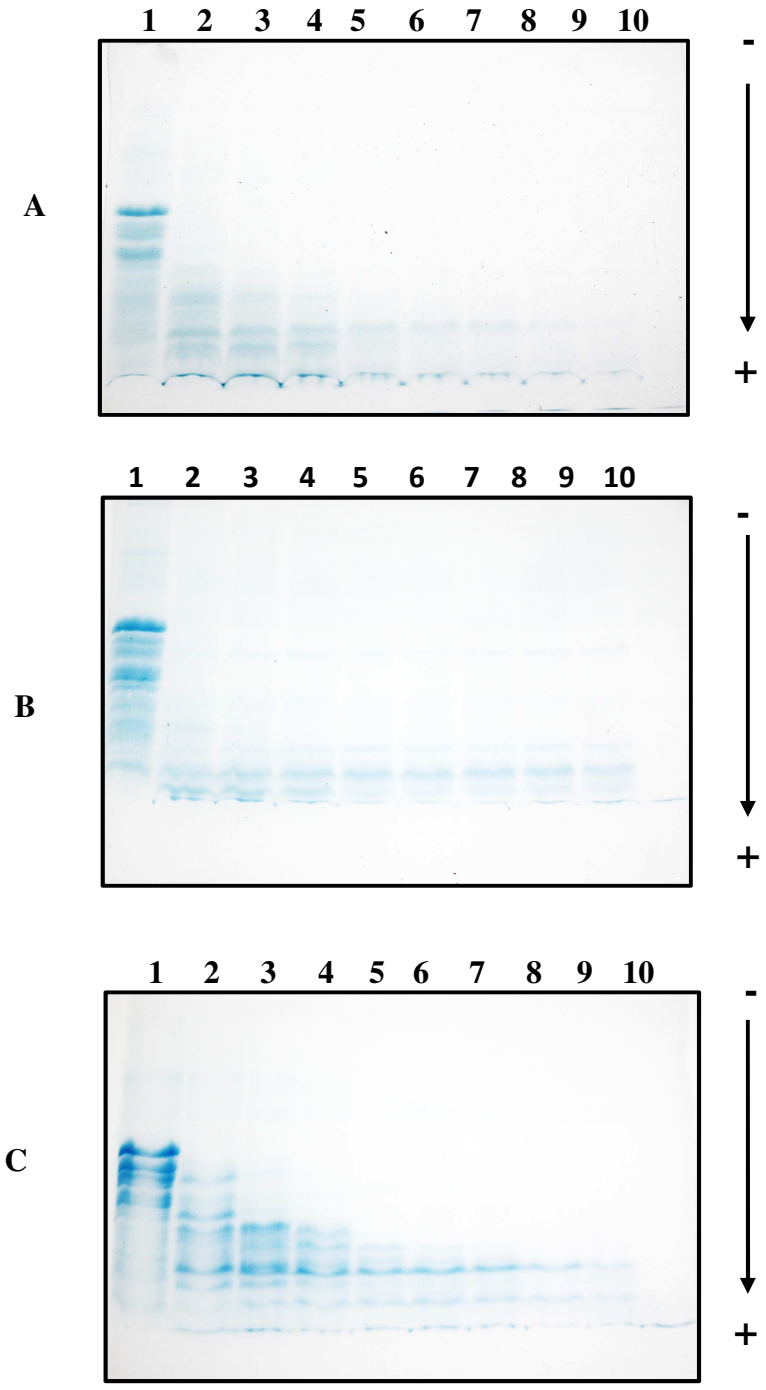


Figure 24 : Electrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats libérés après l'action de diverses protéases (A : Chymotrypsine ; B : Pepsine ; C : Trypsine) sur les caséines camelines totales. Gel de séparation : T = 15 %, C = 2,7 % ; gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %. 1 : caséines totales ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 et 10: temps d'incubation correspondant respectivement à 15 ; 20 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 ; 180 et 240 mn.

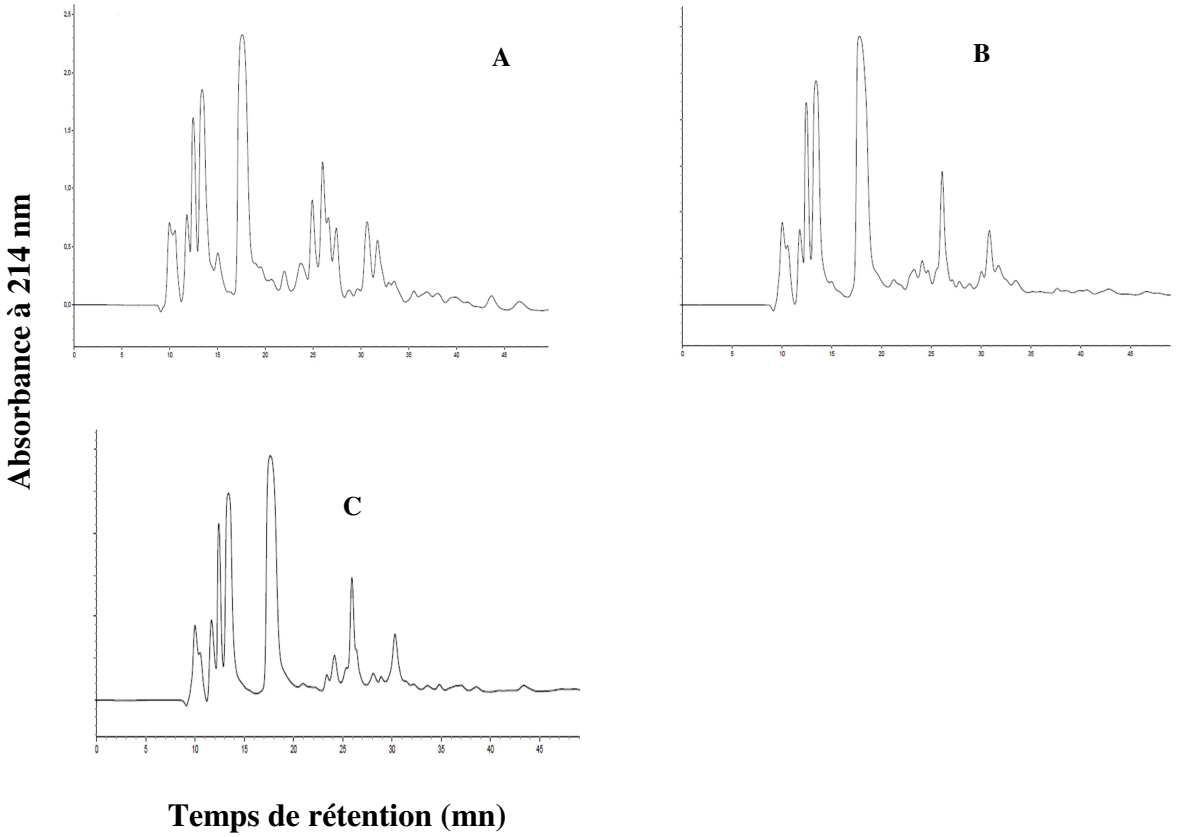


Figure 25: Chromatogramme en RP-HPLC (colonne C8) des hydrolysats des caséines camelines totales obtenus après 4 heures d'incubation. A : Pepsine ; B : Chymotrypsine ; C : Trypsine.

Les résultats de cette présente étude sont en accord avec ceux rapportés par Salami *et al*. (2008) et Si Ahmed *et al*. (2013) qui ont trouvé que les caséines de lait de chamelle étaient plus résistantes à l'action de la trypsine. Jrad *et al*. (2014) ont signalé aussi que les caséines camelines sont très sensibles à l'action de la pepsine.

L'étude menée par Adoui (2014) portant sur la recherche des peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines et camelines a montré que la pepsine et la trypsine ont une action plus poussée sur la caséine bovine comparée à leur action sur la caséine cameline et la chymotrypsine a un effet comparable sur les deux caséines.

Cependant, nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par Assem *et al.* (2018) qui ont conclu que les caséines camelines présentaient la vitesse d'hydrolyse la plus élevée avec la trypsine et la pepsine, tandis que les caséines bovines étaient plus rapidement hydrolysée par la chymotrypsine que les autres caséines étudiées.

Kumar *et al*. (2013) ont observé que les caséines du lait de yak sont plus sensibles à l'action de la pepsine que la chymotrypsine et la trypsine. Selon eux et, dans le cas des caséines bovines, c'est la trypsine qui donne des degrés d'hydrolyse les plus élevés. En 2016, ces mêmes auteurs ont signalés que les caséines camelines étaient plus sensibles à l'hydrolyse par la chymotrypsine que l'alcalase et la papaïne.

L'étude de Salami *et al*. (2008) sur la cinétique de l'hydrolyse des protéines des laits camelin et bovin par les enzymes pancréatiques a montré que les caséines étaient plus rapidement hydrolysées que les protéines du lactosérum, en raison de leurs grandes flexibilités et des structures ouvertes. Le degré d'hydrolyse des caséines bovines et camelines par la chymotrypsine était significativement plus élevé que celui de l'hydrolyse par la trypsine, ce qui est dû principalement au nombre de sites hydrolytiques potentiels pour la chymotrypsine.

Sur un autre plan, Al-Shamsi *et al.* (2018) ont montré que les hydrolysats de protéines du lait de dromadaire générés en utilisant des enzymes protéolytiques, telles que l'alcalase, la bromolaïne et la papaïne, améliorent les propriétés technofoctionnelles (activité émulsifiante, hydrophobie de surface, solubilité) et les activités antioxydantes (DPPH, ABTS).

3.1.3.2. Degré d'hydrolyse de la β-caséine cameline

Le nombre de liaisons peptidiques clivées par hydrolyse est souvent estimé en mesurant le degré d'hydrolyse (DH). Cette valeur de DH reflète le contenu des groupes amino libérés qui s'élève avec le degré d'hydrolyse. Les résultats de DH des hydrolysats de la β-CN cameline par l'action de la pepsine, trypsine et chymotrypsine sont donnés dans le tableau XIV.

Tableau XIV: **Degré d'hydrolyse (DH) des hydrolysats trypsique, pepsique et chymotrypsique de la β-CN cameline.**

Enzymes	DH (%)
Trypsine	11 ± 0,5
Chymotrypsine	28 ± 0,3
Pepsine	39 ± 0,1

L'hydrolysat pepsique a abouti à un degré d'hydrolyse le plus élevé (39 ± 0,1 %). La différence de DH entre ces hydrolysats pourrait être attribuée à plusieurs facteurs individuels ou combinés tels la vitesse de la réaction enzymatique, la spécificité de l'enzyme, l'affinité du substrat…etc (Dryakova *et al*., 2010).

Les DH obtenus dans ces essais, notamment ceux réalisés avec la pepsine et la chymotrypsine, sont plus élevés que ceux signalés par d'autres auteurs (Sun *et al*., 2012 ; Jiang *et al*., 2006; Corrêa *et al*., 2011) sur les caséines hydrolysées pendant 4 h par des protéases microbiennes de yak (4 %) et sur les caséines ovines (4,5 %). Lira *et al.* (2010) ont également signalé un DH de 28,17 % après hydrolyse des caséines de lait de chèvre par la papaïne.

Abu-Tarboush et Ahmed (2005) ont signalé que DH après 10 h de digestion de la caséine du lait de camelin par la pepsine (E/S de 2 %) suivi de la pancréatine (E/S : 4 %) était de 31,6 % et l'hydrolyse par trypsine (E/S : 2 %) suivi de la chymotrypsine (E/S : 4 %) a entraîné une augmentation de la valeur de DH supérieure à 25 %.

Jrad *et al*. (2014), en déterminant l'activité anti-oxydante des caséines du lait de chamelle tunisien avant et après la digestion enzymatique par la pepsine et la pancréatine, ont obtenu un DH égal à 19 %.

Kumar *et al*. (2016) ont étudié l'hydrolyse enzymatique des caséines camelines par des enzymes protéolytiques, à savoir l'alcalase, l'α-chymotrypsine et la papaïne et évalué l'activité antioxydante des hydrolysats. Le DH obtenu a augmenté après 6 h d'hydrolyse de 15, 20 et 23 %, respectivement pour la papaine, l'alcalase et la α-chymotrypsine. En plus, Carreira *et al*. (2003) ont recommandé que la durée de la réaction hydrolytique ne dépasse pas 5 h, car au-delà de ce temps, elle peut favoriser la contamination microbienne des préparations protéiques.

Par ailleurs, il a été constaté que l'allongement du temps d'hydrolyse libère souvent un mélange de peptides et d'acides aminés amers, ce qui peut déprécier fortement leur utilisation dans les produits alimentaires (Belitz et Grosch, 1999). De plus, selon Tsou *et al*. (2010), une hydrolyse limitée est requise pour maintenir la structure ou la séquence des peptides actifs et assurer ainsi leur fonctionnalité. C'est pour ces raisons que la production d'hydrolysats aux fins d'utilisations industrielles variées, doit tenir compte de tous ces aspects, notamment le coût et le bénéfice attendu.

3.1.3.3. Sensibilité de la β-caséine à l'action de la trypsine, chymotrypsine et pepsine

La sensibilité de la β-caséine cameline à l'action séparée des trois protéases (trypsine, pepsine et chymotrypsine) est représentée par les électrophorégrammes (Figure 26) où la cinétique d'hydrolyse de la β-CN cameline montre la disparition progressive de la bande correspondant à la β-caséine et l'apparition de plusieurs fragments peptidiques en fonction du temps.

La β-CN cameline est rapidement hydrolysée par la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. L'intensité de sa bande diminue au cours du temps d'incubation jusqu'à sa disparition totale après 15 mn (avec la pepsine et la chymotrypsine), contrairement à l'action de la trypsine, où l'intensité de la bande ne disparait qu'après 30 mn d'incubation. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Chang *et al*. (2013) qui ont également mentionné que β-CN était hydrolysée plus rapidement que les autres caséines.

La β-CN cameline possède 45 sites potentiels de clivage possibles pour la pepsine, 33 pour la chymotrypsine et 13 seulement pour la trypsine (http: / www.expasy.org). Ce qui explique les différences observées dans les cinétiques d'hydrolyse conduites avec ces enzymes et dans les hydrolysats analysés en RP-HPLC (Figure 27), où nous relevons que le profil de l'hydrolysat pepsique présente un plus grand nombre de pics comparé aux hydrolysats chymotrypsique et trypsique.

Comparé à d'autres protéines bovines, la β-CN est plus susceptible au clivage en raison de son accessibilité aux protéases (Sadat-Mekmene *et al*., 2011). Salami *et al*. (2008) ont rapporté que l'hydrolyse de la β-CN cameline et bovine par la chymotrypsine est complète après 5 mn d'hydrolyse.

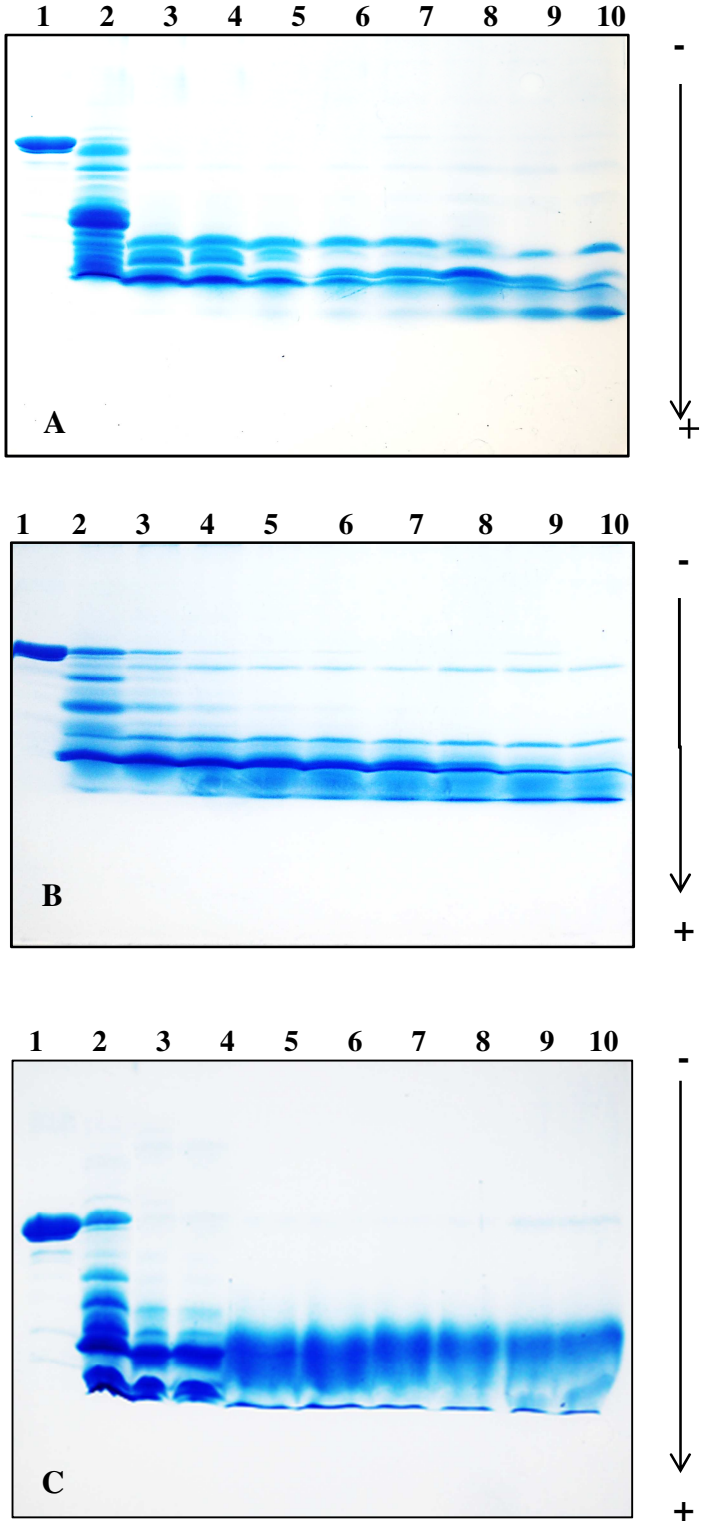


Figure 26 : Electrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action de diverses protéases (A : chymotrypsine ; B : trypsine ; C : pepsine) sur la beta caséine cameline. 1 : β-CN ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 et 10 : temps d'incubation correspondant respectivement à 15 ; 20 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 ; 180 et 240 mn.

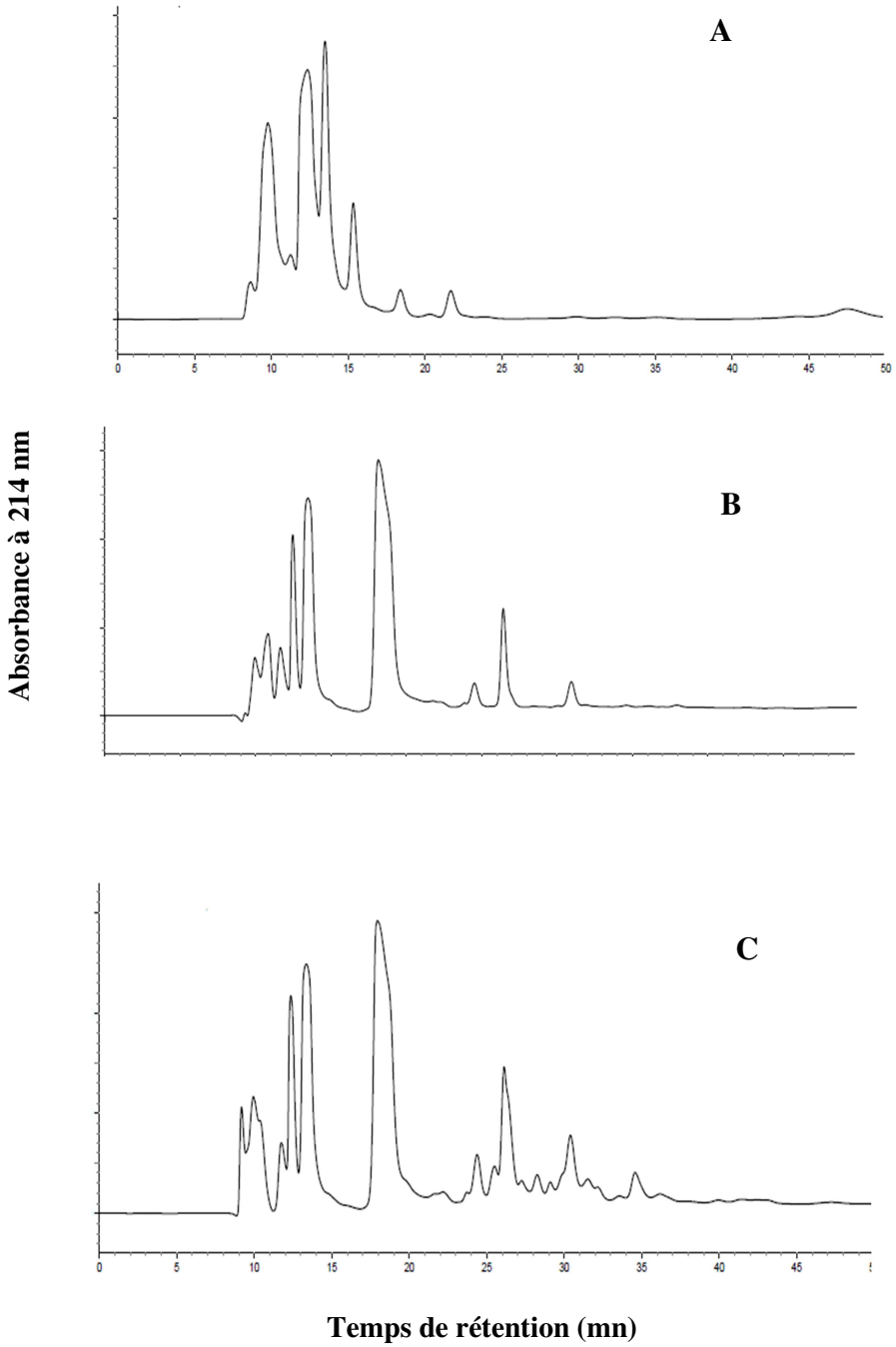


Figure 27 : Chromatogramme de l'hydrolyse de la β-caséine du lait de chamelle par les protéases digestives en RP-HPLC. (A) : hydrolysat trypsique ; (B) : hydrolysat chymotrypsique ; (C) : hydrolysat pepsique. Colonne utilisée : C8 ; débit : 0,2 mL ; T : 38 °C.

Chapitre 2 : Activités biologiques de la β-caséine cameline

3.2.1. Activité antioxydante

3.2.1.1. Test du DPPH

3.2.1.1.1. Effet sur les caséines totales et leurs hydrolysats

Les radicaux libres sont générés à partir de processus métaboliques normaux ou sont produits après avoir été stimulés par la lumière ultraviolette, les rayonnements ionisants et les réactions chimiques (Fubini et Hubbard, 2003). Ils peuvent conduire à l'accumulation de peroxydes lipidiques. Les radicaux libres excessivement produits peuvent endommager les biomolécules essentielles (Halliwell et Gutteridge, 1990). Par conséquent, le développement de substances qui peuvent atténuer ou empêcher la génération de radicaux libres est très important.

La présente expérimentation a consisté à évaluer la réduction du radical DPPH en mesurant la diminution de son absorbance à 517 nm en présence de caséines entières ou de leurs hydrolysats (pepsique, trypsique et chymotrypsique). Les résultats des essais réalisés (Tableau XV) sur la capacité de piégeage du radical DPPH par les caséines camelines, montrent que les hydrolysats, particulièrement celui obtenu avec la pepsine, atténuent fortement l'activité du DPPH, alors que les caséines initiales ont montré une faible activité antioxydante.

Tableau XV : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les caséines camelines et leurs hydrolysats.

	% d'inhibition du DPPH
CN camelines intactes	5,4 ± 1,2
Hydrolysat pepsique	70,29 ± 1,98
Hydrolysat trypsique	27,5 ± 1,76
Hydrolysat chymotrypsique	37,09 ± 1,43

L'activité antioxydante obtenue en dégradant les caséines avec la pepsine représente plus du double (70,29 ± 1,98) de celle mesurée avec la trypsine (27,5 ± 1,76) et la chymotrypsine (37,09 ± 1,43). Ces résultats suggèrent que les peptides et acides aminés libres libérés après hydrolyse (élevés dans le cas des hydrolysats pepsiques) ont agi comme des donneurs d'électrons avec une capacité d'interagir avec les radicaux libres pour mettre fin à la réaction d'oxydation.

Phelan *et al*. (2009) ont mentionné que l'activité du piégeage du DPPH est augmentée après la protéolyse des protéines alimentaires. Mais le type d'enzymes et la durée de l'hydrolyse affectent significativement l'activité antioxydante des caséines (Mao *et al*., 2011 ; Kumar *et al*., 2013 ; Luo *et al*., 2014 ; Pumpeth *et al*., 2016 ; Assem *et al*., 2018).

Les résultats obtenus lors de cette étude sont comparables à ceux de Kumar *et al*. (2016a) et Assem *et al*. (2018) qui ont montré que le piégeage du radical DPPH augmente avec l'augmentation du temps et du degré d'hydrolyse des caséines camelines.

Quand le degré d'hydrolyse est similaire (enzymes ayant des sites de coupures analogues), la variation de l'inhibition de DPPH pourrait être due aux différences de spécificités enzymatique et/ou la présence ou l'absence de groupes fonctionnels, tels que les groupes hydroxyles sur les composés phénoliques (Cumby *et al*., 2008).

Cependant, la nature du substrat initial et de l'enzyme considéré est à prendre en considération dans ces évaluations. Ainsi, Kumar *et al*. (2013) ont montré que la trypsine générait des hydrolysats à forte activité antioxydante à partir des caséines du lait de yak, suivie par la chymotrypsine et la pepsine. En 2016, ces mêmes auteurs ont rapporté que l'hydrolyse des caséines camelines par la chymotrypsine donne l'activité antioxydante la plus importante comparée à celles obtenues par l'action de la papaïne et de l'alcalase.

3.2.1.1.2. Effet sur la β-caséine et ses hydrolysats

La comparaison du piégeage des radicaux DPPH par la β-CN isolée et ses hydrolysats obtenus par action séparée de la pepsine, chymotrypsine ou de la trypsine sur cette protéine pendant 4h d'incubation (Figure 28 A) montre que l'activité anti-oxydante (ou % d'inhibition du DPPH) la plus importante est celle qui correspond aux hydrolysats pepsiques (de l'ordre de 70 %), suivie des hydrolysats chymotrypsique (40 %) et enfin trypsique (18 %). L'activité due à la protéine entière est relativement faible (de l'ordre de 6 %).

L'activité antiradicalaire en présence d'hydrolysat pepsique a été examinée en mesurant le pourcentage d'inhibition du DPPH en présence de deux types de fragments peptidiques, séparés par ultrafiltration selon leur masse moléculaire : fragments de taille inférieure à 1 kDa et fragments dont la taille est comprise entre 1 et 10 kDa (Figure 27 B).

Les résultats (Figure 28 B) montrent clairement que les fragments peptidiques de petite taille (inférieure à 1 kDa) sont ceux qui génèrent l'activité radicalaire la plus intense (environ 70 % d'inhibition), contre 18 % pour le second type de fragments.

Il a été établi que dans le lait bovin, la β-CN, qui contient 5 résidus Phe (numéro d'accès Swiss-Prot : P02666), produit des peptides antiradicalaires pendant la digestion gastro-intestinale ou la fermentation (Kansci *et al*., 2004). Comparativement à cet effet, la β-CN cameline a montré dans cette étude une activité antioxydante élevée après hydrolyse par les enzymes. Cet effet pourrait se justifier par le fait que cette protéine comprend 8 résidus Phe (numéro d'accession Swiss-Prot Q9TVD0), qui est un acide aminé aromatique hautement antiradicalaire. Tsopmo *et al.* (2011) ont signalé que la présence de résidus aromatiques confère une haute activité de balayage des radicaux libres vis à vis de peptides synthétiques. Selon ces auteurs, le résidu le plus efficace étant Trp.

L'activité antioxydante des peptides a été attribuée à certaines séquences d'acides aminés (Cys, Trp, Tyr, Met, Phe, His, Ile, Leu, Pro) (Suetsuna *et al*., 2000) ainsi qu'à un ensemble de conformation structurelle (Hernàndez-Ledesma *et al*., 2007).

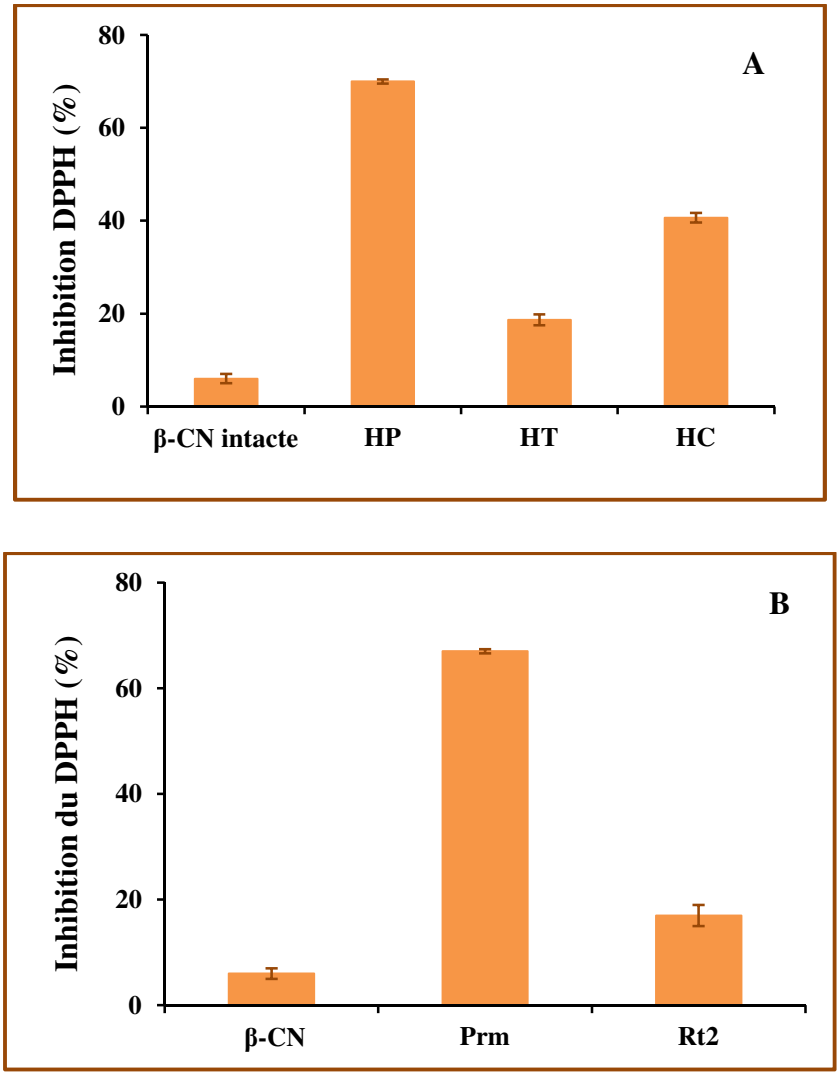


Figure 28 : Activité antiradicalaire (% inhibition du DPPH) en présence d'hydrolysats pepsiques, trypsiques ou chymotrypsiques de la β-caséine cameline (A) et des fragments peptidiques séparés par UF et issus de l'hydrolyse pepsique de β-caséine (B) ; HP : hydrolysat pepsique, HT : hydrolysat trypsique, HC : hydrolysat chymotrypsique, Prm (< 1 kDa) ; Rt2 (>1 kDa et < 10 kDa).

L'hydrophobicité du peptide semble également être un facteur important pour son activité antioxydante en raison de l'accessibilité accrue aux cibles hydrophobes (Chen *et al*., 1998). Les acides aminés hydrophobes, y compris les acides aminés aromatiques, peuvent augmenter l'activité de piégeage des radicaux (Hernàndez-Ledesma *et al*., 2005 ; Rajapakse *et al*., 2005).

Ren *et al*. (2008) ont également rapporté que les peptides basiques ont une plus grande capacité à piéger le radical hydroxyle que les peptides acides ou neutres. Par conséquent, la teneur élevée en acides aminés hydrophobes dans la β-CN cameline rend cette protéine propice à l'hydrolyse par la chymotrypsine et la pepsine. Aucun peptide antioxydant n'a été identifié jusqu'à l'heure actuelle.

La plupart des peptides biologiquement actifs sont constitués de 2 à 20 acides aminés (Meisel et Bockelmann, 1999) avec une masse moléculaire inférieure à 6 kDa (Sun *et al*., 2012). L'étude menée par Chen et Li (2012) sur l'effet de poids moléculaire sur la survivabilité des peptides antioxydants, dérivés des caséines après la digestion gastro-intestinale simulée a montré que les peptides dont le PM est inférieur à 1 kDa présentaient les meilleures activités antioxydantes.

Jeon *et al*. (2000) et Kim *et al*. (2007) ont signalé que les propriétés fonctionnelles des peptides antioxydants sont fortement influencées par la masse moléculaire. Les résultats de l'étude de Chang *et al*. (2013) sur hydrolyse des caséines bovines par *Bifidobacterium longum* KACC91563 et les activités antioxydantes des peptides dérivés ont montré que l'activité de balayage des radicaux libres la plus élevée est obtenue avec la fraction de peptides de taille inférieure à 3 kDa.

Plusieurs auteurs ont signalé que les peptides les plus efficaces en termes de piégeage des radicaux libres ont des tailles moléculaires inférieures à 3 kDa (Salami *et al*., 2011 ; El Hatmi *et al*., 2016 ; Rahimi *et al*., 2016). Cependant, Tagliazucchi *et al*. (2016a) ont trouvé que les fractions peptidiques de 5 et 10 kDa, préparées à partir de lait de dromadaire fermenté avec *Lactobacillus rhanosus*, avaient l'activité de piégeage des radicaux libres la plus élevée.

3.2.1.2 Activité réductrice du fer

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer-ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) (figure 29 A) est assez comparable à celle déterminée par le test de piégeage du DPPH. La β-CN cameline native possède le plus faible pouvoir réducteur (autour de 0,025) et l'hydrolysat pepsique le pouvoir le plus élevé (0,23). Là aussi les fragments peptidiques issus de l'hydrolyse pepsique (Figure 29 B) donnent une allure similaire que précédemment avec un maximum d'activité pour la fraction qui renferme le fragment de masse moléculaire inférieure à 1 kDa. Néanmoins, les différences de comportement entre les deux types de fragments ne sont pas aussi nettes que dans le cas de l'intervention du radical DPPH.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Kumar *et al*. (2016) qui ont mentionné une élévation du pouvoir réducteur des caséines camelines après leur hydrolyse par l'alcalase, l'α-chymotrypsine et la papaïne. Des travaux antérieurs ont également observé que les peptides de petites tailles, libérés par les enzymes protéolytiques, présentaient une meilleure puissance de réduction que les fractions de poids moléculaires élevés (Bougatef *et al*., 2009; Ajibola *et al*., 2011).

Par ailleurs, Klompong *et al*. (2007) ont signalé que le degré d'hydrolyse ainsi que la nature des enzymes utilisées jouent un rôle essentiel dans le pouvoir réducteur des hydrolysats de protéines. Wu *et al*. (2003) ont estimé que les différences dans l'activité antioxydante des hydrolysats de protéines sont attribuées à la composition spécifique des peptides et des acides aminés. Ainsi, plusieurs auteurs ont rapporté que les peptides contenant des résidus d'acides aminés tels Asp, Pro, Trp, Tyr, Met, Cys, Leu, Arg, Ala et His ont les activités antioxydantes plus élevées (Sarmadi et Ismail, 2010 ; Li *et al*., 2011 ; Ji *et al*., 2014).

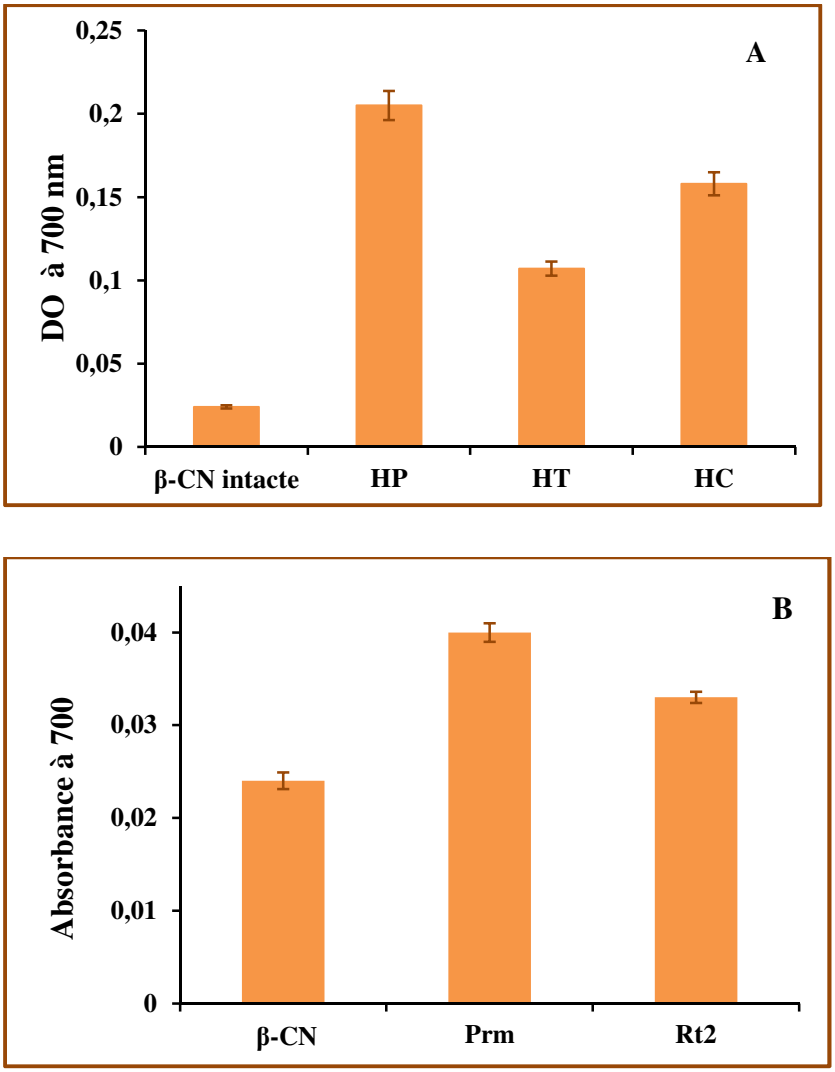


Figure 29 : Pouvoir réducteur des hydrolysats pepsiques, trypsiques et chymotrypsiques de la β-caséine cameline (A) et des fragments peptidiques séparées par UF et issus de l'action de la pepsine (B) ; HP : hydrolysat pepsique, HT : hydrolysat trypsique, HC : hydrolysat chymotrypsique ; Prm (< 1 kDa) ; Rt2 (> 1 kDa et < 10 kDa.

3.2.2. Activité antibactérienne de la β-caséine cameline et de son hydrolysat pepsique

3.2.2.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Partant des résultats obtenus de l'activité antioxydante qui est plus probante pour les hydrolysats pepsiques de la β-CN, nous nous sommes proposé d'évaluer l'activité antibactérienne de cette protéine avant et après hydrolyse par la pepsine. Cette activité est mise en évidence selon la méthode de dilution en microplaque et les hydrolysats sont testés contre 2 souches à Gram-positif : *Listeria innocua* **ATCC** 33090**,** *Staphylococcus aureus* **CNRZ 3** et 1 souche à Gram-négatif : *Escherichia coli* **ATCC** 25922.

Les courbes de croissance des souches testées en présence des composés protéiques sont représentées sur la figure 30 et les pourcentages d'inhibition des trois souches, après 24 h d'incubation, sont rapportés dans le tableau (XVI).

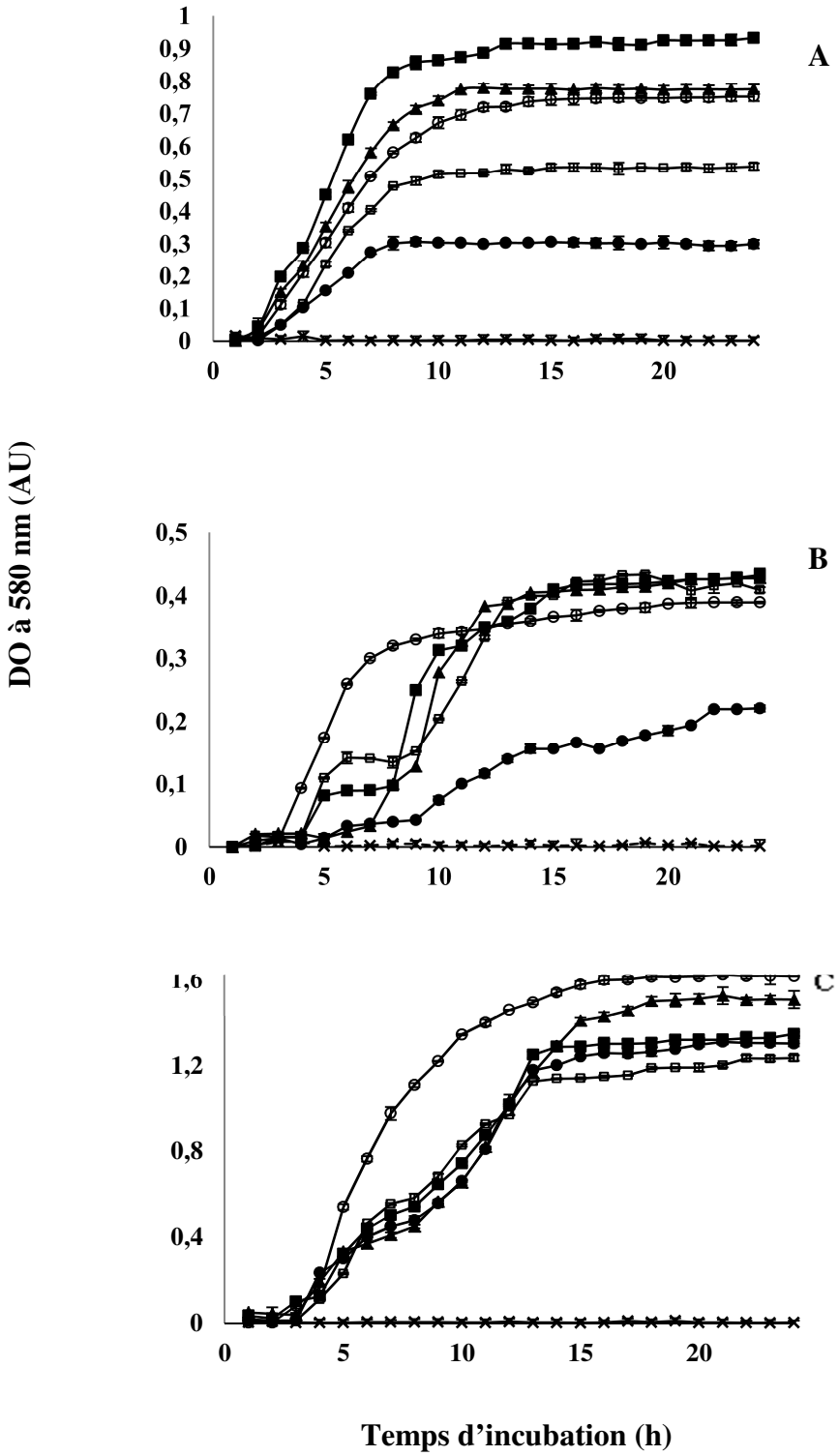


Figure 30 : Courbes de croissance à 37 °C dans le bouillon Muller Hunter de *Staphyloccocus aureus* CNRZ3 (a) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (b) et à 30 °C de *Listeria innocua* ATCC 33090 (C) en présence de la β-CN et ses hydrolysats à une concentration de 1 mg/mL. Souche (contrôle positif) (○), β-caséine cameline (■), Rt1 (▲), Rt2 (□), Prm (●), les témoins négatifs (x) : la ciproflaxacine (2 g/L) pour *E. coli* et nisine à 2,4 UI/L pour *Staph. aureus* et *L. innocua.*

Tableau XVI : Les pourcentages d'inhibition de *Staph. aureus CNRZ3, L. innocua ATCC 33090* et *E. coli ATCC 25922* en présence de la β-caséine cameline et de ses hydrolysats peptiques.

	β-CN	Rt1	Rt2	Prm
		% d'inhibition		
***Staph.. aureus* CNRZ3**	+ 24,03 ± 0,2 *P* < 0,001	+ 3,04 ± 0,1 *P* = 0,034	- 29,2 ± 0,6 *P* < 0,001	- 58,3 ± 0,8 *P* < 0,001
***L. innocua* ATCC 33090**	+ 10,15 ± 0,3 *P* = 0,72	+ 9,98 ± 0,1 *P* = 0,52	+ 6,27 ± 0,3 *P* = 0,42	- 45,8 ± 0,4 *P* < 0,001
***E. coli* ATCC 25922**	- 18,2 ± 0,5 *P* < 0,001	- 12,3 ± 0,5 *P* < 0,001	- 25,6 ± 0,5 *P* < 0,001	- 19,3 ± 0,2 *P* < 0,001

p values < 0,05 ; (+): stimulation de la croissance bactérienne; (-): inhibition de la croissance bactérienne. La nisine (2400 UI/ mL) pour *Staph. aureus* et *L. innocua* et la ciproflaxacine (2 mg/L) pour *E. coli*, ces concentrations sont suffisantes pour induire 100 % d'inhibition de la croissance.

La β-CN cameline et les fractions d'hydrolyse dont le poids moléculaire est supérieur à 10 n'ont pas inhibé la croissance des deux souches à Gram positif (*Staph. aureus* et *L. innocua*). Les peptides de masse molaire comprise entre 1 et 10 kDa, ont inhibé la croissance de *Staph. aureus,* mais au contraire, ils ont activé celle de *L. innocua*. Cependant, la croissance d'*E. coli* a été inhibée par la β-CN native et ses hydrolysats pepsiques à une concentration de 1 mg/L.

La fraction peptidique de poids moléculaire inférieure à 1 kDa a inhibé la croissance des trois souches testées. Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *Staph. aureus, L. innocua* et *E. coli* 24 après d'incubation sont respectivement égales à 58.3 ± 0.8, 45.8 ± 0.4 et 19.3 ± 0.2.

Par rapport à la taille des peptides, les résultats obtenus sont conformes avec les conclusions de Silva et Macalta (2005) et Jrad *et al*. (2015). Selon ces auteurs, les fragments antibactériens dérivés des caséines ont une masse moléculaire entre 4 et 6 kDa. Benkerroum (2010) a signalé que le poids moléculaire de peptides antimicrobien est inférieur à 10 kDa avec un nombre de résidus d'acides aminés compris entre 3 et 10.

Il est maintenant bien connu qu'outre le rôle physiologique principal des CN comme source d'acides aminés requis pour la croissance du nouveau-né, ces protéines peuvent contenir des peptides cryptés dans leurs séquences, qui peuvent présenter diverses activités biologiques une fois libérées.

Les CN hydrolysées sont des mélanges très complexes qui peuvent contenir jusqu'à des centaines de peptides différents (Silva *et al*., 2006). De tels peptides peuvent être libérés *in vivo* après digestion, *in vitro* par hydrolyse enzymatique, ou pendant la fermentation à la suite de l'action de protéases produites par des bactéries lactiques. Les hydrolysats des CN et les peptides bioactifs dérivés ont montré plusieurs activités biologiques (Silva et Malcata, 2005).

L'activité antimicrobienne du lait de dromadaire et sa fraction de protéines sériques a été explorée (Benkerroum *et al.,* 2004) ; Salami *et al*. 2011). Lafta *et al.* (2014) ont évalué l'activité antibactérienne du lait camelin fermenté contre trois bactéries pathogènes *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Les résultats ont montré une forte activité de ce lait contre ces bactéries. Yassin *et al*. (2015) ont étudié les effets protecteurs du lait de dromadaire contre la pathogénicité induite par *Staph. aureus* et *E. coli* chez les rats Wistar. Ces chercheurs ont conclu que ce lait joue un rôle bénéfique en tant que complément alimentaire antibactérien contre la pathogénicité de ces deux souches.

L'activité antibactérienne des caséines camelines avant et après l'hydrolyse par les enzymes gastro-intestinales contre 3 bactéries à Gram positif (*Listeria innocua*, *Bacillus cereus* et *Staph. aureus nosoco*) et 2 bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été testées (Jrad et *al*. 2014). Ces auteurs ont montré que l'activité antibactérienne des caséines camelines a augmenté après hydrolyse enzymatique, principalement pour les fragments ayant un poids moléculaire inférieure à 1 kDa.

De plus, Kumar *et al*. (2016) ont évalué l'activité antibactérienne des hydrolysats de caséines camelines obtenus après l'action de l'alcalase, la α-chymotrypsine et la papaïne contre *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staph. aureus* et *Escherichia coli*. Ces auteurs ont observé que les hydrolysats entiers présentaient plus de fonctionnalités (antioxydante et antimicrobienne) par rapport aux fractions non hydrolysées.

Plusieurs chercheurs ont étudié et caractérisé les peptides antimicrobiens libérés après hydrolyse des caséines de diverses espèces laitières. López-Expósito *et al*. (2006) ont rapporté que les hydrolysats pepsiques de la caséine αs_2 ovine inhibaient la croissance de diverses bactéries à Gram positif. Recio et Visser (1999) ont signalé que la digestion par la pepsine de la caséine αs_2 bovine a libéré deux domaines antibactériens, f (164-179) et f (183-207), ce qui inhibait considérablement *E. coli*, *Bacillus cereus* et *Streptococcus thermophilus*.

Dans une étude de Baranyi *et al*. (2003), trois peptides ont également été isolés à partir d'hydrolysat de la caséine du lait de lapines. Ces peptides ont inhibé la croissance de deux souches à Gram positif, mais aucune inhibition n'a été obtenue contre les souches à Gram négatif.

L'étude de Birkemo *et al*. (2009) a montré la présence de trois peptides antimicrobiens dans le colostrum bovin frais. Deux peptides, casécidine 17 et casécidine 15, étaient identiques aux séquences établies dans la partie C-terminale de la β-caséine bovine : (YQEPVLGPVRGPFPIIV et YQEPVLGPVRGPFPI), qui ont des masses moléculaires correspondantes à 1881,00 et 1669,06, respectivement. Le troisième peptide était le peptide isracidine connu, qui a une masse de 2763,80 et la séquence correspondante : RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRF.

Les différences dans l'activité antimicrobienne des hydrolysats entiers et de leurs fractions peuvent être attribuées aux différences de taille, de nature ionique et de concentration des peptides présents dans la solution. Il a été rapporté que l'efficacité antibactérienne des peptides bioactifs dépend de plusieurs facteurs, y compris la charge, la diversité structurale (Gennaro et Zanetti, 2000), l'hydrophobicité (Kustanovich *et al*., 2002) et la composition spécifique d'acides aminés tels que His, Arg, Pro, Cys et Gly (Andreu et Rivas, 1998).

Les peptides antimicrobiens d'origine animale et végétale présentent une grande diversité structurale. Beaucoup de peptides ont des structures hélicoïdales. La majorité de ces peptides sont cationiques et amphipathiques, mais il existe également des peptides hydrophobes qui possèdent une activité antimicrobienne (Epand et Vogel, 1999). Certains peptides antimicrobiens sont composés de 12 à 45 acides aminés et ont une charge positive nette et une teneur élevée en résidus hydrophobes (Hankock et Leher, 1998). Bien que des antibiotiques plus puissants soient disponibles, les peptides antimicrobiens montrent les avantages de pouvoir tuer les cellules cibles rapidement et avoir un large éventail d'activités, y compris celles relatives à la destruction de certains agents pathogènes, les plus résistants aux antibiotiques.

Le site principal d'action des peptides antimicrobiens est la membrane cytoplasmique, où ils ont tendance à se rassembler pour former des canaux (Bechinger, 1997 ; Benkerroum, 2010). Les peptides antimicrobiens perturbent l'intégrité de la membrane des cellules microbiennes via des interactions électrostatiques, inhibant la synthèse des protéines, de l'ADN et de l'ARN, ou interagissent avec des protéines spécifiques cibles intracellulaires (Bahar et Ren, 2013). Ainsi, les différences dans la composition de la membrane entre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sont des facteurs importants pour l'activité antimicrobienne. Les parois cellulaires des bactéries à Gram négatif sont plus complexes que les bactéries à Gram positif, ayant une membrane externe unique, riche en lipopolysaccharides, phospholipides, lipoprotéines et différentes protéines.

Les molécules peptidiques, après avoir traversé la membrane externe de la cellule bactérienne, se lient à la membrane cytoplasmique chargée négativement. Par conséquent, l'hydrophobicité de ces molécules semble faciliter des interactions importantes avec la bicouche lipidique (Oren *et al*., 1997).

Ainsi, l'hydrophobicité d'un peptide peut renforcer son activité antimicrobienne (López-Expósito *et al*., 2006b). Ces auteurs ont signalé une activité antibactérienne accrue de peptides hydrophobes dérivés de caséines αS2 et κ. Cependant, certains auteurs n'ont pas réussi à établir une corrélation entre l'activité antibactérienne et l'hydrophobicité (Giangaspero *et al*., 2001; Pathak *et al*., 1995).

La présence d'une activité antimicrobienne dans les hydrolysats de caséines (αs1-αs2 et κ-caséine) du lait de vache, de brebis et de bufflonnes a été rapportée (Zucht *et al*., 1995; Recio et Visser, 1999; López-Pósito *et al*., 2006).

Plusieurs peptides antimicrobiens ont été identifiés à partir d'hydrolysats des caséines bovines, principalement l'isracidine et la casicidine (Lahov et Regelson, 1996).

Les casécidines sont les premiers peptides antimicrobiens obtenus après hydrolyse de la caséine αs1 par la pepsine (Lahov *et al*., 1971), qui sont des glycopeptides avec une masse moléculaire relativement élevée. Isracidin est un peptide antimicrobien constitué de 23 acides aminés et libéré après hydrolyse de la caséine αs1 par la chymosine (f 1-23) (Hill *et al.*, 1974). Ce peptide est actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif à une concentration qui varie entre 0,1 et 1 mg/mL (Hill *et al*., 1974 ; Floris *et al.*, 2003 ; Hayes *et al*., 2006).

Les fragments cationiques de la caséine bovine αs2, f183-207 et f164-179, obtenus par digestion par la pepsine se sont révélés antimicrobiens contre des bactéries Gram positives et négatives (Recio et Vesser, 1999).

Un peptide antibactérien correspondant à f(184-210) de la β-CN a été identifié dans l'hydrolysat de caséinate de sodium humain. Il a montré un très large spectre d'inhibition contre les bactéries à Gram positif et négatifs comme *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella spp*., *Yersinia enterocolitica* et *Staphylococcus aureus* (Minervini *et al*., 2003).

L'étude faite par Adoui (2014) sur la recherche des peptides antimicrobiens à partir des caséines du lait de dromadaire algérien a montré que la pepsine peut générer des peptides antibactériens. Les peptides actifs identifiés correspondent aux fragments (66-90), (83-98), (109-126) de la caséine αs1 ; (106-129), (1-19) et (126-142) de la αs2 ; (22-43), (52-69), (50-67) et (77-95) de la caséine β et (121-141), (116-136), (83-100), (106-124), (12-27) et (61-79) de la caséine κ.

L'hydrolyse trypsique de la β-CN du lait de lapine a donné plusieurs peptides antimicrobiens (Baranyi *et al*., 2003). Parmi les peptides identifiés, le fragment (64-67) était le peptide le plus actif mais uniquement sur les bactéries à Gram positif. L'hydrolyse du lait humain par la protéase de *Lactobacillus helvetisus* PR4 a libéré un peptide correspondant au fragment (184-210) de la β-CN (Minervini *et al*., 2003).

L'activité antibactérienne des protéines sériques du lait camelin a été étudiée par de nombreux auteurs (El-Agamy *et al*., 1992 ; El-Agamy,1994). Ils ont conclu que ce lait contenait une variété de protéines protectrices qui contribuent à l'inhibition de la croissance bactérienne (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase et immunoglobuline). L'activité de ces protéines protectrices a été testée contre *Lactococcus lactis subsp*. *Cremoris*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium.* Ces mêmes auteurs ont découvert que l'activité antibactérienne de lysozyme du lait de dromadaire était similaire à celui du lysozyme du blanc d'œuf mais diffère de l'homologue bovin. La lactoperoxydase du lait de chamelle était bactériostatique contre les souches à Gram positif et bactéricide contre les souches à Gram négatif, mais les immunoglobulines ont eu peu d'effet contre les bactéries.

En 2016, Othman a rapporté que le lait camelin peut être utilisé *in vitro* comme un moyen naturel pour inhiber certaines bactéries pathogènes (*Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae*). Benkerroum *et al*. (2004) ont rapporté que ce lait a un effet bactériostatique contre *E. coli* et *Listeria monocytogenes*, tandis que le colostrum est bactéricide contre *E. coli* et bactériostatique contre *L. Monocytogènes*. Cette étude a également comparé l'effet antimicrobien du lait cru camelin et du lait chauffé, déduisant que le lait cru est plus efficace. Ce qui suggère que le processus de traitement thermique aurait peut-être détruit, au moins en partie, certains des systèmes inhibiteurs présents dans le lait.

3.2.2.2.Identification des peptides actifs issus de l'hydrolysat pepsique de la β-caséine

La fraction peptidique de la β-CN cameline dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa a été analysée en LC/nESI–MS/MS. Les séquences des peptides contenus dans cette fraction sont données dans le tableau (XVII).

Les résultats obtenus indiquent la présence de 129 peptides dans cette fraction. Les séquences peptidiques correspondant aux masses obtenues ont été déterminées en employant le serveur **ExPASy** (Expert Protein Analysis System).

Il est à noter que les peptides identifiés, correspondant à des fragments issus de l'hydrolyse par la pepsine de la β-CN cameline, n'ont pas été signalés dans des études précédentes.

Les peptides antimicrobiens connus de la β-CN des mammifères sont libérés majoritairement des régions : f(50-70) et f(184-210) de la protéine native (Lahov et Regelson 1996 ; Baranyi *et al*. 2003; Minervini *et al*. 2003; Birkemo *et al*. 2008). L'analyse de la séquence de la β-CN cameline et la comparaison des séquences peptidiques révèle que 10 peptides sont générés dans la première région f(50-70) et 7 dans la seconde (f(184-210).

Cependant, l'alignement des séquences de 129 peptides identifiés de la fraction < 1 kDa de la β-CN cameline avec les peptides enregistrés dans la base des données AMP montre que deux peptides uniquement : f(193-204) (PFQEPVPDPVRG, 1338 Da) et f(193-213) (PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV, 2318 Da), présentent au moins 50 % de similitude avec des peptides antimicrobiens connus, à savoir respectivement : AP01399 (50 %) et AP01398 (52.38 %). Ces deux peptides correspondent aux casécidine 15 (f : 193-207 ; 1669 g/mol) et casécidine 17 (f : 193-209 ; 1881 Da) de la caséine β du colostrum bovin.

La comparaison des séquences a révélé que chaque fragment possède au moins 4 résidus de Pro. De plus, 8 résidus d'acides aminés du fragment f(194-204) de la β-CN cameline et de la casécidine 15 sont identiques (Figure 31).

.

Tableau XVII : Peptides identifiés dans la fraction de masse moléculaire inférieure à 3 kDa issus de l'hydrolysat pepsique de la β-CN cameline

Séquence de peptides	Position	Séquence de peptides	Position	Séquence de peptides	Position
EKEEFKTAGE	2-11	MDVPKTKE	94-101	LENLHLPLPLLQ	131-142
REKEEFKTAGE	1-11	PFLQPKVMDVPKTKE	87-101	LHLPLPLLQ	134-142
REKEEFKTAGEAL	1-13	VPFLQPKVMDVPKTKE	86-101	TDLENLHLPLPLLQ	129-142
KIEEQQQTEDEQQDKI	35-50	VPFLQPKVMDVPKTKE	86-101	ENLHLPLPLLQS	132-143
DKIYTFPQPQS	48-58	IIPKRKEMPLL	103-113	ENLHLPLPLLQSLM	132-145
DEQQDKIYTFPQPQSL	44-59	TIIPKRKEMPLL	102-113	YQIPQPVPQTPMIPPQS	146-162
DKIYTFPQPQSL	48-59	VPFLQPKVMDVPKTKETIIPKRKEMPLL	86-113	MYQIPQPVPQTPMIPPQSL	145-163
EQQDKIYTFPQPQSL	45-59	TIIPKRKEMPLLQS	102-115	YQIPQPVPQTPMIPPQSL	146-163
KIEEQQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	35-59	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFT	102-121	YQIPQPVPQTPMIPPQSL	146-163
KIYTFPQPQSL	49-59	PVVPFTE	116-122	YQIPQPVPQTPMIPPQSLL	146-164
QKIEKFKIEEQQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	29-59	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTE	102-122	KVLPVPQQ	170-177
QQDKIYTFPQPQSL	46-59	PVVPFTES	116-123	FKVLPVPQQM	169-178
QQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	39-59	QSPVVPFTES	114-123	KVLPVPQQM	170-178
DKIYTFPQPQSLV	*48-60*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTES	102-123	KVLPVPQQMVPYP	170-182
YTFPQPQSLV	*51-60*	PVVPFTESQ	116-124	FKVLPVPQQMVPYPQR	169-184
HTEPIPYPIL	*63-72*	QSPVVPFTESQ	114-124	KVLPVPQQMVPYPQR	170-184
SHTEPIPYPIL	*62-72*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQ	102-124	PVPQQMVPYPQR	173-184
VYSHTEPIPYPIL	*60-72*	MPLLQSPVVPFTESQS	110-125	FKVLPVPQQMVPYPQRA	169-185
YSHTEPIPYPIL	*61-72*	PVVPFTESQS	116-125	KVLPVPQQMVPYPQRA	170-185
VYSHTEPIPYPILPQN	*60-75*	QSPVVPFTESQS	114-125	KVLPVPQQMVPYPQRAM	170-186
YSHTEPIPYPILPQN	*61-75*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQS	102-125	KVLPVPQQMVPYPQRAMPV	170-188
VYSHTEPIPYPILPQNF	*60-76*	PVVPFTESQSL	116-126	FKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	169-189
YSHTEPIPYPILPQNF	*61-76*	QSPVVPFTESQSL	114-126	KVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	170-189
PQNFLPPLQ	73-81	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSL	102-126	MVPYPQRAMPVQ	178-189
PQNFLPPLQPA	73-83	PVVPFTESQSLT	116-127	QMVPYPQRAMPVQ	177-189
PQNFLPPLQPAV	73-84	QSPVVPFTESQSLT	114-127	SLSQFKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	165-189
VYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAV	60-84	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLT	102-127	SQFKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	167-189
FLPPLQPAVM	76-85	LQSPVVPFTESQSLTL	113-128	VLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	171-189
HTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	63-85	PVVPFTESQSLTL	116-128	VPYPQRAMPVQ	179-189
LPPLQPAVM	77-85	QSPVVPFTESQSLTL	114-128	KVLPVPQQMVPYPQRAMPVQA	170-190
LVYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	59-85	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLTL	102-128	*AVLPFQEPVPD*	*190-200*
NFLPPLQPAVM	75-85	DLENLHLPLPLL	130-141	*AVLPFQEPVPDPVRG*	*190-204*
PPLQPAVM	78-85	ENLHLPLPLL	132-141	***PFQEPVPDPVRG***	***193-204***
PQNFLPPLQPAVM	73-85	LENLHLPLPLL	131-141	*AVLPFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV*	*190-213*
SHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	62-85	LHLPLPLL	134-141	***PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV***	***193-213***
VYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	60-85	LTDLENLHLPLPLL	128-141	*PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVI*	*193-216*
YSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	61-85	LTLTDLENLHLPLPLL	126-141	*AVLPFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVIA*	*190-217*
PQNFLPPLQPAVMV	73-86	NLHLPLPLL	133-141	LHPVPQPLVPVIA	205-217
VPFLQPKVM	86-94	QSPVVPFTESQSLTLTDLENLHLPLPLL	114-141	PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVIA	193-217
VPFLQPKVMD	86-95	TDLENLHLPLPLL	129-141	PVRGLHPVPQPLVPVIA	201-217
VPFLQPKVMDV	86-96	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLTLTDLENLHLPLPLL			
VPFLQPKVMDVPKT	86-99				
VPFLQPKVMDVPKTK	86-100	TLTDLENLHLPLPLL			

Le type italique indique des séquences de peptides antimicrobiens générés à partir de β-CN bovin, humain et de lapin. Le type gras indique des séquences de peptides identifiés qui présentent une similitude d'au moins 50 % avec les peptides antimicrobiens enregistrés dans la base de données AMP.

Casecidin 15	
+ Y Q E P V L G P V R G P F P I	**bovin**
P F Q E P V P D P V R G + + + +	**camelin**
Casecidin 17	
+ Y Q E P V L G P V R G + + P F P + I I V	**bovin**
P F O E P V P D P V R G L H P V P O P L V	**camelin**

Figure 31 : Alignement des séquences des casécidines 15 et 17 du colostrum bovin avec les peptides f (193-204) et f (193-213) de la β-CN du lait camelin générés à partir de la base de données AMP.

3.2.2.3. Modélisation du fragment (193-204) de la β-caséine

Considérant que les acides aminés 193 à 204 étaient communs aux 2 peptides antimicrobiens putatifs obtenus avec la prédiction de la base de données AMP et que cette séquence était très similaire à l'extrémité N-terminale des casecidines, le modèle peptidique (Figure 32) a été proposé.

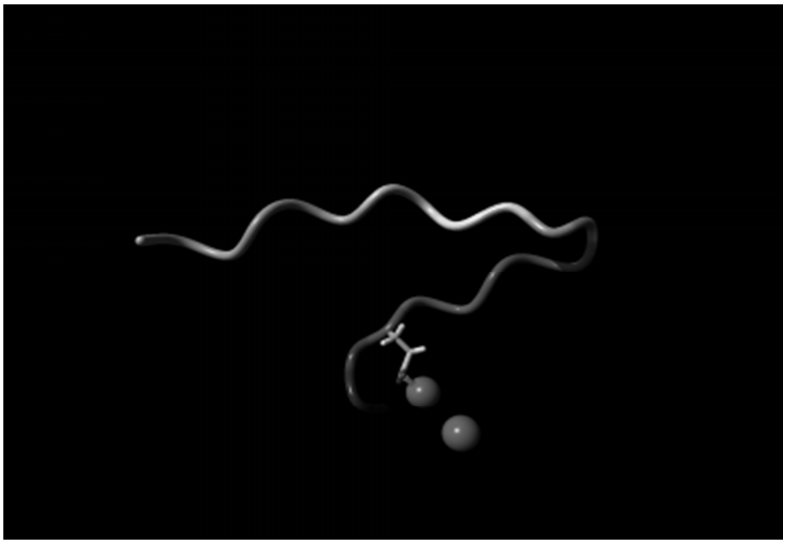


Figure 32 : Modèle d'homologie de fragment (193-204) de la β-caséine cameline à partir de la structure 4O6J PDB. Les deux sphères sont des ions de fer.

Le modèle d'homologie de fragment (193-204) de la β-caséine cameline montre une structure amphiphile similaire à celle des casécidines 15 et 17 ((Birkemo *et al*., 2009).
De par cette structure, ces 2 peptides sont susceptibles d'agir sur la membrane bactérienne et provoquer ainsi l'effet antibactérien constaté.

Au niveau dynamique moléculaire, la structure de la protéine varie au cours de la première moitié de la simulation pour être complètement ouverte au milieu. Les ions Fe^{2+} interagissent avec la fonction carboxylique de l'extrémité acide de la protéine et à proximité de la configuration en « épingle à cheveux ». Le groupe carboxyle C-terminal interagit avec une molécule d'eau qui interagit elle-même avec l'une des cinq molécules d'eau de la première couche de solvant. Ce pont d'interaction est conservé pendant toute la seconde moitié de la simulation de dynamique moléculaire et stabilise radicalement le système.

La protéine a un noyau hydrophobe composé de Pro, Val, Pro, Val, Pro, Pro et Leu. Ces résidus interagissent par des interactions hydrophobes. Ce type d'interaction est très faible, mais les interactions électrostatiques avec les ions Fe^{2+} font une sorte de cavité qui maintient la structure dans une conformation très stable. Ainsi, le peptide peut être stabilisé par la présence de cations bivalents tels que Fe^{2+}. Ces observations amènent à conclure que l'activité antimicrobienne du f (193-204) et f (193-213) de β-CN cameline pourrait résulter d'une perturbation de la membrane bactérienne, comme cela avait été suggéré précédemment pour leurs homologues bovins et/ou l'appauvrissement en cations des milieux de culture par ces 2 peptides identifiés.

Cependant, d'autres études sont maintenant nécessaires pour vérifier si d'autres souches bactériennes à Gram-négatif sont également moins sensibles aux fragments peptiques du β-CN et pour explorer le mécanisme réel conduisant à l'inhibition de la croissance microbienne, en relation avec les propriétés membranaires et le piégeage du fer ou d'autres cations.

Notons que l'hélice α est un motif abondant chez les peptides antimicrobiens. Cette structure, caractérisée par des régions hydrophobes et hydrophiles bien distinctes de part et d'autre de l'axe de l'hélice, permet une interaction optimale avec la structure amphiphile des phospholipides composant les membranes biologiques (Brogden, 2005). Parmi les peptides antimicrobiens cationiques et amphiphiles les plus étudiés, on note les peptides antimicrobiens isolés d'amphibiens et d'insectes tels que les magainines, les cécropines, et la mélittine.

Conclusion

Au terme de cette étude où nous avons ciblé la β-caséine du lait camelin, protéine micellaire majeure du lait et celle qui renferme potentiellement des peptides douées d'activités biologiques, à l'image de ceux mis en évidence pour le lait de référence, nous avons pu développer des investigations dans deux directions complémentaires de l'étude :

- la première partie a été consacrée à l'isolement et la caractérisation des caséines totales, de la β-caséine et de leurs hydrolysats enzymatiques (par la pepsine, trypsine et chymotrypsine) ;
- la seconde a été consacrée à la recherche de l'expression d'activités biologiques produites et où nous avons ciblé les activités anti-oxydante et antibactérienne.

Ainsi, les caséines issues du lait camelin collecté dans la région d'El Oued ont été isolées par précipitation isoélectrique (pHi = 4,3). Les profils électrophorétiques de contrôle obtenus dans diverses conditions (PAGE-urée, PAGE-SDS) ont confirmé la présence de protéines homologues à celles des caséines bovines (αs-caséine, β-caséine). Néanmoins, la caséine κ se trouverait à des teneurs relativement faibles. Des différences de mobilités électrophorétiques par rapport aux caséines du lait de référence ont été relevées, ce qui suggère des modifications d'ordre structurales aux niveaux de ces entités protéiques (composition et agencement des acides aminés, modifications post-traductionnelles…etc.) susceptibles d'avoir des conséquences sur leurs comportements physico-chimiques et sur leurs propriétés techno-fonctionnelles.

Concernant la purification de la β-caséine cameline, cette dernière a été réalisée dans un premier temps en utilisant la chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-Cellulose. Cette méthode conduite en basse pression, bien que rapide et nécessitant peu de moyens, n'a pas permis de séparer totalement la β-CN des autres protéines micellaires. Afin d'affiner la purification, nous avons eu recours à un protocole optimisé de séparation en chromatographie rapide (Fast protein liquid chromatography, FPLC) d'échange d'anions sur Q-Sépharose. La β-CN est obtenue dans ces conditions avec un haut degré de pureté, comme le confirment les profils électrophorétiques (une seule bande en PAGE SDS et en PAGE-urée) et chromatographique (pic unique en RP-HPLC).

L'étude menée sur les cinétiques de protéolyse de la β-CN cameline sous l'action de trois protéases gastro-intestinales : pepsine, trypsine et chymotrypsine b-CN a montré que cette protéine est sensible aux trois enzymes utilisées avec des activités protéolytiques importantes. Cependant, la β-CN a présenté une sensibilité plus intense vis-à-vis de la pepsine.

Aussi et partant de là, nous avons choisis de rechercher des peptides bioactifs dans l'hydrolysat pepsique de cette protéine. Pour cela, cet hydrolysat a été séparé par ultrafiltation en deux fragments selon leur taille (inférieure à 1 kDa pour l'un et taille comprise entre 1 et 10 kDa pour l'autre). L'hydrolysat de peptides dont la masse moléculaire est inférieure à 1 kDa a montré des activités anti-oxydante et antimicrobienne les plus élevées. En effet, les résultats de l'activité anti-oxydante de cet hydrolysat a donné un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 67,0 ± 0,8 %, contre 6 ± 1,0 % pour la β-CN native.

De même, l'activité antibactérienne de la β-CN de ce lait a été évaluée avant et après une hydrolyse pepsique. L'activité est mise en évidence selon la méthode de dilution en microplaques. Les hydrolysats sont testés contre 2 souches à Gram+ (*Listeria innocua* ATCC 33090 et *Staphylococcus aureus* CNRZ 3) et 1 souche à Gram$^-$: *Escherichia coli* **ATCC** 25922. Dans ces essais, La fraction peptidique de masse moléculaire inférieure à 1 kDa a inhibé la croissance des trois souches testées. Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus, Listeria innocua* et *Escherichia coli,* 24 après d'incubation, sont respectivement de l'ordre de 58,3 ±0,8 ; 45,8 ± 0, 4 et 19 ± 0,2. La β-CN cameline et les fractions d'hydrolyse, dont la masse moléculaire est supérieure à 10 kDa n'ont pas inhibé la croissance des deux souches virulentes à Gram + (*Staphylococcus aureus* et *Listeria innocua*).

Devant l'importance que revêt l'action d'inhibition efficace de cette fraction (MM < 1 kDa) vis-à-vis des bactéries pathogènes testées, nous avons jugé utile de pousser davantage l'exploration et de déterminer la nature chimique des molécules qui s'y trouvent en réalisant une analyse par spectrométrie de masse en tandem à ionisation (nano-electrospray) couplée à la chromatographie liquide (LC/nESI–MS/MS). Les résultats obtenus indiquent la présence de 129 peptides dans cette fraction. Les séquences peptidiques correspondant aux masses obtenues ont été déterminées en employant le serveur **ExPASy** (Expert Protein Analysis System).

Cependant, l'alignement des séquences des 129 peptides identifiés avec les peptides enregistrés dans la base des données AMP a montré uniquement deux peptides f(193-204) (PFQEPVPDPVRG, 1338 Da) et f(193-213) (PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV, 2318 Da), qui présentent au moins 50 % de similitude avec des peptides antimicrobiens connus. Il s'agit respectivement de : AP01399 (50 %) et AP01398 (52,38 %). Ces deux peptides correspondent à la casécidine 15 (f : 193-207 ; 1669 g/mol) et casécidine 17 (f : 193-209 ; 1881 Da) de la caséine β du colostrum bovin. La comparaison des séquences a révélé que chaque fragment possède au moins 4 résidus Pro et 8 résidus d'acides aminés du fragment f(194-204) de la β-CN cameline et de la casécidine 15 sont identiques.

Considérant que les acides aminés 193 à 204 étaient communs aux 2 peptides antimicrobiens putatifs obtenus avec la prédiction de la base de données AMP et que cette séquence était très similaire à l'extrémité N-terminale des casecidines, un modèle peptidique a été construit.

Tenant compte de ces résultats encourageants qui pourraient avoir des retombés positives en santé publique, plusieurs orientations méritent d'être retenues pour donner des prolongements souhaitées à cette présente étude. Nous pouvons énumérer principalement les quelques pistes suivantes :

- tester l'activité antimicrobienne des peptides obtenus sur d'autres germes connus pathogènes et/ou d'altération des aliments ;
- étudier *in vivo* la biodisponibilité de ces peptides au niveau intestinal ;
- explorer les voies d'utilisation possibles des peptides actifs dans la conservation des aliments.

Références bibliographiques

Abbas S., Ashraf H., Nazir A. & Sarfraz L. (2013). Physical-chemical analysis and composition of camel milk. *International Research*, 2, 85-98.

Abdelgadir S., Ahmed K. & Dirar A. (1998). The traditional fermented milk products of the Sudan. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 1-13.

Abdel Galil M., Abdel Gader & Alhaider A. (2016). The unique medicinal properties of camel products: A review of the scientific evidence. *Journal of Taibah University Medical Sciences,* 11, 98-103.

Abderrahmane F., Mezmaze F., Chekroun A., Saidi D. & Kheroua O. (2015). *In vitro* digestibility of the dromedary whey proteins: Potential uses in infant milk allergies. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 115-120.

Abrhaley A. & Leta S. (2017). Medicinal value of camel milk and meat. *Journal of Applied Animal Research,* 46 (1), 552-558.

Abutarboush M. (1996). Comparision of growth and proteolytic activity of yogourt starters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science*, 79, 336-371.

Abu-Tarboush M., & Ahmed M. (2005). Characterization of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of camel casein and protein isolates of Al-ban (*Moringa perefrina*) and Karkade (*Hibiscus sabderiffa*) seeds. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 4, 61-82.

Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27(6), 1256-62.

Adoui F. (2014). Peptides antimicrobiens: préparation à partir de protéines laitières. Thèse de Doctorat en Sciences (option : sciences alimentaires), Université Constantine 1, Algérie.

Agrawal P., Swami C., Beniwal R., Kochar K., Sahani S. & Tuteja C. (2003). Effect of camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: A randomised prospective controlled study. *Journal of Camel Practice and Research*, 10, 45-50.

Ajibola C.F., Fashakin J.B., Fagbemi T.N. & Aluko R.E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6685-6702.

Al-Ayadhi L. Y. & Elamin N. E. (2013). Camel milk as a potential therapy as an antioxidant in autism spectrum disorder (ASD). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 8.

Al Haj A. & Al Kanhal A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal,* 20, 811-821.

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.

Alghamdi Z. & Khorshid F. (2012). Cytotoxicity of the urine of different camel breeds on the proliferation of lung cancer cells, A549. JNSR, 2, 9-16.

Al-Shamsi A., Mudgil P., Hassan M. & Maqsood S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved techno-functional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model systems. *Journal of Dairy Science*, 101, 47-60.

Amiza A., Kong L. & Faazaz L. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia *(Rachycentron canadum)* frame hydrolysate *International Food Research Journal,* 19(1), 199-206.

Andreu D. & Rivas L. (1998). Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers*, 47(6), 415-33.

Andrews T. (1983). Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research,* 50, 45-55.

Andrews T., Taylor D. & Owen J. (1985). Rapid analysis of bovine milk proteins by fast prote in liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 348, 177-185.

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

Anonyme 2 (2015). Le marché des industries alimentaires en Algérie. *Agroligne*, 97, 13-14.

Arab H., Salama A., Eid H., Omar A., Arafa A. & Maghrabi A. (2014). Camel's milk ameliorates TNBS-induced colitis in rats via down regulation of inflammatory cytokines and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 69, 294-302.

Arcan I. & Yemenicioğlu A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103, 301-312.

Ashiq M. (1993). Characterization of camel milk beta-casein. Ph. D. Thesis, University of Karachi, Pakistan.

Assem M., Abd el-gawad M, Kassem M. & ABD EL-SALAM H. (2018). Proteolysis and antioxidant activity of peptic, tryptic and chymotryptic hydrolysates of cow, buffalo, goat aAnd camel caseins. *International Journal of Dairy Technology,* 71, 236-242.

Attia H., Kherouatou N., Nasri M. & Khorchani T. (2000b). Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. Le *Lait*, 80, 503-515.

Ayyash M., Al-Nuaimi A., Al-Mahadin S. & Liu S. Q.(2018). *In vitro* investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α-amylase and α-glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 15 (239), 588-597.

Bahar A. & Ren D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6(12), 1543-1575.

Baranyi M., Thomas U. & Pellegrini A. (2003). Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Journal of Dairy Research*, 70, 189-197.

Barzegar A., Yousefi R., Sharifzadeh A., Dalgalarrondo M., Chobert M., Ganjali R., Norouzi P., Ehsani R., Niasari-Naslaji A., Saboury A., Haertlé T. & Moosavi-Movahedi A. (2008). Chaperone activities of bovine and camel β-caseins: Importance of their surface hydrophobicity in protection against alcohol dehydrogenase aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules,* 42, 392-399.

Beg U., Von Bahr-Lindström V., Zaidi H., & Jörnvall H. (1986). A camel milk whey protein rich in half cysteine-Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns, and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, 159, 195-201.

Bechinger B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *Journal of Membrane Biology*, 156(3), 197-211.

Belitz H.D. & Grosch W. (1999). Food chemistry (2nd ed.). New York, Springer.

Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. & Tomita M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica & Biophysica Acta,* 121, 130-136.

Benkerroum N., Makkaoui B., Bennani N. & Kamal H. (2004). Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 39-43.

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).

Benyagoub E. & Ayat M. (2016). Biochemical, physico-chemical and microbiological properties of camel raw milk marketed in Bechar city (South-West Algeria): Hygienic and Safe Consumers Approach. *Microbes and Health*, 4(1), 14-18.

Benzie I.F.F. & Strain J.J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Berhe T., Seifu E., Ipsen R., Kurtu M.Y. & Hansen E.B. (2017). Processing Challenges and Opportunities of Camel Dairy Products. Review article. *International Journal of Food Science.*

Birkemo A., O'Sullivan O., Ross P. & Hill C. (2009). Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 233-240.

Bobe G., Beitz C., Freeman E. & Lindberg L. (1998). Separation and quantification of bovine milk proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 16, 46(2), 458-463.

Bonfatti V., Grigoletto L., Cecchinato A., Gallo L., Carnier P. (2008). Validation of a new reversed-phase high-performance liquid chromatography method for separation and quantification of bovine milk protein genetic variants. *Journal of Chromatography* A, 1195, 101-106.

Bornaz S., Sahli A., 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, 505-513.

Bouarab-Chibane L., Ouled-Bouhedda B., Léonard 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, 1997-2009.

Bougatef A., Hajji M., Balti R., Lassoued I., Triki-Ellouz Y. & Nasri M. (2009). Antioxidant and free radicalscavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.

Brand-Williams W., Cuvelier M. E. & Berset C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 28, 25-30.

Brogden K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature reviews,* 3, 238-250.

Brulé G., Lenoir J., Remeuf F., Eck A., Gillis J.C. (2000). The casein micelle and milk coagulation; in: "Cheese Making from Science to Quality Assurance", 7-40 (2nd Eds A Eck & JC Gillis), Intercept Ltd, New York.

Buchheim W., Lund S. & Scholtissek J. (1989). Comparative studies on the structure and size of casein micelles in milk from different species. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 41, 253-265.

Buonopane G. J., Kilara A., Smith J. S. & McCarthy R. D. (1992). Effect of skim milk supplementation on blood cholesterol concentration, blood pressure, and triglycerides in a free-living human population. *Journal of the American College of Nutrition,* 11(1), 56-67.

Byler D.M., Farrell Jr. H.M. &, Susi H. (1988). Raman spectroscopic study of casein structure. *Journal of Dairy Science*, 71(10), 2622-2629.

Caroli A., Chiatti F., Chessa S., Rignanese D., Bolla P. & Pagnacco G. (2006). Focusing on goat casein complex. *Journal of Dairy Science*, 89, 3178-3187.

Caroli A., Chessa S. & Erhardt G.J. (2009). Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5335-5352.

Carrasco-Castilla J., Hernández-Álvarez J., Jiménez-Martínez C., Gutinérez-Lòpez F. & Dávila-Ortiz G. (2012). Use of proteomics and peptidomics methods in food bioactive peptide science and engineering. *Food Engineering Reviews*, 4, 224-243.

Carreira L., Ornellas D., Morais A, Da-Motta S. & Silvestre C. (2003). Effect of precipitation by trichloroacetic acid (TCA) and ultrafiltration profile on the peptide hydrolysates of casein. *Ciencia Agrotecnologia*, 27, 414-421.

Chabane B., Marteau P., Rambaud J.C., Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollés P. & Fiat M. (1998). Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk and yoghurt. *Biochimie,* 80, 155-165.

Chang K., Seol H., Jeong G., Oh H., Park Y., Perrin C. & Ham S. (2013). Casein hydrolysis by *Bifidobacterium longum* KACC91563 and antioxidant activities of peptides derived therefrom. *Journal of Dairy Science*, 96, 5544-5555.

Chaoui-Kherouatou N. & Attia N. (2008). Etude comparative des caséines camelines (*Camelus dromaderius*) et bovines. *Sciences & Technologies*, (28).

Chatterton D.,Smithers G., Roupas P. & Brodkorb A. (2006). Bioactivity of β-lactoglobulin and α-lactalbumin-Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240.

Cayot P. & Lorient D. (1998). Structures et Technofonctions des Protéines du Lait. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Chen M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K. & Nokihara K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46*, 49-53.

Chen M. & Li B. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*,16, 341-348.

Chessa S., Rignanese D., Baerbenni M., Ceriotti G., Martini M., Pagnacco G. & Caroli A. (2010). New genetic polymorphisms within ovine β- and αs2-caseins. *Small Ruminants Research*, 88, 84-88.

Cheung S., Wang L., Ondetti A., Sabo F. & Cushman W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.

Cieslak J., Mankowska M. & Switonski M. (2012). Between-breed variation in frequency of five novel missense SNPs in porcine casein beta (CSN2) and casein kappa (CSN3) genes. *Animal Genetics*, 43, 363.

Conesa C., Sanchez L., Rota C., Perez M., Calvo M., Farnaud S. & Evans R.W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 131-139.

Corrêa F., Daroit J., Coelho J., Meira M., Lopes C., Segalin J., Risso H. & Brandelli A. (2011). Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of Science and Food Agriculture*, 91, 2247-2254.

Cosenza G., Pauciullo A. , Coletta A. , Di Francia A. , Feligini M. , Gallo D., Di Berardino D. & Ramunno L. (2011). Short communication: Translational efficiency of casein transcripts in Mediterranean river buffalo. *Journal of Dairy Science*, 94, 5691-5694.

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

Davies D.T. & Law A.J.R. (1980). The content and composition of protein in creamery milks in south-west Scotland. *Journal Dairy Research,* 47, 83-90.

Diosady L.L., Bergen L. & Harwalkar V.R. (1980). High performance liquid chromatography of whey proteins. *Milchwissenschaft*, 35, 671-674.

Di Stasio L. & Mariani P. (2000). The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production. *Zootecnica and Nutrizione Animale*, 26, 69-90.

Dickson I. R. & Perkins D. J. (1971). Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions. *Biochemical Journal*, 124, 235-240.

Dryakova A., Pihlanto A., Marnila P., Curda L. & Korhonen H. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. *European Food and Research Technology*, 230, 865-874.

Dziuba M. & Dziuba B. (2009). *In silico* analysis of bioactive peptides; *in*: Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals. *Food Technology*, 325-340.

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), 5-25.

Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell Jr. H.M., Harwalkar V.R. , Jenness R. & Whitney R. McL. (1984). Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Research*, 67, 8, 1599-1631.

Ejtahed S., Niasari Naslaji A., Mirmiran P., Zraif Yeganeh M., Hedayati M., Azizi F. & Moosavi Movahedi A. (2015). Effect of camel milk on blood sugar and lipid profile of patients with type 2 diabetes: a pilot clinical trial. *International Journal Endocrinology Metabolism*, 22, 13(1).

Egito S., Girardet J-M., Miclo L., Mollé D., Humbert G. & Gaillard L. (2001). Susceptibility of equine κ- and β-caseins to hydrolysis by chymosin. *International Dairy Journal 11*, 885-893.

El-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C. & Assaf R. (1992). Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, 59, 169-175.

El-Agamy I. (1994). Camel colostrum. II. Antimicrobial factors. Proceedings of the Workshop on Camels and Dromedaries as dairy animal, Nouakshott, Mauritania, 24-26 177-180.

El-Agamy I. (2000a). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo. *Food Chemistry*, 68(2), 227-232.

El-Agamy I. (2000b). Physicochemical, molecular and immunological characteristics of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *Journal of Dairy Research*, 67, 73-81.

El-Agamy I. (2006). Camel milk in: "Hand Book of Milk of Non-Bovine Mammals". 297-344, Blackwell, USA.

El-Agamy I., Nawar M., Shamsia S.M., Awad S. & George F.W. (2009). Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research,* 82, 1-6.

Elayan A. A., Sulieman A. E. & Saleh F. A. (2008). The hypocholesterolemic effect of Gariss and Gariss containing Bifid bacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *Asian Journal of Biochemistry*, 3, 43-47.

Elbashir M. H. M. & Elhassan S.F 2018). Seasonal Effect on Camel Milk Composition (*Camelus dromedaries*) Under Traditional and Intensive Management Systems in Butana Area-Sudan. *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology & Sciences*, 39 (1), 197-205.

El Barbary H.A., El-nahas E.M. & Karam-allah E.L.E. (2014). Anti-rotaviral activity of whey proteins derived from milk of different animal species. *International Journal Advanced Research*, 2(4), 214-221.

El-Fakharany E., Abedelbaky N., Haroun B. M. Sanchez L., Redwan N. A. & Redwan E. M. (2012). Anti-infectivity of camel polyclonal antibodies against hepatitis C virus in Huh7.5 hepatoma. *Virology Journal*, 9, 201.

Elhaj A.E. & Freigoun S. (2015). Camel's Milk Protein Fractionation by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences,* 9 (2), 41-45.

El-Hatmi H., Girardet J.-M., Gaillard J.-L., Yahyaoui M. H., & Attia H. (2007). Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, 70, 267-271.

El-Hatmi H., Jrad Z., Khorchani T., Jardin J., Poirson C. & Perrin C. (2016).Identification of bioactive peptides derived from caseins, glycosylationdependent 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, 430-441.

Epand R.M. & Vogel H.J. (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochimistry Biophysics Acta*, 15, 1-28.

Ereifej K. I., Alu'datt M. H., AlKhalidy H. A., Alli I. & Rababah T. (2011). Comparison and characterisation of fat and protein composition for camel milk from eight Jordanian locations. *Food Chemistry*, 127, 282–289.

Esmaili M., Ghaffari S.M., Moosavi-Movahedi Z., Atri S., Sharifizadeh A., Farhadi M., Yousefi R., Chobert J-M., Haertlé T. & AkbarMoosavi-Movahedi A.(2011). Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (10), 2166-2172.

Farag S. I. & Kabary K. M. (1992). Chemical composition and physical properties of camel's milk and milk fat; *In:"* Proceedings of the 5th Egyptian conference on dairy science and technology". Cairo, Egypt: Egyptian Society of Dairy Sciences.

Farah Z. (1993). Composition and Characteristics of Camel Milk. *Journal of Dairy Research,* 60, 603-626.

Farah Z. & Farah-Riesen M. (1985). Separation and characterization of major components of camel milk casein. Milchwissenschaft, 40, 669-671.

Farah Z. & Rüegg M. W. (1989). The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8(2), 211-216.

Farah Z. & Atkins D. (1992). Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 229-231.

Farah Z. & Fisher A. (2004): Milk and Meat from the camel: Handbook on Products and Processing. VdfHochschulverlag AG an der ETH Zürich. Zürich/Singen.

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-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

Faye B., Bengoumi M. & Barkat A. (2003). Le développement des systèmes camelins laitiers péri-urbains en Afrique. In : Atelier Int. sur le lait de chamelle en Afrique, Niamey, Niger, 115-125.

Fiat A. M. & Jolles P. (1989). Caseins of various origins and " biologically active casein peptides and oligosaccharides: Structural and physiological aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 87(1), 5-30.

Floris R., Recio I., Berkhout B. & Visser S. (2003). Antibacterial and antiviral effects of milk proteins and derivatives thereof. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1257-1275.

Fox P. F., Uniacke-Lowe T., McSweeney P. L. H. & O'Mahony J. A. (2015). Dairy Chemistry and Biochemistry, 2d Ed.,Springer International Publishing, Switzerland.

Fubini B. & Hubbard A. (2003). Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 1507-1516.

Gennaro R. & Zanetti M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 55(1), 31-49.

Giangaspero A., Sandri L. & Tossi A. (2001). Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry,* 268(21), 589-600.

Girardet J.M., Miclo L., Florent S., Mollé D. & Gaillard J.L. (2006). Determination of the phosphorylation level and deamidation susceptibility of equine β-casein. *Proteomics*, 6, 3707-3717.

Gizachew A., Teha J. & Birhanu T. (2014). Review on Medicinal and Nutritional Values of Camel Milk. *Nature & Science*, 12, 35.

Gomez-Ruiz J. A., Lopez-Exposito I., Pihlanto A., Ramos M. & Recio I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: Identification of active peptides by HPLC–MS/MS. *European Food Research Technology*, 227, 1061-1067.

Guo H.Y., Pang K., Zhang X.Y., Zhao L., Chen S.W., DongM.L. & Ren F. Z. (2007). Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 1635-1643.

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

Habtegebriel H. & Admassu S. (2015). Optimization of the production process of soft cheese from camel milk using linear programming technique. *Food Science and Quality Management*, 49, 35-41.

Hadef L., Aggad H., Hamad B. & Saied M. (2018). Study of yield and composition of camel milk in Algeria. *Scientific Study & Research*, 19(1), 1-11.

Haddadin S., Gammoh I. & Robinson K. (2008). Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, 75, 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.

Halliwell B. & Gutteridge C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85**.**

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

Hancock R. E. W. & Lehrer R. I. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*. 16, 82-87.

Hayes M., Ross P., Fitzgerald F., Hill C. & Stanton C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 2260-2264.

Hernàndez-Ledesma B., Dàvalos A., Bartolomé B. & Amigo L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α-lactalbumin and β-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.

Hernández-Ledesma B., Quirós A., Amigo L. & Recio I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, 42-49.

Hettinga K., Valenberg H., Vries, S. Boeren S., Hooijdonk T. & Arendon J. (2011). The host defense proteome of human and bovine milk. *Plos One*, 6.

Hill D., Lahov E. & Givol D. (1974). A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research*, 41, 147-153.

Holland W. (2009). Post-translational modifications of caseins; in "Milk Protein from Expression to Food". Eds. Abby Thompson, Amsterdam, Netherlands

Hooft W., Vriend G., Sander C. & Abola E. (1996). Error in protein structures. *Nature*, 464.

Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65(3), 712-725.

Imondi R. & Stradley P. (1974). Utilization of enzymatically hydrolyzed soybean protein and crystalline amino acid diets by rats with exocrine pancreatic insufficiency. *Journal of Nutrition*, 104, 793-801.

Ismaili A., Saidi B., Zahar M., Hamama A. & Ezzaier R. (2016). Composition and microbial quality of raw camel milk produced in Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.*

Jeon J., Byun G. & Kim K. (2000). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35, 47-478.

Ji J., Sharma V., Qi S., Guarch M.E., Zhao P., Luo Z., Fan W., Wang Y., Mbabaali F., Neculai D., lEsteban M., Pherson J., Batada N. (2014). Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2 (1), 44-51.

Jiang J., Chen S., Ren F., Luo Z. & Zeng S. (2006). Yak milk casein as a functional ingredient: Preparation and identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides. *Journal of Dairy Research*, 74, 18-25.

Jolles J., Zwiers H., Dekker A., Wirtz A. & Gispen H. (1981). Corticotropin1-24 tetracosapeptide affects protein phosphorylation and polyphosphoinositide metabolism in rat brain. *Biochemistry Journal*, 194, 283-291.

Joosten P., Beek T.A., Krieger E., Hekkelman M.L., Hooft R.W., Schneider R., Sander C. & Vriend G. (2011). A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research*, 39, 411-419.

Jrad Z., El hatmi H., Adt I., Girardet J-M., Cakir-kiefer C., Jardin J., Degraeve P., Khorchani T. & Oulahal N. (2014). Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science and Technology, 94*, 205-224.

Jrad Z., El hatmi H., Adt I., Khorchani T., Degraeve D. & Oulahal N. (2015). Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria,* 44 (4), 609-616.

Kamal M.M. (2016). Contribution à l'étude de la structure-texture du lait de chamelle lors de la coagulation et du traitement thermique: comparaison avec le lait de vache. Thèse de Doctorat en Sciences, option : Ingéniérie des fonctions biologiques. Villeneuve d'Ascq, France.

Kaminski S., Cieslinska A. & Kostyra E. (2007). Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal Applied of Genetic*, 48, 189198.

Kamoun M. (1994). Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. Actes du Colloque, 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie, Collection Colloques (CIRAD), 167-169.

Kamoun M. (1995). Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Options Méditerranéennes*, Publications de CIHEAM, 81-103.

Kamoun M. (1997). Appareils et Méthodes en Biochimie et Biologie Moléculaire. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris.

Kansci G., Genot C., Meynier A., Gaucheron F. & Chobert J-M. (2004). β-Caseinophosphopeptide (f1-25) confers on β-casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes. *Lait*, 84, 449-462.

Kanwar J. R., Roy K., Patel Y., Zhou F., Singh R., Singh D., Nasir M., Sehgal R., Sehgal A. & Singh S. (2015). Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules*, 20, 9703-9731.

Kappeler S. (1998). Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland.

Kappeler S., Farah Z. & Puhan Z. (1998). Sequence analysis of *Camelus dromedariues* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65, 209-222.

Kappeler S. R., Ackermann M., Farah Z. & Puhan Z. (1999b). Sequence analysis of camel (*Camelus dromedarius*) lactoferrin. *International Dairy Journal*, 9, 481-486.

Kappeler S., Farah Z. & Puhan Z. (2003). 5'-Flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal of Dairy Science*, 86, 498-508.

Kappeler S. R., Heuberger C., Farah Z. & Puhan Z. (2004). Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 87, 2660-2668.

Khaskheli M., Arain M.A., Chaudhry S., Soomro H. & Qureshi T.A. (2005). Physico chemical quality of camel milk. *Journal of Agricultural and Social Sciences,* 2, 164-166.

Khatoon H. & Najam R. (2017). Bioactive compounds in camel milk; *in*: "Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease", Academic Press, USA.

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, 237-244.

Khorshid F.A. & Moshref S.S. (2006). In vitro anticancer agent, I e tissue Culture study of human lung cancer cells A549 II e tissue Culture study of mice leukemia cells L1210. *International Journal Cancer Research*, 2(4), 330-344.

Kim J.K., Noh J.H., Lee S., Choi J.S., Suh H., Chung H.Y., Song Y.O. & Choi W.C. (2002). The first total synthesis of 2, 3, 6-tribromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. *Bulletin Korean Chemical Society*, 23(5), 661-662.

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. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 18, 31-38.

Kim J., Jang H., Cho W., Yeon S. & Lee C. (2018). *In vitro* antioxidant actions of sulfur-containing amino acids. *Arabian Journal of Chemistry*.

Kitts D.D. (2005). Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology, 16*, 549-554.

Klompong V., Benjakul S., Kantachote D. & Shahidi F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 120-131.

Konuspayeva G., Lemarie E., Faye B., Loiseau G. & Montet D. (2008). Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus, Camelus dromedarius* and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Science and Technology*, 88 327-340.

Konuspayeva G., Faye B., Loiseau G. (2011). Variability of vitamin C content in camel milk from Kazakhstan. *Journal of Camelidae Science,* 4, 63-69.

Konuspayeva G., Camier B., Gaucheron F. & Faye B. (2014). Some parameters to process camel milk into cheese. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26, 354-358.

Korhonen H. (2011). Bioactive milk proteins, peptides and lipids and other functional components derived from milk and bovine colostrum. *Australian Journal of Dairy Technology*, 64(1), 16-25.

Korhonen H. & Pihlanto-Leppàlà A. (2001). Milk protein-derived bioactive peptides-novel opportunities for health promotion. IDF Bulletin, 363, 17-26.

Korhonen H & Pihlanto-Leppàlà A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16 (9), 945-960.

Krieger E. & Vriend G. (2014). YASARA View - molecular graphics for all devices - from smartphones to workstations. *Bioinformatics*, 15, 30(20), 2981-2.

Kula J. (2014). Medicinal Values of Camel Milk. *International Journal of Veterinary Science and Research,* 2(1), 18-25.

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 Y.K., Rakesh K., Lakshmi P. & Jitendra S. (2015). Composition and medicinal properties of camel milk: A Review. *Asian Journal of Dairy and Food Research,* 34, 83-91.

Kumar D., Kumar Chatli M., 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., Kumar Chatli M., Singh R., Mehta N. & Kumar P. (2016b). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science and Technology*, 96, 391-404.

Kumosinski T.F., Pessen H., Farrell H.M. Jr. & Brumberger H. (1988). Determination of the quaternary structural states of bovine casein by small-angle X-ray scattering: submicellar and micellar forms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 266, 548-561.

Kustanovich I., Shalev D.E., Mikhlin M., Gaidukov L. & Mor A. (2000). Structural requirements for potent versus selective cytotoxicity for antimicrobial *dermaseptin S4* derivatives. *Journal Biological and Chemistry,* 277(19).

Lafta H., Jarallah E. & Darwash A. (2014). Antibacterial activity of fermented camel milk using two Lactic Acid Bacteria*. Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, 9(22).

Lahov E. & Regelson W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicidin, isracidin peptides. *Food Chemistry and Toxicology*, 34, 131-145.

Lahov E., Edelstein D., Sode-Mogensen M.T. & Sofer E.(1971). Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, 26, 489-495.

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

Langella O., Valot B., Balliau T., Blein-Nicolas M., Bonhomme L. & Zivy M. (2017). X!TandemPipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and 535 phosphosite identification. *Journal of Proteome Research*, *16*, 494-503.

Larsson-Raznikiewicz M. & Mohammed M.A. (1986). Analysis of the casein content in camel (*camelus dromedarius*) milks. *Swedish Journal of Agricultural Research,* 16, 13-18.

Li S., Wang J., Wei H. & Yang Y. (2012).Identification of Bovine Casein Phosphorylation Using Titanium Dioxide Enrichment in Combination with Nano Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(3), 439-445.

Li Chan E. & Nakai S. (1989). Enzymatic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula. *Journal of Dairy Research*, 56, 381-390.

Lira B.F., Sobral V.B., Silva F.O., Dias G.M.P., Filho J.L.L., Port T.S. & Port A.L.F. (2010). Evaluation of variables influencing the enzymatic hydrolysis of casein from goat milk Moxotó. *Brazilian Agricultural Research*, 45.

López-Expósito I., Gómez-Ruiz J.Á., Amigo L. & Recio I. (2006a). Identification of antibacterial peptides from ovine αs2-casein. *International Dairy Journal*, 16(9), 1072-1080.

López-Expósito I., Minervini F., Amigo L. & Recio I. (2006b). Identification of antibacterial peptides from bovine kappa casein. *Journal of Food Protection*, 69(12), 2992-2997.

Lottspeich F., Heuschen A., Brantl V. & Teschemacher H. (1980). Novel opioid peptides derived from casein (β-casomorphins). III. Synthetic peptides corresponding to components from bovine casein peptone. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie,* 361, 1835-1839.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. & Randall R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.

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

Mal G., Sena D. S., Jain V. K. & Sahani M. S. (2006). Therapeutic value of camel milk as a nutritional supplement for multiple drug resistant (MDR) tuberculosis patients. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 61, 88-91.

Malacarne M., Martuzzi F., Summer A. & Mariani P. (2002). Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal,* 12, 869-877.

Mamone G., Caira S., Garro G., Nicolai A., Ferranti P., Picariello G., Malorni A., Chianese L. & Addeo F. (2003). Casein phosphoproteome: identification of phosphoproteins by combined mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, 2824-2837.

Mao X-Y., Cheng X., Wang X. & Wu S.J. (2011). Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry,* 126, 484-490.

Maruyama S. & Suzuki H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1393-1394.

Maruyama S., Mitachi H., Awaya J., Kurono M., Tomizuka N. & Suzuki H. (1987). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of αs1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.

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. *International Dairy Journal*, 73, 25-37.

Mc Cann 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 αS1-casein. *International Dairy Journal*, 16, 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.

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

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, 115-122.

Meisel M. & Schlimme S. (1994). Inhibitors of angiotensin I-converting enzyme derived from bovine casein (casokinins). *β-Casomorphins and related peptides*: Recent developments, editeurs V. Brantl and H. Teschemacher.VCH, Weinheim, pp. 27-33.

Meisel H. & Bockelmann W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: Proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 207-215.

Mercier J.C., Maubois J.L., Poznanski S. & Ribadeau-Dumas B. (1968). Preparative Fractionation of caseins from cattle and sheep by chromatography on D.E.A.E. using urea and 2-mercaptoethanol. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique,* 50, 521-530.

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., Girardet J.M., Egito A.S., Mollé D., Martin P. & Gaillard J.L. (2007). The primary structure of a low-M_r multiphosphorylated variant of β-casein in equine milk. *Proteomics*, 7, 132-1335.

Migliore-Samour D., Floc'ht F. & Jolles P. (1989). Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *Journal of Dairy Research*, 56, 357-362.

Mils S., Ross R.P., Hill C., Fitzgerald G.F. & Stanton C. (2011). Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human Heath. *International Dairy Journal*, 21, 377-401.

Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V. & Gobetti M. (2003). Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from Lactobacillus helveticus PR4 Proteinasehydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5297-5305.

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

Mohamed M. A. & LarssoN-Raznikiewicz M. (1991). Heat treatment of camel milk. Effects upon casein fraction. *Milchwissenschaft*, 46(9), 562-565.

Montalbano M., Tortorici L., Mastrangelo S., Sardina M. & Portolano B. (2014). Development and validation of RP-HPLC method for the quantitative estimation of as1-genetic variants in goat milk. *Food Chemistry*, 156, 165-169.

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, 82-87.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. & Takano T. (1995a). Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, 78, 1253-1257.

Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. & Takano T. (1995b). Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 777-783.

Neveu C., Molle D., Moreno J., Martin P. & Leonil J. (2002). Heterogeneity of caprine beta-casein elucidated by RP-HPLC/MS: genetic variants and phosphorylations. *Journal of Protein Chemistry*, 21, 557-567.

Ng-Kwai-Hang K. F. & Pélissier J. P. (1989). Rapid separation of bovine caseins by mass ion exchange chromatography. *Journal of Dairy Research*, 56, 391-397.

Nikkhah A (2014). Milk of Camel: Science Edification Urgencies. *World Journal of Veterinary Science*, 2, 6-10.

Ochirkhuyag B., Chobert M., Dalgalarrondo M., Choiset Y. & Haertle T. (1997). Characterization of caseins from mongolian yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, 77, 601-613.

Omar A., Harbourne N. & Oruna-Concha M.J. (2016). Quantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 1-5.

Omer R.H. & Eltinay A.H. (2009). Changes in chemical composition of camel's raw milk during Storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 607-610.

Ono T. & Obata T. (1989). A model for the assembly of bovine casein micelles from F2 and F3 subunits. *Journal of Dairy Research*, 453-461.

Oren A., Ventosa A. & Grant W. D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International Journal Systematic Bacteriology*, 47, 233-238.

Othman A. **(2016)**. Detection of bactericidal activity of camel's milk compared with raw and processed cow's milk against pathogenic bacteria. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 15 (1), 31-37.

Otte J., Shalaby S.M., Zakora M., Pripp A.H. & El-Shabrawy S.A. (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis. *International Dairy Journal,* 17, 488-503.

Panwar R., Grover C.R., Kumar V., Ranga S. & Kumar N. (2015). Camel Milk: Natural Medicine. Boon To Dairy Industry 10.

Parker W. L., Rathnum M. L., Seiner V., Treio W. H., Principe P.A. & Sykes R.B. (1984). Cepacin A and cepacin B, two new antibiotics produced by *Pseudomonas cepacia*. *Journal of Antibiotics* (Tokyo) 37, 431-440.

Pathak K. N., Jivrajani R. D., Joshi H. P. & Iyer K. N. (1995). Characteristics of VHF scintillations in the equatorial anomaly crest region in India. *Annals of Geophysics*, 13, 730-739.

Patton S. (2004). Milk: Its Remarkable Contribution to Human Health and Well-Being, Transaction Publishers, New Brunswick, NJ.

Pauciullo A., Shuiep E.S., Cosenza G., Ramunno L. & Erhardt G. (2013). Molecular characterization and genetic variability at κ-casein gene (CSN3) in camels. *Gene,* 513, 22-30.

Pauciullo A., Giambra I. J., Iannuzzi L. & Erhardt G. (2014). The β-casein in camels: Molecular characterization of the CSN2 gene, promoter analysis and genetic variability. *Gene,* 547, 159-168.

Pearcer J. (1983). Analysis of whey proteins by high performance liquid chromatography. *Australian Journal of Dairy and Technology*, 38, 114-117.

Phelan M., Aherne A., FitzGerald R.J. & O'Brien N.M. (2009). Casein-derived bioactive peptides: biological represent the presence of hydrophilic peptides and for effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643-654.

Pihlanto-Leppala A., Antila P., Mantsala P. & Hellman J. (1994). Opioid peptides produced by in vitro proteolysis of bovine caseins. *International Dairy Journal*, 41, 291-301.

Poth A.G., Deeth H.C., Alewood P.F. & Holland J.W. (2008). Analysis of the human casein phosphoproteome by 2-D electrophoresis and MALDI-TOF/TOF MS reveals new phosphoforms. *Journal of Proteome Research*, 7, 5017-5027.

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.

Pumpeth K., Moongngarm A., Amornsin A. & Nontasan P. (2016). Antioxydant activity of casein hydolysate. MSU-IPSFAB2016, Faculty of Technology Mahasarakham University.

Qadeer Z., Huma N., Sameen A. & Iqbal T. (2016). Camel milk cheese: optimization of processing conditions. *Journal of Camelid Science*, 8, 18-25.

Quan S., Tsuda H. & Miyamoto T. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with lactobacillus Helvetius 130B4 from camel milk in Mongolia, China. *Journal Science of Food and Agricultural*, 88, 2688-2692.

Rafiq S., Huma N., Pasha I., Sameen A., Mukhtar o. & Khan M. (2016). Chemical Composition, Nitrogen Fractions and Amino Acids Profile of Milk from Different Animal Species. *Asian-Australas Journal Animal Science*, 29(7), 1022-1028.

Rajapakse N., Mendis E., Jung W., Je J. & Kim S. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38, 175-182.

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 Science and Technology*, 96, 489-499.

Ramet J. P. (2001). The technology of making cheese from camel milk (Camelus dromedarius)**.** Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2001.

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

Rasmussen L.K., Due H.A. & Petersen T.E. (1995). Human αs1-casein: purification and characterization. Comparative Biochemistry and Physiology Part B. *Biochemistry and Molecular Biology.* 111, 75-81.

Recio I. & Visser S. (1999). Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine αs2-casein. *Biochimica, Biophysica Acta*, 1428, 314-326.

Redwan E. R. M. & Tabill A. (2007). Camel lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 28, 267-277.

Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Kakuda Y. & Xue S.J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry, 108*, 727-736.

Rival S.G., Fornaroli S., Boeriu C.G. & Wichers H.J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 287-294.

Rutella G. S., Solieri L., Martini S. & Tagliazucchi D. (2016). Release of the antihypertensive tripeptides valine-proline-proline and isoleucine-proline-proline from bovine milk caseins during in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 8509-8515.

Ryskaliyeva A., Henry C., Miranda G., Faye B., Konuspayeva G. & Martin P. (2018). Combining different proteomic approaches to resolve complexity of the milk protein fraction of dromedary, Bactrian camels and hybrids, from different regions of Kazakhstan. PLOS/ONE.

Saadaoui B., Bianchi L., Henry C., Miranda G., Martin P. & Cebo C. (2014). Combining proteomic tools to characterize the protein fraction of llama (*Lama glama*) milk. *Electrophoresis*, 35(10),1406-1418.

Salami M., Yousefi R., Ehsani M.R., Dalgalarrondo M., Chobert J.M., Haertle 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, 1097-1102.

Salami M., Moosavi-Movahedi A. A., Ehsani M. R., Yousefi R., Haertle T. & Chobert J-M. (2010). Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3297-3302.

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, 471-478.

Saley M. (1993). La Production Laitière du Dromadaire. CIRAD, Maisons-Alfort, Paris.

Salmen S.H., Abu-Tarboush H.M., Al-Saleh A. & Metwalli A. (2012). Amino acids content and electrophoretic profile of camel milk casein from different camel breeds in Saudi Arabia*. Saudi Journal of Biolgical Science,* 19(2), 177-83.

Sanayei S., Jahadi M., Fazel M. & Janigorhan M. (2015). Physsico-Chemical ***Fox*** characteristics of raw milk of one-humped camel from Khur and Baiabanak in Isfahan province of Iran. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 5 (2), 67-72.

Sarmadi B.H., & Ismail A. (2010). Antioxidative peptides from foods proteins: A review. *Peptides*, 1949-1956.

Sboui A., T. Khorchani M., Djegham Belhadj O. (2009). Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien; Variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *African Science*, 5(2), 293-304.

Shabo Y. & Yagil, R. (2005). "Etiology of autism and camel milk as therapy". *InternationalJournal of Diseases of Human Development*, 4 (2), 6770.

Schmidt D. G. (1980). Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34, 42-64.

Shamsia S.M. (2009). Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1, 52-58.

Shariatikia M., Behbahani M. & Mohabatkar H. (2017). Anticancer activity of cow, sheep, goat, mare, donkey and camel milks and their caseins and whey proteins and *in silico* comparison of the caseins. *Molecular Biology Research Communications*, 6(2), 57-64.

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., Giambra I. J., El Zubeir I. E. M. & Erhardt G. (2013). Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of aS1-casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. *International Dairy Journal*, 28, 88-93.

Si Ahmed S., Almi D., Senoussi C., Boudjenah S.H. & Mati A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirate Journal of Food Agriculture*, 25, 283-290.

Si Boukeur O.K. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques université INA EL Harrach-Alger.

Silk D.B.A., Marrs T.C. & Addison J.M. (1973). Absorption of amino acids from an amino acid mixture simulating casein and a tryptic hydrolysate of casein in man. *Clinical Science*, 45, 715-719.

Silva S.V. & Malcata F.X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15 (1), 1-15.

Silva S.V., Pihlanto A.B & Malcata F.X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheese like systems prepared with proteases from Cynara cardunculus. *Journal of dairy science*, 89 (9), 3336-3344.

Stuknyte M., De Noni I., Gugliemetti S., Minuzzo M. & Mora D. (2011). Potental immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinase of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 21, 763-769.

Suetsuna K., Ukeda H. & Ochi H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128-131.

Sun Q., Shen H. & Luo Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 53-60.

Suteu M., Vlaic A., Balteanu V.A., Wavreille J. & Renaville R. (2012). Evidence of alternative splicing of porcine β-casein (CSN2). *Animal Genetics*, 43, 474-475.

Swaisgood H. E. (1992). Chemistry of the caseins, *in*: "Advanced Dairy Chemistry-I: Proteins". P. F. Fox, ed. Elsevier Applied Science, New York, NY. pp. 63-110.

Tagliazucchi D., Shamsia S., & Conte A. (2016a). Release of angiotensin converting-enzyme inhibitory peptides during in vitro gastro-intestinal digestion of camel milk. *International Dairy Journal*, 56, 119-128.

Tagliazucchi D., Shamsia S., Helal A. & Conte A. (2017). Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by in vitro gastro-intestinal digestion. *International Dairy Journal*, 71, 6-16.

Tagliazucchi D., Martini S., Shamsia S., Helal A. & Conte A. (2018). Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk. *International Dairy Journal*, 81, 19-27.

Tauzin J., Miclo L. & Gaillard J.-L. (2002). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine αS2-casein. *FEBS Letters*, 531, 369-374.

Tezcucano Molina A. C., Allia I., Konishi Y. & Kermasha S. (2007). Effect of dephosphorylation on bovine casein. *Food Chemistry*, 101, 1263-1271.

Thompson M.P., Tarassuk N.P., Jenness R., Lillevik H.A., Ashworth V.S. & Rose D. (1965). Nomenclature of the proteins of cow's milk. Second revision. *Journal of Dairy Science*, 48, 159-169.

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

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, 243-248.

Venselaar H., Beek T.A., Kuipers R., Hekkelman M. & Vriend G. (2017). Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics*, 11, 548.

Visser S., Slangen C.J., Lagerwerf F.M., Van Dongen W.D. & Haverkamp J. (1995). Identification of a new genetic variant of bovine beta-casein using reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A,* 8, 711(1), 141-50.

Walsh C.D., Guinee T.G., Reville W.D.,Harrington D., Murphy J.J., TO'Kennedy B., Gerald R. (1998). Influence of *κ*-Casein Genetic Variant on Rennet Gel Microstructure, Cheddar Cheesemaking Properties and Casein Micelle Size. *International Dairy Journal*, 8(8), 707-711.

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

Ward T.J., Honeycutt R.L. & Derr J.N. (1997). Nucleotide sequence evolution at the k-casein locus: evidence for positive selection within the family bovidae. *Genetics,* 147, 1863-1872.

Wu H.C., Chen H.M. & Shiau C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36 (9-10), 949-957.

Yadav A.K., Kumar R., Priyadarshini1L. & Singh J. (2015). Composition and medicinal properties of camel milk: A Review. *Asian Journal Dairy & Food Research*, 34(2), 83-91.

Yagil R. (1982). Camels and camel milk Animal production and health report. Rome, Italy: FAO.

Yagil R. (1985). The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed Karger, New York, 109-120.

Yagil Y. (2013). Camel milk and its unique anti-diarrheal properties. *Israel Medical Association Journal*, 15, 35-36.

Yagil R. & Etzion Z. (1980). Effect of drought condition on the quality of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 47, 159-166.

Yagil R., Zagorski O. & Van Creveld C. (1994). Science and camel's milk production. Chameux et dromedaries, animeaux laitiers. Ed. Saint Marin, G. Expansion Scientifique Francais, Paris, 75-89.

Yamamoto N., Akino A. & Takano T. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 77, 917-922.

Yassin H., Soliman M., Mostafa E., Ali M. (2015). Antimicrobial effects of camel milk against some bacterial pathogens. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3, 162-168.

Yelubaeva M.Y., Buralkhiev B.A., Serikbayeva A.D., Narmuratova M.H. & Kenenba S.Y. (2017). Electrophoretic identification of casein in various types of milk. *Journal of Biological Sciences*, 17 (4), 348-352.

Yildirim A., Mavi A., Kara AA. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus L. extracts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9, 4083-4089.

Zhang H., Yao J., Zhao D., Liu H., Li J. & Guo M. (2005). Changes in chemical composition of Alxa Bactrian camel milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3402-3410.

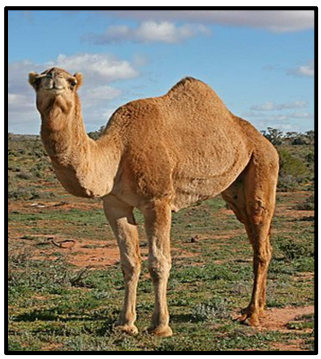
Zucht H.D., Raida M., Adermann K., Magert H. J. & Forssmann W. G. (1995). Casocidin-I: A casein-α_{s2} derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372(2-3), 185-188.

Annexes

Annexe 1 : Les différentes espèces de dromadaire

Famille : *Camelidae*

1. Genre : *Camelus*



Camelus dromedarius

Camelus bacterianus

Camelus ferus

2. Genre : *Lama*

Lama glama

Lama guanicoe

Lama pacos

Vicugna vicugna

Annexe 2 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951)

1. Solutions

- **Solution alcaline A :** NaOH, 0,1N dans Na_2CO_3
- **Solution cuivrique B** : $CuSO_4$, $5H_2O$, + Tartrate double de Na et K, 1%.
- **Solution C** : 50 ml de la solution A + 1ml de la solution B.
- **Solution mère de la BSA** : 0,1mg/ml.

2. 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	30	45	60	80	100
Solution mère de BSA (ml)	0	0,1	0,25	0,30	0,45	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,9	0,75	0,70	0,55	0,4	0,2	0

3. 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.

4. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentration 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 3 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

1. Solutions

- **Solution d'acrylamide (A)**
  - Acrylamide ……36 g
  - Bisacrylamide …….1 g
  - Eau distillée ……100 ml

- **Tampon de gel de séparation (S)**
  - Tris ……18,15 g
  - Eau distillée ……...100 ml

  Ajuster à pH 8.8 avec de HCl 4N

- **Tampon de gel de concentration (C)**
  - Tris ……...6 g
  - Eau distillée ……100ml

  Ajuster à pH 6.8 avec de HCl 4N

- **Tampon d'électrode**
  - Tris ……1, 2 g
  - Glycine …….5,75 g
  - SDS ……....0,2 g
  - Eau distillée ……200 ml

- **Tampon d'échantillon**
  - Solution (C) ……500µl
  - Eau distillée ……250µl
  - SDS (10%) …….250µl
  - 2-mercapthoéthanol …….50µl

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 distillée ……100 ml

- **Solution de coloration**
  - Bleu de Coomassie R250 …….0,5 g
  - TCA ……4 g
  - Méthanol ……100ml
  - Eau distillée ……100ml

- **Solution de décoloration**
  - Acide acétique ……..37,5ml
  - Eau distillée ……....312,5ml
  - Méthanol ……...150ml

- **Solution de persulfate d'ammonium (PSA)**
  - Persulfate d'ammonium ……0,1 g
  - Eau distillée …….1ml

Electrophorèse

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

  Solution (A) ……4,60 ml
  Solution (S) ……2,51 ml
  Eau distillée ……2,73 ml
  Dégazer pendant 2 mn maximum
  SDS (10%) ……...100µl
  TEMED …….13µl
  PSA …….75µl
  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 distillée ……..5,8 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 µl.
- **Mise sous tension :** 20 mA, 250 V.
- **Fixation :** 45 minutes dans la solution de fixation.
- **Coloration :** 1 heure dans la solution de coloration.
- **Décoloration :** dans la solution de décoloration.

Annexe 4 : Electrophorèse en présence d'urée et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-urée)

- **Tampon de gel de séparation (S)**
  - Tris …….18,15 g
  - Eau distillée ……100 m

  Ajuster à pH 8,8 avec de HCl 4 N

- **Tampon de gel de concentration (C)**
  - Tris …….6 g
  - Eau distillée …….100 ml

  Ajuster à pH 6,8 avec de HCl 4 N

- **Tampon d'électrode**
  - Tris ……..1,12 g
  - Glycine ……...…….0,58 g
  - Eau distillée …..……..200 ml

  Ajuster à pH 8.3 avec du Tris

- **Tampon d'échantillon d'échantillon**
  - Solution (C) ……..100 µl
  - Urée ……...700 µl
  - 2-mercaptoéthanol …… 200 µl
  - Glycérol (50%)……...200 µl
  - Bleu de bromophénol ……..une tête d'aiguille

  Dissoudre 1 mg de protéines lyophylisées dans 1 ml de ce tampon

Electrophorèse

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

- Acrylamide ……2 ml
- Urée (9M) …….4,57 ml
- Solution (S) ……...1,33ml

  Dégazer environ 2mn maximum
- TEMED ……....90 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)**

- Acrylamide ……0,44 ml
- Urée (9M) …….2,72 ml
- Solution (C) ……...0,48ml
- Eau distillée ……..……0,33 ml

  Dégazer environ 2mn maximum

- TEMED …….....90 µl
- PSA ……10 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

International Dairy Journal 86 (2018) 49–56

Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idairyj

Casesidin-like anti-bacterial peptides in peptic hydrolysate of camel milk β-casein

Dalila Almi-Sebbane [a, b], Isabelle Adt [b, *], Pascal Degraeve [b], Julien Jardin [c], Emmanuel Bettler [d], Raphaël Terreux [d], Nadia Oulahal [b], Abderahmane Mati [a]

[a] Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, Algeria
[b] Université Claude Bernard Lyon 1, ISARA Lyon, BioDyMIA (Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires), Equipe Mixte d'Accueil n 3733, IUT Lyon 1, 01000 Bourg en Bresse, France
[c] INRA-AgroCampus Ouest, UMR1253 Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf, 35042 Rennes, France
[d] Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, LBTI (Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie Thérapeutique), UMR 5305 CNRS, Pôle PRABI-LG, Institut de Biologie et Chimie des Protéines (IBCP), 69367 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 November 2017
Received in revised form
18 June 2018
Accepted 26 June 2018
Available online 7 July 2018

ABSTRACT

The antibacterial activity of camel milk β-casein and its peptic hydrolysate was investigated. The hydrolysate was fractionated by ultrafiltration successively through membranes with a 10 kDa and a 1 kDa cut-off, sequentially. Antibacterial activity assays against *Staphylococcus aureus* CNRZ 3, *Listeria innocua* ATCC 33090 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were performed. The growth of *S. aureus* and *L. innocua* strain was not inhibited by β-casein; *E. coli* strain growth was slightly inhibited. All fractions of hydrolysates exhibited some anti-bacterial activity and molecular mass fraction <1 kDa was the most active against both Gram-positive bacterial strains. Mass spectrometry analysis revealed that this fraction contained 129 peptides. Interestingly, 2 of them, f(193–204) and f(193–213), presented at least 50% homology with casecidins 15 and 17 from bovine β-casein. This is the first study reporting the presence of two putative antibacterial fragments in camel β-casein peptic hydrolysate.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Like in other mammalian milks, caseins (CNs) are the major proteins in camel milk. However, protein composition from camel milk is specific and notably, unlike in cows' milk, β-CN is the major casein. More precisely, α-, β- and κ-CN constitute about 31.5% (α_{S1}-CN, 22%; α_{S2}-CN, 9.5%), 65.0% and 3.5% of total caseins, respectively (Kappeler, Farah, & Puhan, 1998). Thus, camel milk composition shows similarity to human milk as it contains a high amount of β-CN; this could infer a higher digestibility, since β-CN is more sensitive to pepsin hydrolysis than α-CN (El-Agamy, Nawar, Shamsia, Awad, & Haenlein, 2009).

Protein fragments with biological activities released during digestion or food processing are bioactive peptides which play an important role in physiological functions. Among proteins, milk proteins are known to be an important source of such peptides. For example, peptides derived from milk proteins have been shown to exert various functionalities such as antioxidant activities, anti-cancer activities, reduction of blood pressure, opioid activities, mineral binding, growth stimulation and anti-microbial activities (Clare & Swaisgood, 2000; Meisel & Bockelmann, 1999). Due to their abundance in milk, caseins constitute an important source for such peptides. The first anti-bacterial peptides of casein origin (more precisely from α-casein) were identified by Hill, Lahov, and Givol (1974).

To date, several anti-microbial peptides generated from α- and β-CN have been identified from bovine or others mammalian milk caseins. Casecidins 15 and 17 are two anti-bacterial β-CN fragments, f(193–207) and f(193–209), respectively, isolated from acidified bovine colostrum or released following hydrolysis of bovine caseins by chymosin (Birkemo, O'Sullivan, Ross, & Hill, 2009; Lahov & Regelson, 1996); these two fragments are active against *Escherichia coli* DPC6053. Baranyi, Thomas, and Pellegrini (2003) reported that f(50–56) and f(64–77) of β-CN from rabbit milk could inhibit *Bacillus* sp. growth. Minervini, Algaron, Rizzello, Fox, Monnet, & Gobbetti (2003) reported that the β-CN fragment f(184–210) isolated from a hydrolysate of a human milk preparation exhibits an anti-bacterial activity against a very large spectrum of Gram-

* Corresponding author. Tel.: + 33 474 455 252.
E-mail address: isabelle.adt@univ-lyon1.fr (I. Adt).

https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.06.016
0958-6946/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

positive and Gram-negative bacteria. Hayes, Ross, Fitzgerald, Hill, and Stanton (2006) reported that *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 is suitable for the generation of multiple anti-microbial peptides from bovine casein and identified three peptides exerting antibacterial activity against pathogenic strains of *Cronobacter sakazakii* ATCC 12868.

To date, while camel caseins are very susceptible to proteolysis and able to generate peptides with various biological activities, such as antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities, after enzymatic treatment (Jrad, Girardet, Adt, Oulahal, Degraeve, Khorchani, et al., 2014; Salami, Yousefi, Ehsani, Dalgalarrondo, Chobert, Haertlé, et al., 2008, Salami, Moosavi-Movahedi, Moosavi-Movahedi, Ehsani, Yousefi, Fahadi, et al., 2011), only a few studies investigated the anti-bacterial activity of camel caseins and their hydrolysates. Jrad, El Hatmi, Adt, Khorchani, Degraeve, & Oulahal (2015) and Kumar, Manish-Kumar, Raghvendar, Mehtaa, and Kumar (2016) studied the anti-microbial activity and the antioxidant activity of camel whole casein proteins and their hydrolysates. However, although these authors have shown that camel caseins hydrolysates have an antimicrobial activity; no peptide responsible for this activity was identified. Thus, to our knowledge, anti-microbial activity of pure camel β-CN (the major protein from camel milk) and its hydrolysates have never been studied. The objective of the present study was to determine whether anti-microbial peptides can be released from camel β-CN.

Following its purification, camel β-CN was subjected to enzymatic hydrolysis by pepsin. The anti-bacterial activity against *Staphylococcus aureus* CNRZ 3, *Listeria innocua* ATCC33090 and *E. coli* ATCC 25922 of native β-CN and its peptic hydrolysates was assayed. The peptides present in the low molecular mass fraction (<1 kDa) fraction of peptic hydrolysate of β-CN were identified by mass spectrometry.

2. Materials and methods

2.1. Camel casein preparation

A milk sample from one camel (*Camelus dromedarius*) was collected in El-Oued in South Algeria. Caseins from the camel milk were prepared as follows: skimmed camel milk pH was adjusted to 4.3 by addition of HCl (1 mol L^{-1}) (Wangoh, Farah, & Puban, 1998). Caseins were pelleted by centrifugation (5000 × *g*, 30 min, 4 °C), pellet was separated from the whey supernatant and then resuspended in distilled water and centrifuged again (5000 × *g*, 30 min, 4 °C). This operation was repeated three times to remove any whey residue. Finally, the caseins were obtained by centrifugation at 5000 × *g* (20 min, 4 °C) and then dissolved with NaOH (1 mol L^{-1}). To remove salts, the caseins were dialysed against Milli-Q water (cut-off of dialysis membranes: 100–500 Da; SpectraPor CE Tubing, Spectrum Europe B.V.) at 4 °C for 72 h and freeze-dried.

2.2. Purification of camel β-casein

Whole casein samples were subjected to fast protein liquid chromatography (FPLC) separation with a Q-Sepharose HiPrep Q FF 16/10 column (GE Healthcare, Sweden). Q-Sepharose HiPrep Q FF 16/10 column was equilibrated with 5 column volumes (CV) of 0.02 mol L^{-1} imidazole buffer (pH 7) containing 4 mol L^{-1} urea (buffer A). One gram of lyophilised powder of whole casein fraction was dissolved in 130 mL Tris/HCl buffer (0.05 mol L^{-1}, pH 8.2) containing 8 mol L^{-1} urea and 0.01 mol L^{-1} β-mercaptoethanol. Whole casein solution was applied to the column and subsequently eluted with an increasing gradient of NaCl in buffer A at a flow rate of 5 mL min^{-1} as follows: a 15 CV linear NaCl gradient from 0.08 to 0.18 mol L^{-1} was followed by a 15 CV elution at a constant 0.18 mol L^{-1} NaCl concentration. The column was subsequently washed with 0.2 mol L^{-1} and 1 mol L^{-1} NaCl buffer A (see Fig. 1). The absorbance at 280 nm was monitored continuously during elution. The identity and the purity of the eluted fractions were established by comparing the sodium dodecyl sulphate- (SDS-) and urea polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) electrophoregrams of whole casein sample with those of each FPLC fraction.

2.3. Preparation of β-casein hydrolysate

β-CN hydrolysate was prepared as described in Bellamy, Takase, Wakabayashi, Kawase, and Tomita (1992). An aqueous solution of β-CN (50 g L^{-1}) was adjusted to pH 2 by dropwise addition of HCl (2 mol L^{-1}). Pepsin (EC 3.24.3.1, activity 3000–4500 units mg^{-1}) was then added (enzyme to substrate ratio 3%, w/w, in final volume) before incubation at 37 °C for 4 h. The enzymatic hydrolysis experiment was stopped by dropwise addition of NaOH (2 mol L^{-1}) to adjust pH to 7 followed by heating at 80 °C for 5 min before centrifugation at 15000 × *g* (20 min, 4 °C). The supernatant was recovered and stored at −20 °C for further analysis.

2.4. Determination of the degree of casein hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) was defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds in camel milk β-CN. It was determined by the 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) method using L-leucine as standard according to the method described by Adler-Nissen (1979) with slight modifications. Native β-CN (control), β-CN hydrolysate, and leucine (standard) were dissolved in 0.1 mol L^{-1} sodium bicarbonate buffer (pH 8.5) to obtain a 500 μL final volume, mixed with 250 μL of TNBS reagent (0.1 g L^{-1}) and incubated in the dark for 2 h at 37 °C. After incubation, 250 μL of SDS (10 g L^{-1}) were added. The reaction was stopped by adding 125 μL of hydrochloric acid (1 mol L^{-1}) and the absorbance at 420 nm was measured with a spectrophotometer (Biochrom, Nottingham, UK).

DH values were calculated using the following formula (Adler-Nissen, 1979):

$$DH\ (\%) = 100\ (AN_2 - AN_1)/Npb$$

where AN_1 is the amino nitrogen content of the protein substrate before hydrolysis (mg g^{-1} protein), AN_2 the amino nitrogen content of the protein substrate after hydrolysis (mg g^{-1}), and Npb the nitrogen content of the peptide bonds in the protein substrate (mg g^{-1}). The values of AN_1 and AN_2 were obtained by reference to a standard curve of Abs at 340 nm versus mg L^{-1} amino nitrogen (generated with L-leucine). These values were then divided by the protein content of the test samples to give mg amino nitrogen per gram of protein.

2.5. Fractionation of β-casein hydrolysate by ultrafiltration

β-CN hydrolysate was fractionated by ultrafiltration onto 10 and 1 kDa cut-off membranes. A stirred ultrafiltration cell (Amicon, St Quentin en Yvelines, France) with 76 mm diameter membranes was used. Permeates and retentates obtained following successive ultrafiltration of β-CN hydrolysate onto 10 kDa and 1 kDa cut-off membranes were collected, freeze-dried, and stored at −20 °C until further use.

2.6. Anti-bacterial activity assays

In vitro anti-bacterial activity assays were performed against *S. aureus* CNRZ 3, *L. innocua* ATCC 33090 and *E. coli* ATCC 25922

strains essentially as described in Bouarab-Chibane et al. (2017). Briefly, each experiment was carried out using freshly grown cells obtained by inoculating 9 mL of Mueller Hinton Broth (MHB) with 0.5 mL of a frozen culture of each bacterial strain, cultured for 8 h at 37 °C (except for *L. innocua* ATCC 33090 strain, which was cultured at 30 °C). Then 9 mL of MHB were inoculated once again with 1 mL of this fresh culture and subsequently incubated for 12 h at 37 °C or 30 °C. Finally, 9 mL of MHB were inoculated with 1 mL of this culture and incubated for 3 h at 37 °C or 30 °C. Each bacterial suspension was diluted to an approximately 5–6 log cfu mL^{-1} final concentration in the test medium.

Freeze-dried camel milk β-CN and its hydrolysate were suspended in sterile MHB and sterilised by filtration onto 0.2 μm-pore-size membranes. The concentration of peptide solids was 1 g L^{-1} after inoculation of bacteria. Anti-bacterial activity assays were performed in triplicate in sterile microplates. In each well, 30 μL of bacterial culture were mixed with 270 μL of sample suspended in MHB or sterile MHB (positive control). For each run, both positive (bacterial growth in MHB without any sample) and negative (wells containing 2400 UI mL^{-1} nisin for *S. aureus* and *L. innocua* or 2 mg L^{-1} ciproflaxacin for *E. coli*, these concentrations are sufficient to induce 100% of growth inhibition) controls were also monitored. The optical density at 580 nm was recorded every 15 min using a Bioscreen® C plate reader (Thermofisher, Illkirch, France). The growth curve of each bacterial strain was obtained by plotting the OD_{580nm} as a function of time. The percentage of inhibition of bacterial growth after 24 h of incubation was estimated by comparing OD_{580nm} mean values in the presence of camel milk β-CN or its hydrolysate with mean values in their absence (positive controls) as follows:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = [(OD_{580nm\ control} - OD_{580nm\ sample}) / OD_{580nm\ control}] \times 100$$

Statistical analysis was performed using STAT BOX Excel and results were presented as mean value ± standard error of mean. The two way ANOVA and $P < 0.05$ were used for statistical evaluation.

2.7. Nano-electrospray ionisation tandem mass spectrometry coupled with liquid chromatography

Mass spectrometry (MS) experiments of the fractionated casein hydrolysate were performed using a nanoRSLC Dionex U3000 system fitted to a Q Exactive™ Quadrupole-Orbitrap™ mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. 0.5 μg of sample was concentrated on a Pep-Map 100 reversed-phase column (C18, 5 μm particle size, 300 μm inner diameter, i.d., 5 mm length) (Dionex/ThermoScientific, Villebon-sur-Yvette, France). Peptides were separated on a reversed-phase PepMap 100 column (C18, 3 μm particle size, 75 μm i.d., 150 mm length) at 35 °C, using solvent A (2%, v/v, acetonitrile, 0.08%, v/v, formic acid, and 0.01%, v/v, TFA in deionised water) and solvent B (95%, v/v, acetonitrile, 0.08%,v/v, formic acid, and 0.01%, v/v, TFA in deionised water). A linear gradient from 5 to 35% of solvent B in 35 min was applied for the elution at a flow rate of 0.3 μL min^{-1}. Eluted peptides were directly electrosprayed into the mass spectrometer operated in positive mode. A full continuous MS scan was carried out followed by ten data-dependent MS/MS scans. Spectra were collected in the selected mass range 250–2000 m/z. Peptides were identified from MS/MS spectra using X!Tandem pipeline software (http://pappso.inra.fr; Langella, Valot, Balliau, Blein-Nicolas, Bonhomme, & Zivy, 2017).

The peptide identification database was composed of (i) a list of proteins contaminants commonly found in proteomics experiments (ftp://ftp.thegpm.org/fasta/cRAP) and (ii) the "reviewed" portion of the *Camelus* taxonomy downloaded from www.uniprot.org on the 10th of February 2015 (NCBI taxonomy identifier 9836).

Sequence alignments with known antimicrobial peptides were performed with the antimicrobial peptide database available on http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php (updated in January 2017).

2.8. Peptide structure modelling and molecular dynamic simulation

Homology modelling of the camel β-casein f(193–204) fragment was performed using YASARA Structure (Krieger & Vriend, 2014) with AMBER14 force field (Hornak, Abel, Okur, Strockbine, Roitberg, & Simmerling, 2006). Possible templates were identified using PSI-BLAST iterations and position specific scoring matrix (PSSM) from Uniref90, and then searching the PDB (Protein Data Bank, Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) for a match with no maximum e-value cut-off, according to the peptide size. Template was chosen based on YASARA total score corresponding to the product of the BLAST alignment score, the WHAT_CHECK (Hooft, Vriend, Sander, & Abola, 1996) quality score in the PDBFinder2 database (Joosten, Beek, Krieger, Hekkelman, Hooft, Schneider, et al., 2011) and the target coverage.

All-atom molecular dynamic (MD) simulation was computed using the Amber 14 package (Case, Cheatham, Darden, Gohike, Luo, Merz, et al., 2005) and Amber ff14sb as a force field for atoms and ions. The simulation was run in a periodic box with TIP5P water under isothermal-isobaric (NTP) conditions at T = 300 K and P = 1 atm. A simulation was run for 20 ns with a 2 fs time step; coordinates and energy were saved every 1000 steps.

Na^+ and Cl^- ions were inserted (independently from other ions already present via the homology modelling process) to neutralise the system. The system was heated from 100 to 300 K in 100 ps and when the system had reached its equilibrium, a 500 ns NTP molecular dynamics simulation was set. The production simulation was performed with GPU chips on a Titan X Nvidia card.

3. Results

3.1. Purification of camel β-casein and hydrolysis by pepsin

A typical elution profile of whole camel casein from the Q-Sepharose® Fast Flow column is shown in Fig. 1. Two well-defined fractions (1 and 2) were obtained. Control (Urea PAGE and SDS PAGE) electrophoresis revealed that these fractions contained β-casein and α_S-casein, respectively (data not shown) Thus, the first fraction, eluted with 0.18 mol L^{-1} NaCl, contained highly pure β-CN and; the second fraction, eluted with 1 mol L^{-1} NaCl, was composed of α_S-CN.

Considering that β-CN represents 65% of total caseins in camel milk (Kappeler et al., 1998), the calculated percentage of recovered β-CN after freeze-drying was about 43%.

Hydrolysis of β-CN by pepsin resulted in a DH of 39.0 ± 0.1%. After fractionation by ultrafiltration and lyophilisation, the major fraction recovered was the fraction <1 kDa. More precisely, this fraction represented 59.7% of the total weight of lyophilisates while the fractions from 1 to 10 kDa and >10 kDa represented 29.8% and 10.4%, respectively. The anti-bacterial activities of these fractions were assayed and compared with those of native β-CN.

3.2. Anti-bacterial activity of β-casein and fractions of its peptic hydrolysate

The bacterial growth of *S. aureus* CNRZ 3 at 37 °C, *L. innocua* ATCC 33090 at 30 °C, and *E. coli* ATCC 25922 at 37 °C in MHB in the

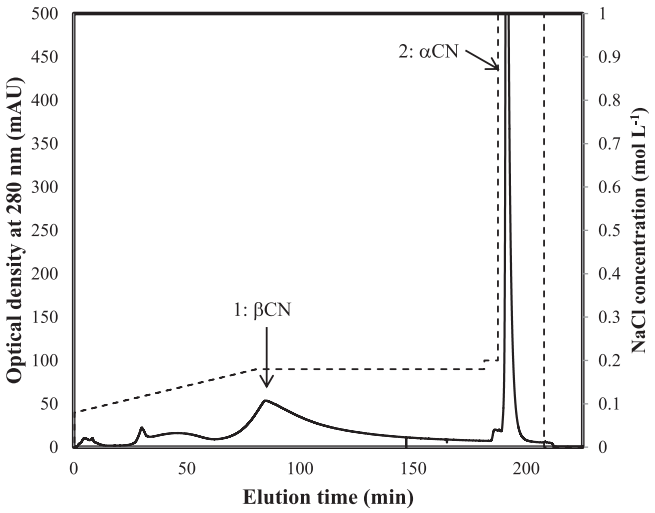


Fig. 1. Elution profile of whole casein obtained by separation on Q-Sepharose (FPLC). Absorbance at 280 nm (dashed line) and salt gradient (dotted line) are shown.

presence and in the absence of β-CN, or β-CN hydrolysate fractions at a 1 g L^{-1} concentration was monitored for 24 h by measuring optical density at 580 nm. Bacterial growth inhibition rates calculated after 24 h incubation in the presence of the different camel milk casein samples at 1 g L^{-1} are presented in Table 1. These results showed that the effects of β-CN and β-CN hydrolysate fractions with different molecular masses ranges differed between bacterial strains.

The peptides obtained from hydrolysis of β-CN showed an anti-microbial activity compared with unhydrolysed β-CN. However, the fraction <1 kDa exhibited significantly ($P < 0.05$) higher inhibitory effect against *S. aureus*, *L. innocua* and *E. coli* than other fractions.

Growth of *S. aureus* was stimulated by β-CN while β-CN hydrolysate fraction >10 kDa had no effect and β-CN hydrolysate fractions <1 kDa molecular mass and to a lesser extent intermediate molecular mass fraction (i.e., >1 kDa and <10 kDa) both inhibited *S. aureus* growth (calculated inhibition rates at 24 h were 58.3 ± 0.8% and 29.2 ± 0.6%, respectively). Taken together, these results suggest that while native β-CN does not inhibit *S. aureus* growth, peptic hydrolysis released β-CN fragments inhibiting *S. aureus* growth and that the most active fragments had a molecular mass <1 kDa.

The growth of *L. innocua* was not significantly ($P > 0.05$) affected in the presence of native β-casein and fraction >10 kDa. However, after 12 h incubation, only β-CN hydrolysate fraction <1 kDa molecular mass still inhibited *L. innocua* growth (data not shown) and, at 24 h the calculated growth inhibition rate was 45.8 ± 0.4%. Taken together, this indicates that the most active fragments inhibiting for 24 h the growth of these two Gram-positive bacterial strains had a molecular mass <1 kDa.

However, it can be noted that *E. coli* growth was significantly ($P < 0.05$) inhibited in the presence of all fractions (inhibition rates varied from 12.3 ± 0.5% to 25.6 ± 0.5%). Unlike with the two Gram-positive strains tested, β-CN hydrolysis by pepsin did not significantly increase its anti-bacterial activity.

Considering that after peptic hydrolysis of β-CN, the <1 kDa fraction was the most active towards the *S. aureus* and *L. innocua* tested strains, the peptides present in this fraction were identified.

3.3. Peptide mass spectrometry analysis and AMP database prediction

Tandem mass spectrometry analysis of the low molecular mass β-CN peptic hydrolysate fraction (<1 kDa) obtained by ultrafiltration revealed that this fraction was composed by at least 129 peptides (Table 2) generated by pepsin hydrolysis of camel β-CN; 92% of the native protein sequence was recovered. Most of identified peptides (78.3%) had a molecular mass between 1 and 2 kDa.

Sequence alignments performed for the 129 identified peptides from the fraction <1 kDa with peptides from the Nebraska University AMP database revealed that only 2 peptides, f(193–204) (PFQEPVPDPVRG; 1338 Da) and f(193–213) (PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV; 2318 Da), have at least 50% of similarity with known antimicrobial peptides, AP01399 (50%) and AP01398 (52.38%) respectively. Furthermore, sequences comparison as proposed by AMP database revealed that each fragment had at least 4 proline residues and that 8 of the 10 amino acids residues from the f(194–204) fragment from camel milk β-CN and bovine β-CN were identical (Fig. 2). These 2 peptides are casecidin 15 [bovine β-CN f(193–207); 1669 Da] and casecidin 17 [bovine β-CN f(193–209), 1881 Da] previously identified from bovine colostrum.

3.4. Data modelling and molecular dynamic analysis of camel β-casein f(193–204) fragment

A model peptide was built considering that the amino acids 193 to 204 were common to the 2 putative anti-microbial peptides obtained with the AMP database prediction and that this sequence was very similar to the N-terminal extremity of casecidins.

Similarities were found with rubisco-like proteins from *Geobacillus kaustophilus* (PDB code: 20EK and 20EJ) and 2 metal binding proteins from *Thermoplasma acidophilum* (PDB code: 406J and 405V). 20 EK protein is co-crystallised with Mg^{2+} ion, while 406J and 405V proteins were co-crystallised with Fe^{2+} ions. Target coverage was 100%, with a total score from 24.49 to 20.68. Considering that iron depletion from growth media is one of anti-bacterial mechanisms attributed to anti-microbial proteins or peptides (Chen, Yen, Lu, Yu, & Chen, 2006; Nakashige, Zhang, Krebs, & Nolan, 2015) and Fe^{2+} presence in 406J, a 406J-based model was chosen according to the final model ranking. Thus, a homology model was built with 2 Fe^{2+} ions linked to the C-terminal arginine (Fig. 3). Final energy conformation was −231.19 kJ mol^{-1}.

Table 1
Inhibition/activation percentage of *S. aureus*, *L. innocua* and *E. coli* growth by camel β-CN and its peptic hydrolysate at 1 g L^{-1}.[a]

Bacteria	Growth inhibition (%)			
	β-CN	>10 kDa	>1 kDa < 10 kDa	<1 kDa
S. aureus CNRZ3	+24.0 ± 0.2*	+3.0 ± 0.1*	−29.2 ± 0.6*	−58.3 ± 0.8*
L. innocua ATCC 33090	+10.2 ± 0.3	+10.0 ± 0.1	+6.3 ± 0.3	−45.8 ± 0.4*
	$P = 0.72$	$P = 0.52$	$P = 0.42$	$P < 0.001$
E. coli ATCC 25922	−18.2 ± 0.5*	−12.3 ± 0.5*	−25.6 ± 0.5*	−19.3 ± 0.2*

[a] Percentages (±SD) were calculated after 24 h incubation; an asterisk indicates $P < 0.05$. All experiments were performed in triplicate. Inhibition controls: nisin (2400 UI mL^{-1}) for *S. aureus* and *L. innocua*; ciproflaxacin (2 mg L^{-1}) for *E. coli*. Under these conditions, 100% of growth inhibition was obtained.

Table 2
List of peptides identified in the <1 kg mol^{-1} fraction of β-CN pepsin hydrolysate by tandem mass spectroscopy.[a]

Peptide sequence	Fragment position	Peptide sequence	Fragment position	Peptide sequence	Fragment position
EKEEFKTAGE	2–11	MDVPKTKE	94–101	LENLHLPLPLLQ	131–142
REKEEFKTAGE	1–11	PFLQPKVMDVPKTKE	87–101	LHLPLPLLQ	134–142
REKEEFKTAGEAL	1–13	VPFLQPKVMDVPKTKE	86–101	TDLENLHLPLPLLQ	129–142
KIEEQQQTEDEQQDKI	35–50	VPFLQPKVMDVPKTKE	86–101	ENLHLPLPLLQS	132–143
DKIYTFPQPQS	48–58	IIPKRKEMPLL	103–113	ENLHLPLPLLQSLM	132–145
DEQQDKIYTFPQPQSL	44–59	TIIPKRKEMPLL	102–113	YQIPQPVPQTPMIPPQS	146–162
DKIYTFPQPQSL	48–59	VPFLQPKVMDVPKTKETIIPKRKEMPLL	86–113	MYQIPQPVPQTPMIPPQSL	145–163
EQQDKIYTFPQPQSL	45–59	TIIPKRKEMPLLQS	102–115	YQIPQPVPQTPMIPPQSL	146–163
KIEEQQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	35–59	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFT	102–121	YQIPQPVPQTPMIPPQSL	146–163
KIYTFPQPQSL	49–59	PVVPFTE	116–122	YQIPQPVPQTPMIPPQSLL	146–164
QKIEKFKIEEQQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	29–59	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTE	102–122	KVLPVPQQ	170–177
QQDKIYTFPQPQSL	46–59	PVVPFTES	116–123	FKVLPVPQQM	169–178
QQQTEDEQQDKIYTFPQPQSL	39–59	QSPVVPFTES	114–123	KVLPVPQQM	170–178
DKIYTFPQPQSLV	*48–60*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTES	102–123	KVLPVPQQMVPYP	170–182
YTFPQPQSLV	*51–60*	PVVPFTESQ	116–124	FKVLPVPQQMVPYPQR	169–184
HTEPIPYPIL	*63–72*	QSPVVPFTESQ	114–124	KVLPVPQQMVPYPQR	170–184
SHTEPIPYPIL	*62–72*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQ	102–124	PVPQQMVPYPQR	173–184
VYSHTEPIPYPIL	*60–72*	MPLLQSPVVPFTESQS	110–125	FKVLPVPQQMVPYPQRA	169–185
YSHTEPIPYPIL	*61–72*	PVVPFTESQS	116–125	KVLPVPQQMVPYPQRA	170–185
VYSHTEPIPYPILPQN	*60–75*	QSPVVPFTESQS	114–125	KVLPVPQQMVPYPQRAM	170–186
YSHTEPIPYPILPQN	*61–75*	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQS	102–125	KVLPVPQQMVPYPQRAMPV	170–188
VYSHTEPIPYPILPQNF	*60–76*	PVVPFTESQSL	116–126	FKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	169–189
YSHTEPIPYPILPQNF	*61–76*	QSPVVPFTESQSL	114–126	KVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	170–189
PQNFLPPLQ	73–81	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSL	102–126	MVPYPQRAMPVQ	178–189
PQNFLPPLQPA	73–83	PVVPFTESQSLT	116–127	QMVPYPQRAMPVQ	177–189
PQNFLPPLQPAV	73–84	QSPVVPFTESQSLT	114–127	SLSQFKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	165–189
VYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAV	60–84	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLT	102–127	SQFKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	167–189
FLPPLQPAVM	76–85	LQSPVVPFTESQSLTL	113–128	VLPVPQQMVPYPQRAMPVQ	171–189
HTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	63–85	PVVPFTESQSLTL	116–128	VPYPQRAMPVQ	179–189
LPPLQPAVM	77–85	QSPVVPFTESQSLTL	114–128	KVLPVPQQMVPYPQRAMPVQA	170–190
LVYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	59–85	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLTL	102–128	*AVLPFQEPVPD*	*190–200*
NFLPPLQPAVM	75–85	DLENLHLPLPLL	130–141	*AVLPFQEPVPDPVRG*	*190–204*
PPLQPAVM	78–85	ENLHLPLPLL	132–141	***PFQEPVPDPVRG***	***193–204***
PQNFLPPLQPAVM	73–85	LENLHLPLPLL	131–141	*AVLPFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV*	*190–213*
SHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	62–85	LHLPLPLL	134–141	***PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLV***	***193–213***
VYSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	60–85	LTDLENLHLPLPLL	128–141	*PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVI*	*193–216*
YSHTEPIPYPILPQNFLPPLQPAVM	61–85	LTLTDLENLHLPLPLL	126–141	*AVLPFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVIA*	*190–217*
PQNFLPPLQPAVMV	73–86	NLHLPLPLL	133–141	LHPVPQPLVPVIA	205–217
VPFLQPKVM	86–94	QSPVVPFTESQSLTLTDLENLHLPLPLL	114–141	PFQEPVPDPVRGLHPVPQPLVPVIA	193–217
VPFLQPKVMD	86–95	TDLENLHLPLPLL	129–141	PVRGLHPVPQPLVPVIA	201–217
VPFLQPKVMDV	86–96	TIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQSLTLTDLENLHLPLPLL	102–141		
VPFLQPKVMDVPKT	86–99	TLTDLENLHLPLPLL	127–141		
VPFLQPKVMDVPKTK	86–100				

[a] Italic type indicates sequences of identified peptides that recovered the domain antimicrobial peptides generated from bovine, human and rabbit β-CN. Bold type indicates sequences of identified peptides that exhibit at least 50% similarity with antimicrobial peptides registered in AMP database.

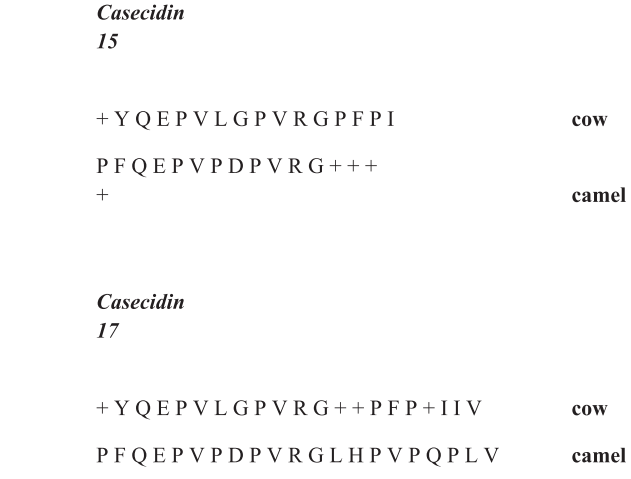


Fig. 2. Alignment of sequences of casecidins 15 and 17 from bovine colostrum with f(193–214) and f(193–213) from camel milk β-CN (generated from the Nebraska University AMP database).

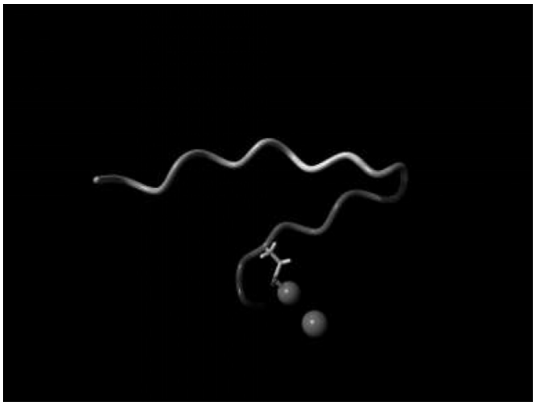


Fig. 3. Homology model of camel β-casein f(193–204) from 4O6J PDB structure. Both spheres are iron ions.

The model was put in a TIP5P water box for a 500 ns NTP molecular dynamics simulation. Thus, a deep analysis of the structure was performed. The structure starts with a hairpin configuration and the iron II ion was put in interaction with the Glu-4 residue because leap function puts positive charge in contact with negative area of the solute. The interactions between Glu-4 and Fe^{2+}, which is electrostatic according to molecular mechanics, was conserved during the whole simulation (500 ns). The length of the electrostatic bond is around 1.86 Å. The ions interact with one oxygen of carboxylic function of the Glu-4 residues and 5 TIP5P water molecules. Water molecules around the Fe^{2+} were conserved during the MD simulation and have an octahedral symmetry. The addition of a carboxylic acid is compatible with this coordination.

4. Discussion

4.1. Purification of camel β-casein and hydrolysis by pepsin

Mercier, Maubois, Poznanski, and Ribadeau-Dumas (1968) reported that classical anion exchange chromatography on a DEAE-cellulose column resolved whole bovine casein into different fractions containing γ-, κ-, β-, α_{S2}-, and α_{S1}-casein, respectively. In our case, camel milk β-CN was eluted at a 0.18 mol L^{-1} NaCl on a Q-Sepharose anion exchange column (Figs. 1 and 2). This NaCl concentration is consistent with the 0.21 mol L^{-1} NaCl concentration reported by Ochirkhuyag, Chobert, Dalgalarrondo, Choiset, and Haertlé (1997) for elution of camel milk β-CN with a QAE-Sepharose anion exchange column.

The nature and thus the biological activity of peptidic fragments generated in vitro by food proteins hydrolysis depends on protein substrate, enzyme specificity and enzymatic hydrolysis conditions like enzyme/substrate ratio and reaction time (Sarmadi & Ismail, 2010; Zhang et al., 2010). The high hydrolysis level (i.e., 39%) in the present study may both result from the fact that the enzyme/substrate ratio was high and that camel milk β-CN presents numerous potential pepsin cleavage sites in its primary structure (i.e., 46 putative cleavage sites considering the primary sequence of camel milk β-CN; http://www.expasy.org). It is consistent with the observation that the <1 kDa fraction represented 59.7% of the mass of β-CN pepsin hydrolysate. Such an extensive hydrolysis of proteins can lead to the release of bioactive peptides: for instance, Pihlanto-Leppälä, Koskinen, Piilola, Tupasela, and Korhonen (2000) isolated peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory activity after 48 h of hydrolysis of bovine whey proteins by pepsin, trypsin, chymotrypsin, pancreatin, elastase or carboxypeptidase alone and in combination.

4.2. Anti-bacterial activity of β-casein and fractions of its peptic hydrolysate

Anti-bacterial activity assays against *S. aureus* CNRZ3 and *L. innocua* ATCC 33090 growth showed that our hydrolysis parameters can effectively lead to anti-bacterial peptides release. Thus, peptide fractions from β-CN hydrolysate showed a higher inhibition of bacterial growth of these 2 Gram-positive bacterial strains compared with native β-CN (Table 1). In the same way, Jrad et al. (2015) have reported that the anti-bacterial activity of camel milk whole caseins increases compared with that of native caseins after successive hydrolysis by pepsin and pancreatin. The only Gram-negative strain studied, *E. coli*, was also the only strain from which growth was also slightly inhibited by native β-CN after 24 h incubation, while the growth of the 2 Gram-positive strains tested was slightly activated by native β-CN after 24 h incubation. After hydrolysis by pepsin, anti-bacterial activity against *E. coli* was similar to that of native β-CN except the fraction containing peptides between 1 kDa and 10 kDa molecular weight which had a significantly ($P > 0.05$) higher anti-bacterial activity. This suggests thus that most of anti-bacterial peptides active against *E. coli* released by pepsin had a molecular mass between 1 and 10 kDa.

The fraction containing molecules with a molecular mass exceeding 10 kDa stimulated *S. aureus* and *L. innocua* growth. However, unlike with *E. coli* ATCC 25922 strain, the fraction containing the smallest peptides, i.e., mainly from 1 kDa to 2 kDa, was the most active fraction against both *S. aureus* CNRZ3 and *L. innocua* ATCC 33090 strains. Several authors already reported that the fraction with a molecular weight lower than 1 kg mol^{-1} had the highest anti-bacterial activity in casein hydrolysates obtained following hydrolysis by various enzymes including the array of proteolytic enzymes involved in caseinolysis during cheese ripening (Nguyen-Thi, Dupas, Adt, Degraeve, Ragon, Missaoui, et al., 2014) or gastro-intestinal digestion.

4.3. Peptide mass spectrometry analysis and AMP database prediction

Tandem mass spectroscopy analysis of the most active fraction, i.e., that with the low molecular mass (<1 kDa) revealed that this fraction contained at least 129 fragments from β-CN, of which a large majority had a molecular mass between 1 and 2 kDa The method used cannot detect peptides with less than 5–6 amino acid residues and separation by ultrafiltration does not rely upon a strict molecular mass threshold (e.g., the separation between peptides crossing or not the ultrafiltration membrane is also influenced by the peptide conformation as well as by potential interactions between peptides leading to the formation complexes with a higher molecular mass than individual peptides).

This result is consistent with the observation that many authors identified low molecular mass fragments derived from other β-CN caseins mammals that were active against both Gram-positive and Gram-negative bacteria: rabbit β-CN f(50–56) and f(64–77) (Baranyi et al., 2003), human β-CN f(184–210) (Minervini et al., 2003), bovine β-CN f(193–207) and f(193–209) (casecidins 15 and 17, respectively; Birkemo et al., 2009). However, although mass spectrometry analysis reveals that the <1 kDa fraction contained at least 17 peptides that recovered those 5 β-CN domains, only 2 of them had at least 50% of similarity with anti-microbial peptides considering AMP database information. Interestingly, these 2 peptides, camel milk β-casein f(193–204) and f(193–213), corresponded to casecidins 15 and 17, respectively. Sequences comparison revealed a high homology between fragment from camel milk β-CN and bovine β-CN. The minimal inhibitory concentration (MIC) values against *E. coli* of bovine casecidins 15 and 17 were identical: i.e., 0.4 and 0.5 g L^{-1} against *E. coli* DPC6053 and DH5 strains, respectively (Birkemo et al., 2009). To date, no data concerning the activity of these two bovine casecidins against *S. aureus* or *Listeria* was found.

4.4. Data modelling and molecular dynamic analysis of camel β-casein f(193–204) fragment

Structural modelling of casecidins 15 and 17 suggested that these 2 peptides had an amphiphilic structure due to their high level identity in their primary sequence (Birkemo et al., 2009), this structure could interrupt the bacterial membrane and could be responsible for the observed antibacterial activity. The high level of identity between those 2 peptides and the camel milk β-CN f(193–204) and f(193–213) can be due to the combination of proline and hydrophobic residues which

may provide protection against further hydrolysis (Birkemo et al., 2009). To determine if the homology between camel and bovine fragments was sufficient to obtain a structural homology, a molecular structure of the camel β-CN f(193–204) sequence was built. As attempted, molecular structure modelling of the camel β-CN f(193–204) sequence showed a similar amphiphilic structure to that of the bovine sequence due to the 4 proline and the glutamine-4 and valine-21 residues. The structure of the protein varies during the first half of the molecular dynamics simulation to be completely open in the middle. After this step, the Fe^{2+} ions interact with the carboxylic function of the acidic end of the protein and close to the hairpin configuration. The C-terminal carboxyl group interacts with a water molecule which interacts with one of the five water molecules of the first layer of solvent. This interaction bridge is kept during all the second half of the molecular dynamics simulation and drastically stabilises the system. The average deviation of the root mean square displacement is reduced from 0.49 to 0.26 Å. The stabilisation induces a swift between the two sides of the protein. The protein has a hydrophobic core that is composed of Pro-5, Val-6, Pro-7, Val-16, Pro-17, Pro-19, and Leu-20. These residues interact by hydrophobic interactions and are very packed. This kind of interaction is very weak, but the electrostatic interactions with iron II ions made a sort of locker that maintained the structure in a very stable conformation. Thus, the peptide can be stabilised by the presence of bivalent cations like Fe^{2+}. Those observations lead us to conclude that the anti-microbial activity of the camel milk β-CN f(193–204) and f(193–213) could both result from disruption of bacterial membrane as it has been previously suggested for their bovine counterparts and/or cation depletion of culture media by this 2 identified peptides. However, further studies are now needed to test whether other Gram-negative bacterial strains are also less sensitive to β-CN peptic fragments and also to explore the real mechanism leading to microbial growth inhibition in relation to membrane properties (e.g., membrane disruption, fluidity modification) and iron or other cation scavenging.

5. Conclusions

This study shows that camel milk β-CN, the major protein of camel milk, can be hydrolysed with pepsin to increase its antibacterial activity. Furthermore, the pepsin hydrolysate fraction of β-CN containing molecules of <1 kDa molecular mass was the most active against the two Gram-positive strains tested, while the pepsin β-CN hydrolysate fraction with molecules between 1 and 10 kDa molecular mass was the most active against *E. coli* ATCC 25922 strain. Taken together, these results suggest that antibacterial fragments from camel milk β-casein (initial molecular mass: 31 kDa) were released following its hydrolysis by pepsin. Mass spectrometry analysis and anti-bacterial activity prediction revealed the presence of 2 fragments, f(193–204) and f(193–213) that were very similar to 2 anti-microbial peptides released from bovine β-casein, casecidins 15 and 17. A synthesis of these 2 camel milk β-CN fragments should now be performed to (i) confirm that they are responsible for the observed anti-microbial effects and (ii) determine their mechanism of action. As β-CN is the major casein in camel milk (65% of total caseins), production of such bioactive peptides could open the way to a new valorisation of camel milk after enzymatic treatment in the same way as bovine milk α_{S1}-casein hydrolysis by trypsin to release α-casozepine, a peptide with benzodiazepine-like activity (Miclo, Perrin, Driou, Papadopoulos, Bouirad, Vanderesse, et al., 2001), present in commercial α_{S1}-casein hydrolysate Lactium™ (Ingredia).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the “Université Mouloud Mammeri” of Tizi Ouzou (Algeria) for supporting Dalila Almi-Sebbane stay in BioDyMIA research unit (Université Claude Bernard Lyon 1, France) and “Conseil Départemental de l’Ain” and “Bourg en Bresse Agglomération, France” for financial support of BioDyMIA research unit activities.

References

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27*, 1256–1262.

Baranyi, M., Thomas, U., & Pellegrini, A. (2003). Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk. *Journal of Dairy Research, 70*, 189–197.

Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., & Tomita, M. (1992). Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bacterial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology, 73*, 472–479.

Birkemo, G. A., O'Sullivan, O., Ross, R. P., & Hill, C. (2009). Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrums. *Journal of Applied Microbiology, 106*, 133–240.

Bouarab-Chibane, L., Ouled-Bouhedda, B., Léonard, L., Gemelas, L., Bouajila, J., Ferhout, H., et al. (2017). Preservation of fresh ground beef patties using plant extracts combined with a modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology, 243*, 1997–2009.

Case, D. A., Cheatham, T. E., III, Darden, T., Gohike, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., et al. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry, 26*, 1668–1688.

Chen, H.-L., Yen, C.-C., Lu, C.-Y., Yu, C.-H., & Chen, C.-M. (2006). Synthetic porcine lactoferricin with a 20-residue peptide exhibits antimicrobial activity *against Escherichia coli, Staphylococcus aureus*, and Candida albicans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54*, 3277–3282.

Clare, D. A., & Swaisgood, H. E. (2000). Bioactive milk peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science, 83*, 1187–1195.

El-Agamy, E. I., Nawar, M., Shamsia, S. M., Awad, S., & Haenlein, G. F. W. (2009). Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research, 82*, 1–6.

Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Stanton, C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology, 72*, 2260–2264.

Hill, R. D., Lahov, E., & Givol, D. (1974). A rennin-sensitive bond in α_{S1} β-casein. *Journal of Dairy Research, 41*, 147–153.

Hooft, R. W., Vriend, G., Sander, C., & Abola, E. E. (1996). Errors in protein structures. *Nature, 381*, 272.

Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., & Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple AMBER force field and development of improved protein backbone parameters. *Proteins, 65*, 712–725.

Joosten, R. P., Beek, T. A., Krieger, E., Hekkelman, M. L., Hooft, R. W., Schneider, R., et al. (2011). A series of PDB related databases for everyday needs. *Nucleic Acids Research, 39*, D411–D419.

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 Hung, 44*, 609–616.

Jrad, Z., Girardet, J. M., Adt, I., Oulahal, N., Degraeve, P., Khorchani, T., et al. (2014). Antioxidant activity of camel milk casein before and after in vitro simulated enzymatic digestion. *Mjekarstovo, 64*, 287–294.

Kappeler, S., Farah, Z., & Puhan, Z. (1998). Sequence analysis of *Camelus dromaderius* milk caseins. *Journal of Dairy Research, 65*, 209–222.

Krieger, E., & Vriend, G. (2014). YASARA view – molecular graphics for all devices – from smartphones to workstations. *Bioinformatics, 30*, 2981–2982.

Kumar, D., Manish-Kumar, C., Raghvendar, S., Mehtaa, N., & Kumar, P. (2016). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research, 139*, 20–25.

Lahov, E., & Regelson, W. (1996). Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology, 34*, 131–145.

Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., & Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A tool to manage sequence redundancy for protein inference and phosphosite identification. *Journal of Proteome Research, 16*, 494–503.

Meisel, H., & Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: Proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek, 76*, 207–215.

Mercier, J. C., Maubois, J. L., Poznanski, S., & Ribadeau-Dumas, B. (1968). Preparative fractionation of caseins from cattle and sheep by chromatography on DEAE. using urea and 2-mercaptoethanol. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 50*, 521–530.

Miclo, L., Perrin, E., Driou, A., Papadopoulos, V., Bouirad, N., Vanderesse, R., et al. (2001). Characterization of α-casozepine, a tryptic peptide from

bovine α_{S1}-casein with benzodiazepine-like activity. *FASEB Journal, 15*, 1780–1782.
Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C. G., Fox, P. F., Monnet, V., & Gobbetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology, 69*, 5297–5305.
Nakashige, T. G., Zhang, B., Krebs, C., & Nolan, E. M. (2015). Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. *Nature Chemical Biology, 11*, 765–771.
Nguyen-Thi, P., Dupas, C., Adt, I., Degraeve, P., Ragon, M., Missaoui, M. F., et al. (2014). Partial characterization of peptides inhibiting *Listeria* growth in two Alpine cheeses. *Dairy Science & Technology, 94*, 61–72.
Ochirkhuyag, B., Chobert, J. M., Dalgalarrondo, M., Choiset, Y., & Haertlé, T. (1997). Characterization of caseins from Mongolian yak, khainak, and bacterian camel. *Le Lait, 7*, 601–613.
Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *Journal of Dairy Research, 67*, 53–64.
Salami, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Moosavi-Movahedi, F., Ehsani, M. R., Yousefi, R., Fahadi, M., et al. (2011). Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research, 78*, 471–487.
Salami, M., Yousefi, R., Ehsani, M. R., Dalgalarrondo, M., Chobert, J. M., Haertlé, T., et al. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal, 18*, 1097–1102.
Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides, 31*, 1949–1956.
Wangoh, J., Farah, Z., & Puban, Z. (1998). Iso-electric focusing of camel milk proteins. *International Dairy Journal, 8*, 617–621.
Zhang, J., Zhang, H., Wang, L., Guo, X., Wang, X., & Yao, H. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptide from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry, 119*, 226–234.