

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE CONSTANTINE 1



**INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET  
DES TECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES  
I.N.A.T.A-A.**

N° d'ordre :  
N° de série :

**Thèse**

en vue de l'obtention du diplôme de  
**DOCTORAT EN SCIENCES**  
Spécialité : **Sciences Alimentaires**

---

**Peptides antimicrobiens : préparation à partir de  
protéines laitières**

---

Présentée par  
**Faiza ADOUI**

Soutenue le 18/10 /2014

**Devant le Jury :**

Président :	<b>Mr AGLI A.</b>	Professeur	I.N.A.T.A-A., Univ. Constantine 1
Directeur de thèse :	<b>Mr ZIDOUNE M.N.</b>	Professeur	I.N.A.T.A-A., Univ. Constantine 1
Co-Encadreur :	<b>Mme NEDJAR N.</b>	Professeur	Univ. Lille 1
Examineurs :	<b>Mr DRIDER D.</b>	Professeur	Univ. Lille 1
	<b>Mr BOUDEROUA K.</b>	Professeur	Univ. Mostaganem
	<b>Mme AMOURACHE L.</b>	Maître de conf.	I.N.A.T.A-A., Univ. Constantine 1

## **Remerciements**

*La présente thèse a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien ProBioGEM de L'Université Lille 1 (France) sous la direction du professeur **Pascal Dhulster**. Je le remercie de m'avoir accueilli.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à Madame le professeur **Naïma Nedjar-Arroume**, de m'avoir accueillie au sein de son équipe au laboratoire ProBioGEM pendant mon séjour en France. Ses conseils, ses orientations et sa patience pour mener à bien ce travail, m'ont été précieux.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur le professeur **Mohammed Nasreddine Zidoune**, dont les encouragements et les conseils bienveillants m'ont permis de réaliser ce travail.*

*Mes remerciements vont aux membres de jury qui ont bien voulu juger ce travail,*

*Monsieur le professeur **AGLI** qui me fait l'honneur de présider ce jury,*

*Monsieur le professeur **DRIDER** qui a bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Monsieur le professeur **BOUDEROUA** qui a bien voulu examiner ce travail,*

Docteur, Mademoiselle **AMOURACHE** qui a bien voulu accepter de juger ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Monsieur le Docteur **Nour-Eddine Chihib** du laboratoire ProBioGEM qui m'a initié aux techniques microbiologiques appliquées dans ce travail et pour tous ses conseils.

Je n'oublie pas de remercier le personnel permanent du laboratoire de ProBioGEM pour leur sympathie et leur aide scientifique, je cite en particulier **Guabrielle Chataigne** pour son aide dans les analyses de spectrométrie de masse ainsi que tous les thésards et les stagiaires pour leur encouragement et leur amitié.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur **Boudjellal**, Directeur de l'INATAA pour son aide et sa compréhension, qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Un grand merci à mes collègues de l'INATAA, qui, par leur encouragement, et leur amitié, m'ont soutenu.

Merci à ma mère en particulier et à toute ma famille pour son soutien permanent, pour ses encouragements.

## SOMMAIRE

Abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	vi
<b>INTRODUCTION</b>	<b>p 1</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>p 5</b>
<b>I. Les peptides antimicrobiens</b>	<b>p 6</b>
I.1. Généralités	p 6
I.2. Structure des peptides antimicrobiens	p 7
I.3. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens	p 9
I.3.1. Modèles décrivant le mécanisme déstabilisant la membrane cytoplasmique	p 11
I.3.1.1. Modèle des pores en douve de tonneau «Barrel–stave model »	p 11
I.3.1.2. Modèle des pores toroïdaux « torroidal pore ou Wormhole model »	p 12
I.3.1.3. Modèle en tapis « carpet-like »	p 12
I.3.1.4. Modèle par agrégat « agregate model »	p 12
<b>II. Obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines</b>	<b>p 13</b>
II.1. Généralités	p 13
II.2. Obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique des caséines	p 15
II.2.1. Les caséines	p 15
II.2.1.1. Caséines bovines	p 15
II.2.1.1.1. Caséine $\alpha_{s1}$	p 16
II.2.1.1.2. Caséine $\alpha_{s2}$	p 16
II.2.1.1.3. Caséine $\beta$	p 19
II.2.1.1.4. Caséine $\kappa$	p 19
II.2.1.2. Caséines camelines	p 21
II.2.1.2.1. Caséine $\alpha_{s1}$	p 22
II.2.1.2.2. Caséine $\alpha_{s2}$	p 22

II.2.1.2.3. Caséine $\beta$	p 23
II.2.1.2.4. Caséine $\kappa$	p 24
II.2.2. Protéases digestives (la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine)	p 25
II.2.2.1. Pepsine porcine	p 25
II.2.2.1.1. Structure	p 25
II.2.2.1.2. Mécanisme d'action	p 26
II.2.2.2. Trypsine	p 28
II.2.2.2.1. Structure	p 28
II.2.2.2.2. Mécanisme d'action	p 29
II.2.2.3. Chymotrypsine	p 29
II.2.2.3.1. Structure	p 29
II.2.2.3. 2. Mécanisme d'action	p 30
II.2.3. Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse des caséines	p 31
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>p 34</b>
<b>I. Matériel biologique</b>	<b>p 35</b>
I.1. Caséine bovine	p 35
I.2. Caséine cameline	p 35
I.3. Protéases	p 35
<b>II. Conditions de protéolyse des caséines</b>	<b>p 36</b>
<b>III. Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA)</b>	<b>p 37</b>
<b>IV. Séparation des peptides actifs par précipitation sous l'effet de la force ionique et du pH</b>	<b>p 38</b>
<b>V. Dosage du taux de protéines et de peptides</b>	<b>p 39</b>
<b>VI. Méthodes d'analyse des peptides</b>	<b>p 40</b>
VI.1. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE)	p 40
VI.2. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse (RP-HPLC)	p 41
VI.3. Analyse des peptides par Spectrométrie de masse	p 41

VI.3.1. Analyse des peptides par couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC/MS)	p 43
VI.3.2. Analyse des peptides par la technique de la désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF)	p 44
<b>VII. Tests antimicrobiens</b>	<b>p 46</b>
VII.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	p 46
VII.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides actifs	p 46
VII.3. Mise en évidence de l'effet bactéricide ou bien bactériostatique des peptides actifs	p 47
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>p 48</b>
<b>I. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens issus de la protéolyse de la caséine bovine</b>	<b>p 49</b>
I.1. Comportement à la protéolyse de la caséine bovine	p 50
I.1.1. Hydrolyse pepsique	p 50
I.1.2. Hydrolyse trypsique	p 57
I.1.3. Hydrolyse chymotrypsique	p 62
I.2. Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne dans les hydrolysats de la caséine bovine	p 67
I.3. Séparation des peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysat de la caséine bovine par précipitation sous l'effet de la force ionique et du pH	p 69
I.4. Identification et caractérisation des peptides actifs issus de la caséine bovine par spectrométrie de masse	p 74
I.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et du mode d'action des peptides actifs	p 81
<b>II. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens issus de la protéolyse de la caséine cameline</b>	<b>p 88</b>
II.1. caractéristiques de la caséine cameline préparée à partir du lait cru	p 89
II.2. Comportement à la protéolyse de la caséine cameline	p 92
II.2.1. Hydrolyse pepsique	p 92
II.2.2. Hydrolyse trypsique	p 99

II.2.3.Hydrolyse chymotrypsique	<b>p 109</b>
II.3. Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne dans les 'hydrolysats de la caséine cameline	<b>p 117</b>
II.4. Identification et caractérisation des peptides actifs issus de la caséine cameline par spectrométrie de masse	<b>p 120</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>p 125</b>
<b>REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>p 129</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMES</b>	

## ABBREVIATIONS

AA	Acides Aminés
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse)
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DH	Degré d'Hydrolyse
E/S	Rapport Enzyme/Substrat
ESI	Electrospray source Ionisation (Ionisation Electrospray)
LC/MS	Liquide Chromatographie/ masse Spectrometry (Couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse)
LPS	Lipopolysacharrides
MALDI	Matrice Assisted Laser Desorption Ionisation (Désorption/ionisation laser assistée par matrice)
MS	Masse Spectrometry (Spectrométrie de masse)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MH	Müller- Hinton
PAM	Peptides Anti Microbiens
OPA	Ortho Phtaldi Aldehyde
SDS-PAGE	Sodium Dodicyl Sulfate – Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS)
TOF	Time Of Flight (Temps de vole)
TFA	Tri Fluoroacetic Acid (Acide trifluoroacétique)
UFC	Unité Formant Colonie



## Liste des figures

### Partie rappels bibliographiques

<b>Figure 1</b>	Structures prototypiques des peptides antimicrobiens (Wang, 2013)	<b>p 8</b>
<b>Figure 2</b>	Structure de la paroi bactérienne (Corvec, 2009)	<b>p 10</b>
<b>Figure 3</b>	Modèles décrivant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique par les peptides antimicrobiens (Jenssen et coll., 2006)	<b>p 11</b>
<b>Figure 4</b>	Structure primaire de la caséine $\alpha_{S1}$ (B-8P) bovine (Mercier et coll., 1971, Grosclaude et coll., 1973 cité par Farrel et coll., 2004)	<b>p 18</b>
<b>Figure 5</b>	Structure primaire complète de la caséine $\alpha_{S2}$ (A-11P) bovine (Brignon et coll., 1977 ; Groenen et coll., 1993)	<b>p 18</b>
<b>Figure 6</b>	Structure primaire de la caséine $\beta$ (A <sup>2</sup> -5P) d'après Ribadeau-Dumas et coll., 1972 corrigée par Carles et coll., 1988	<b>p 20</b>
<b>Figure 7</b>	Structure primaire de la Caséine $\kappa$ bovine d'après Mercier et coll., 1973	<b>p 20</b>
<b>Figure 8</b>	Séquence primaire du variant génétique B de la caséine $\alpha_{S1}$ cameline d'après Kappeler et coll., 1998.	<b>p 23</b>
<b>Figure 9</b>	Séquence primaire de la caséine $\alpha_{S2}$ cameline (Kappeler et coll., 1998)	<b>p 23</b>
<b>Figure 10</b>	Séquence primaire de la caséine $\beta$ cameline (Kappeler et coll., 1998)	<b>p 24</b>
<b>Figure 11</b>	Séquence primaire de la caséine $\kappa$ cameline d'après Kappeler et coll., 1998	<b>p 25</b>
<b>Figure 12</b>	Séquence complète d'acides aminés de la pepsine porcine (Sepulveda et coll., 1975)	<b>p 27</b>
<b>Figure 13</b>	Représentation des positions des acides amines au sein du site actif de la protéase	<b>p 27</b>
<b>Figure 14</b>	Structure primaire du trypsinogène d'après Mikes et coll., (1966)	<b>p 28</b>
<b>Figure 15</b>	Activation du chymotrypsinogène	<b>p 30</b>
<b>Figure 16</b>	Structure de la chymotrypsine bovine avec localisation des ponts disulfures selon Brown et Hartley, 1966	<b>p 31</b>

### Partie matériel et méthodes

<b>Figure 1</b>	Réaction de orthophtaldialdéhyde (OPA) avec les groupements amines	<b>P 37</b>
<b>Figure 2</b>	Courbe d'étalonnage à la leucine (mg/ml) selon la méthode OPA	<b>p 38</b>
<b>Figure 3</b>	Courbe d'étalonnage à la peptone (mg/ml) selon la méthode OPA	<b>p 39</b>

- Figure 4** Photo de la chaîne UHPLC de type Accela (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) couplée à un spectromètre de masse Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) équipé d'une source d'ion électrospray (ESI) **p 43**
- Figure 5** Photo du spectromètre de masse de type UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) **p 45**

### Partie résultats et discussions

- Figure 1** Profils HPLC (**a** et **b**) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C **p 53**
- Figure 2** Profil HPLC à 215 nm (**a, b, c et d**) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100 **p 55**
- Figure 3** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine (E/S = 1/100) **p 56**
- Figure 4** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la pepsine (E/S=1/100) **p 56**
- Figure 5** Profil HPLC (**a** et **b**) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine à différents rapports (E/S) par la trypsine à pH 7,8 et à 37°C **p 58**
- Figure 6** Profil HPLC à 215 nm (**a, b, c et d**) de la cinétique d'hydrolyse tryptique de la caséine bovine à pH 7,8 et à 37°C, E/S = 1/100 **p 60**
- Figure 7** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) de la cinétique d'hydrolyse tryptique de la caséine bovine (E/S=1/100) **p 61**
- Figure 8** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la trypsine (E/S = 1/100) **p 61**
- Figure 9** Profil HPLC (**a** et **b**) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine à différents rapports (E/S) par la chymotrypsine à pH 7,8 et à 37°C **p 63**
- Figure.10** Profil HPLC à 215 nm (**a, b, c et d**) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine bovine à pH 7,8 et à 37°C, E/S = 1/250 **p 65**
- Figure 11** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine bovine (E/S=1/250) **p 66**
- Figure 12** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la chymotrypsine (E/S = 1/250) **p 66**
- Figure 13** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche *E.coli* **JM109** des hydrolysats pepsiques de la caséine bovine **p 68**
- Figure 14** Profil HPLC de l'hydrolysat de caséine bovine obtenu à 30 min d'hydrolyse pepsique, (les fractions actives sont indiquées en noire) **p 69**
- Figure 15** Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différentes forces ioniques exprimé en molarité de NaCl ajouté à l'hydrolysat, pH maintenu à 7,5 **p 71**
- Figure 16** Profil HPLC de l'extrait peptidique issu de l'hydrolysat pepsique à 30min de la caséine bovine par précipitation à 2M de NaCl et à pH 7,5 **p 72**

<b>Figure 17</b>	Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différents pH de l'hydrolysat pepsique de la caséine bovine	<b>p 73</b>
<b>Figure 18</b>	Photos montrant les zones d'inhibition observées sur <i>E.coli</i> JM109 (a) et <i>L. innocua</i> (b) des solutions obtenues par précipitation à différents pH de l'hydrolysat pepsique de la caséine bovine	<b>p 74</b>
<b>Figure 19</b>	Spectre de masse du peptide $\alpha_{s2}$ (164-207) analysé par LC/MS.(ESI/Q)	<b>p 76</b>
<b>Figure 20</b>	Spectres de masse des fractions 4, 10, 13, 14, 15 et 17 collectées sur HPLC à partir de l'extrait peptidique et analysées par MALDI-TOF	<b>p 77</b>
<b>Figure 21.</b>	Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine $\alpha_{s1}$ (a) et de la caséine $\alpha_{s2}$ (b) bovine	<b>p 82</b>
<b>Figure 22</b>	Photos montrant les zones d'inhibition des échantillons testés sur les souches cibles	<b>p 87</b>
<b>Figure 23</b>	profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15 % d'acrylamide) du lactosérum camelin obtenu à différents valeurs de pH de précipitation des caséines	<b>p 90</b>
<b>Figure 24</b>	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) d'échantillons de lait bovin et camelin et de caséines bovines et camelines	<b>p 90</b>
<b>Figure 25</b>	Spectre de masse de la caséine cameline obtenue par MALDI-TOF	<b>p 91</b>
<b>Figure 26</b>	Profils HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine cameline obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C	<b>p 93</b>
<b>Figure 27</b>	Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100 en comparaison à celui de la caséine bovine (a', b', c', d')	<b>p 97</b>
<b>Figure 28</b>	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine cameline (a) en comparaison à celui de la caséine bovine (b)	<b>p 98</b>
<b>Figure 29</b>	Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la pepsine en comparaison à la caséine bovine (E/S =1/100)	<b>p 99</b>
<b>Figure 30</b>	Profil HPLC (a et b) des hydrolysats trypsique de 24 H de la caséine cameline à différents rapports (E/S) à pH 7,8 et à 37°C	<b>p 101</b>
<b>Figure 31</b>	Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100 en comparaison à celui de la caséine bovine (a', b', c', d')	<b>p 105</b>
<b>Figure 32</b>	Profil HPLC à 215 nm de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100	<b>p 107</b>
<b>Figure 33</b>	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline (a) en comparaison à celui de la caséine bovine (b)	<b>p 108</b>

<b>Figure 34</b>	Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la trypsine en comparaison à la caséine bovine (E/S =1/100)	<b>p 109</b>
<b>Figure 35</b>	Profil HPLC ( <b>a</b> et <b>b</b> ) des hydrolysats chymotrypsique de 24 H de la caséine cameline à différents rapports (E/S) à pH 7,8 et à 37°C	<b>p 110</b>
<b>Figure 36</b>	Profil HPLC à 215 nm ( <b>a, b, c</b> et <b>d</b> ) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/250 en comparaison à celui de la caséine bovine ( <b>a', b', c', d'</b> )	<b>p 114</b>
<b>Figure 37</b>	Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine cameline ( <b>a</b> ) en comparaison à celui de la caséine bovine ( <b>b</b> )	<b>p 115</b>
<b>Figure 38</b>	Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la chymotrypsine en comparaison à la caséine bovine (E/S =1/250)	<b>p 116</b>
<b>Figure 39</b>	photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche <i>E. coli</i> CIP 54127 des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline	<b>p 119</b>
<b>Figure. 40</b>	Photos montrant les zones d'inhibition obtenues pour les fractions actives d'hydrolysat de caséine cameline	<b>p 119</b>
<b>Figure 41</b>	Profil HPLC à 215nm de l'hydrolysat de caséine cameline obtenu à 3 H d'hydrolyse pepsique, les fractions actives sont indiquées en rouge	<b>p 120</b>
<b>Figure 42</b>	Spectre de masse de la fraction de 64 min de temps d'éluion sur HPLC, issue de l'hydrolysat pepsique de la caséine cameline et analysée par MALDI-TOF	<b>p 121</b>

## Liste des tableaux

### Partie rappels bibliographiques

<b>Tableau 1</b>	Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens, selon la Base de données des peptides antimicrobiens ( <a href="http://aps.unmc.edu/AP/main.php">http://aps.unmc.edu/AP/main.php</a> )	<b>p 9</b>
<b>Tableau 2</b>	Caractéristiques physico-chimiques des caséines bovines (Eigel et coll., 1984, Farrell et coll., 2004)	<b>p 17</b>
<b>Tableau 3</b>	Caractéristiques physico-chimiques des caséines camelines (Ochirkhuyag et coll., 1997 et Kappeler et coll., 1998)	<b>p 22</b>
<b>Tableau 4</b>	principaux peptides antimicrobiens issus de caséines	<b>p 33</b>

### Partie résultats et discussions

<b>Tableau 1</b>	Activité antibactérienne des hydrolysats pepsiques de la caséine bovine, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide	<b>p 68</b>
<b>Tableau 2</b>	Activité antibactérienne des fractions peptidiques collectées sur HPLC à partir de l'extrait peptidique	<b>p 72</b>
<b>Tableau 3</b>	Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides contenus dans l'extrait peptidique de l'hydrolysate pepsique de la caséine bovine	<b>p 78</b>
<b>Tableau 4</b>	Concentration minimale inhibitrice (CMI) du peptide $\alpha_{s2}$ (164-207) et de l'extrait peptidique en comparaison à la tétracycline et la nisine	<b>p 85</b>
<b>Tableau 5</b>	Taux de mortalité cellulaire engendré par le peptide $\alpha_{s2}$ (164-207) et de l'extrait peptidique lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à leurs CMI	<b>p 86</b>
<b>Tableau 6</b>	Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle écrémé	<b>p 89</b>
<b>Tableau 7</b>	Activité antibactérienne des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide	<b>p 118</b>
<b>Tableau 8</b>	Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides, libérés de l'hydrolyse pepsique de la caséine bovine, contenus dans les fractions actives	<b>p 122</b>

# **INTRODUCTION**

Dans le secteur de l'industrie alimentaire le défi majeur est de faire face aux problèmes des altérations alimentaires d'origine microbienne ainsi que de lutter contre les pathogènes conventionnels et émergents. Les industriels ont eu toujours recours à l'emploi de produits de synthèse mis au point par l'industrie chimique, ces substances ont été employées couramment comme conservateurs alimentaire pour empêcher la détérioration des aliments (Multon, 2002). A la longue, ces molécules ont montré un certain nombre d'inconvénients et de limites d'utilisation (toxicité chronique : effet cancérigène et allergène...) (Barbier Du Vimont, 2011). Cette situation a poussé les spécialistes du domaine à s'orienter vers l'application de molécules antimicrobiennes d'origine naturelles tels que les protéines ou peptides antimicrobiens et les bactériocines (lactoferrine, nisine...).

C'est, en fait, l'apparition avec ampleur inquiétante de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes vis à vis des antibiotiques conventionnels qui a incité les chercheurs à trouver des substituts à ces molécules. Les molécules de substitution devraient posséder un mécanisme d'action différent de celui des antibiotiques classiques. Cela était à l'origine d'études approfondies sur les systèmes de défense naturellement présents chez les êtres vivants. Et c'est ainsi, que de nombreux peptides antimicrobiens issus de différentes espèces ont été découverts. A ce jour, 2361 peptides (dont 218 bactériocines, 305 peptides d'origine végétale et 1778 d'origine animale) ont été identifiés et enregistrés dans la base de données des peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Parmi ces peptides figurent ceux issus d'hydrolyse enzymatique de protéines alimentaires. En effet, plusieurs études ont montré les propriétés antimicrobiennes de certaines protéines alimentaires (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine,...) ainsi que la possibilité de générer des peptides actifs par hydrolyse enzymatique de protéines, in vivo ou bien in vitro (Bellamy et coll., 1992 ; Kitts et Weiler, 2003 ; Pellegrini, 2003).

Ainsi, plusieurs peptides antimicrobiens ont été obtenus par hydrolyse enzymatique de protéines de l'œuf (Ibrahim et coll., 1998 et 2001), de l'hémoglobine bovine (Froidevaux et coll, 2001 ; Nedjar-Arroume et coll., 2006 et 2008) et plus récemment, à partir d'hydrolysats de protéines de poissons (Song et coll., 2011 ; Sila et coll., 2013).

Toutefois, ce sont les protéines du lait qui ont suscité le plus d'intérêt. En effet, plusieurs peptides antimicrobiens ont été libérés par hydrolyse enzymatique de protéines du lait, inactives à l'état natif. C'est le cas des protéines de lactosérum notamment l'  $\alpha$ -

lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline qui ont généré, par hydrolyse enzymatique, plusieurs peptides antimicrobiens. (Pellegrini et coll., 1999 et 2001 ; Theolier et coll., 2013). Ces peptides sont principalement actifs sur des bactéries à Gram positif. L'activité antimicrobienne de la lactoferrine, ainsi que celle des peptides issus de son hydrolyse enzymatique, ont fait l'objet de nombreuses études (Masson et Heremans 1968 ; Bellamy et coll., 1992 ; Wakabayashi et coll., 2006 ; Sinha et coll., 2013).

Les caséines, protéines majeures du lait, libèrent, également, par hydrolyse enzymatique différents peptides antimicrobiens avec un spectre d'action encore plus large (actifs aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur celles à Gram négatif). Lahov et coll. (1971), étaient les premiers à identifier un polypeptide de haut poids moléculaire et de caractère basique nommé casécidine après traitement du lait acidifié par la présure. Depuis, plusieurs peptides issus des différentes fractions de la caséine de différentes espèces ont été séparés (Hill et coll., 1974 ; Recio et Visser, 1999 ; Malkoski et coll., 2001 ; Baranyi et coll., 2003 ; Minervini et coll., 2003 ; Mc Cann et coll. 2006).

L'emploi de protéines alimentaires comme source de peptides antimicrobiens est l'une des méthodes prometteuses qui présentent l'avantage d'être applicables à grande échelle et d'employer des matières premières disponibles. En outre, bien que leur innocuité doive être vérifiée, l'origine alimentaire des protéines fait que la toxicité des peptides obtenus soit moins probable.

L'objectif de cette étude est l'obtention de peptides antimicrobiens à partir de protéolysats enzymatiques de caséines provenant de deux espèces : bovine et cameline. L'hydrolyse des caséines camelines pour générer des peptides antimicrobiens ne semble pas avoir fait d'objet d'étude. Ces protéines sont présentes à une teneur comparable dans les laits des deux espèces (Farah et Rüegg, 1989) mais diffèrent dans les proportions des fractions caséiniques. La caséine  $\beta$  est la plus abondante dans le lait de chamelle (65% des caséines) alors que dans le lait bovin, elle vient en deuxième rang après la caséine- $\alpha_{s1}$  mais avec des taux qui se rapprochent (36% et 34% pour la caséine  $\alpha_{s1}$  et caséine  $\beta$ , respectivement). Les caséines des deux espèces expriment des taux de similitude de structure primaire variables (39% pour la caséine  $\alpha_{s1}$ , 56% pour la caséine  $\alpha_{s2}$  et la caséine  $\kappa$  et 64% pour la caséine  $\beta$  (Ochirkhuyag et coll., 1997 et Kappeler et coll., 1998).



Afin de déterminer les meilleures conditions d'obtention de peptides actifs, la protéolyse est réalisée à l'aide de trois protéases gastro-intestinales : pepsine, trypsine et chymotrypsine. Après mise en évidence de l'activité antimicrobienne dans les hydrolysats préparés, les peptides actifs sont séparés et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) pour être identifiés par spectrométrie de masse. Ils sont caractérisés par détermination de la concentration minimale inhibitrice et de leur mode d'action sur des souches pathogènes. En outre, le comportement à l'hydrolyse des protéines étudiées par les trois protéases employées est étudié par analyse chromatographique (RP-HPLC), électrophorétique (SDS-PAGE) et par mesure de degré d'hydrolyse selon la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA).

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## I. Les peptides antimicrobiens

### I.1.Généralités

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont des peptides présents chez tous les êtres vivants, intervenant dans la défense de l'hôte face aux agressions des micro-organismes dangereux. Les PAM sont capables de tuer une remarquable gamme de cellules et microbes y compris des bactéries, des champignons, des protozoaires, des cellules malignes, des virus enveloppés et des parasites (Dennison et coll., 2005 ; Wiesner et Vilcinskas, 2010).

Selon la littérature traitant ce sujet, la recherche de peptides antimicrobiens a débuté dans les années 1970 par la découverte de la « bombinine », isolé à partir des sécrétions épidermiques de la grenouille (Csordas et Michl, 1970) et de la « melittine » dans le venin d'abeille (Habermann, 1972). Cependant, certains auteurs considèrent que les peptides antimicrobiens ont été découverts au même moment que les antibiotiques (Pellegrini, 2003), en évoquant la découverte, au début des années 1920, par Flemming, du lysozyme, dans le mucus nasal et le blanc d'œuf (Flemming, 1922). C'est, en effet, en 1928 que Flemming découvre la pénicilline en observant l'envahissement des boîtes de Pétri, où il cultivait des Staphylocoques, par des colonies blanches cotonneuses, qui se révèlent être un champignon du genre *Penicillium*. Il conclut que ce champignon inhibe la croissance de ces bactéries. Il publie ses recherches en 1929, en appelant le composant sécrété par le champignon la pénicilline. Les recherches sur la pénicilline s'intensifient au cours de la seconde guerre mondiale, permettant d'aboutir à sa synthèse pour soigner les infections des soldats blessés (Rob, 1990).

Bien que les années 50, ont connu la mise en évidence dans les cellules sanguines d'une activité antimicrobienne à large spectre (Skarnes et Watson, 1957), cependant le champ d'étude de ces molécules se développe, surtout, dans les années soixante dix par la découverte de peptides à activité antimicrobienne chez les amphibiens, les insectes et les plantes (Csordas et Michl, 1970 ; Habermann, 1970 ; Fernandez et Caleya, 1972). Les années 1980 ont été marquées par la découverte des Cécropines, peptides antibactériens non hémolytiques (Hultmark et coll., 1980), des défensines, purifiés à partir des macrophages des poumons de lapins (Lehrer et Selsted, 1988) et les premières Magainines (Zasloff, 1987). Depuis, de nombreux peptides antimicrobiens issus de différentes espèces ont été découverts.

Selon la voie de synthèse, les PAM peuvent être classés en deux catégories ; ceux issus d'une synthèse non ribosomale, et ceux dit « naturels » issus d'une synthèse ribosomale (Hancock et Chapple, 1999).

Les peptides de la première catégorie, sont synthétisés au sein des complexes multienzymatiques formés de diverses synthétases, qui donnent naissance à des peptides de diverse structure. Ces systèmes sont présents, généralement, chez les bactéries et les champignons.

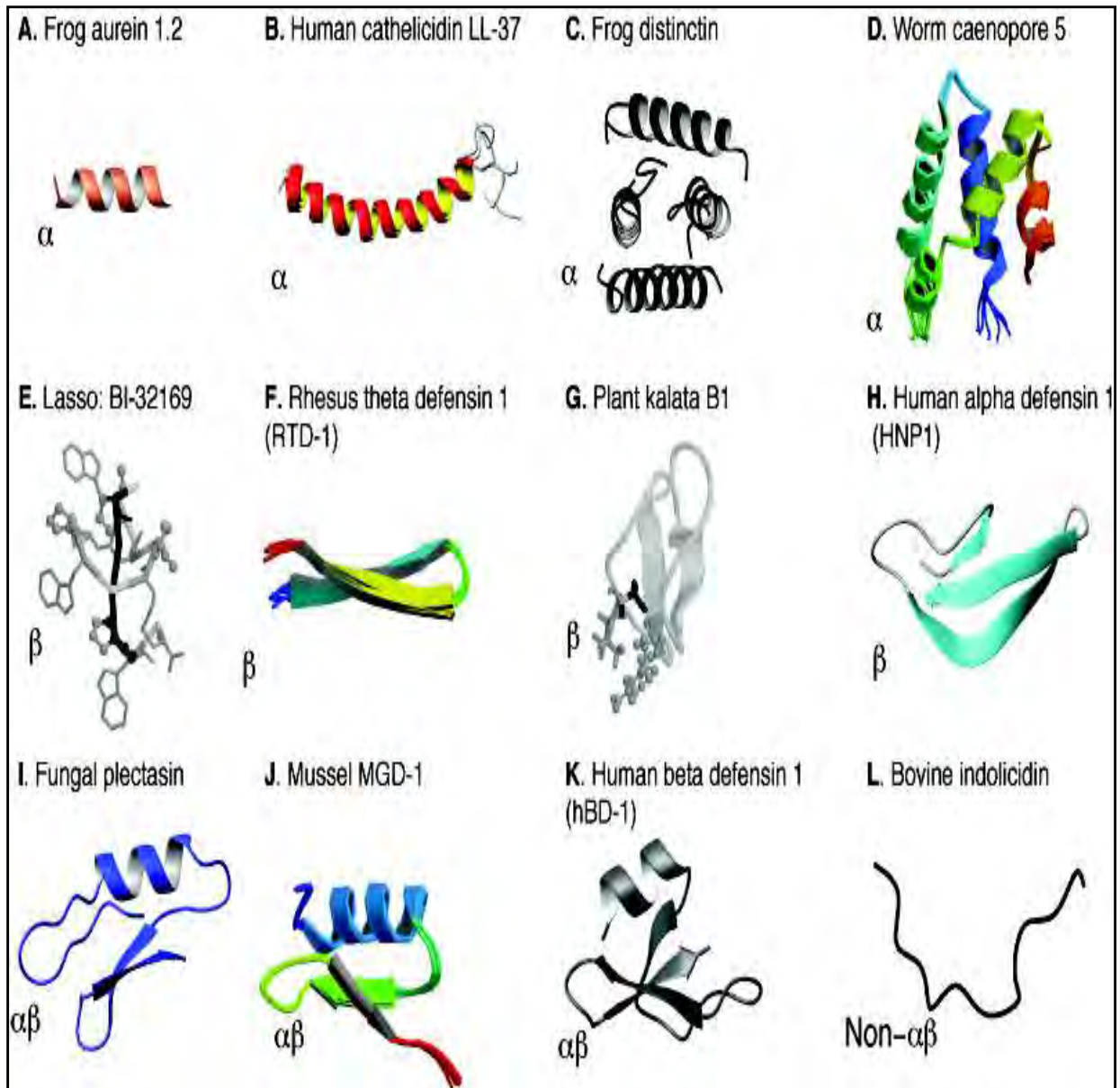
Les PAM obtenus par synthèse ribosomale sont issus de différents organismes (mammifères, plantes, insectes, amphibiens et bactéries). Chez les organismes multicellulaires, ces peptides assurent la première ligne de défense de l'organisme, contre les agents pathogènes, où ils font partie intégrante du système immunitaire inné (Bulet et coll., 2004 ; Schröder et Harder, 2006 ; Wiesner et Vilcinskas, 2010). Ces peptides sont synthétisés soit, par voie métabolique : les peptides sont synthétisés, stockés et libérés lors d'une agression de l'organisme par un pathogène (Marshall et Arenas, 2003 ; Brogden et coll., 2003). Soit par l'utilisation de certaines protéines présentes dans l'organisme. Ces protéines inactives à l'état natif, génèrent des peptides antimicrobiens après hydrolyse par des enzymes protéolytiques (Cowland et coll., 1995 ; Zanetti et coll., 1995 ; Lai et Gallo, 2009).

### **I.2. Structure des peptides antimicrobiens**

La majeure partie des peptides antimicrobiens (>86%) présente une structure en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$  (Tableau 1), possède moins de 50 acides aminés avec des propriétés amphiphiles, un caractère cationique (une charge nette comprise entre 0 et +7) et un taux de résidus hydrophobe de 31 à 70% (Wang, 2013). Parmi les peptides cationiques, les cécropines (4 kDa) et les magainines (2 kDa) sont les plus représentatifs de ceux qui adoptent la structure en hélice  $\alpha$  (Jenssen et coll., 2006).

Certains peptides présentent des structures mixtes en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  stabilisées par des ponts disulfures (Figure 1). La perte de ces ponts disulfures que minime soit-elle entraînerait une perte partielle ou totale de l'activité antimicrobienne (Pellegrini et coll., 1999 ; Fazio et coll., 2006).

D'autres sont des peptides riches en certains AA, tels que : l'histidine dans les histatines trouvées dans la salive humaine, le tryptophane dans les indolicidines de bovin et les triterplicines, la proline et glycine dans de nombreux peptides d'insectes et la proline et phénylalanine dans les prophénines (Andres et Dimarcq, 2007).



**Figure 1.** Structures protéiques typiques des peptides antimicrobiens (Wang, 2013).

Ces caractéristiques concernent la famille de peptides cationiques. En effet, il existe, également, les peptides non-cationiques tels que les peptides anioniques et les peptides dérivés des protéines liées à l'oxygène (Marshall et Arenas, 2003 ; Brogden et coll., 2003).

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

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

### I.3. Mécanisme d'action des peptides antimicrobiens

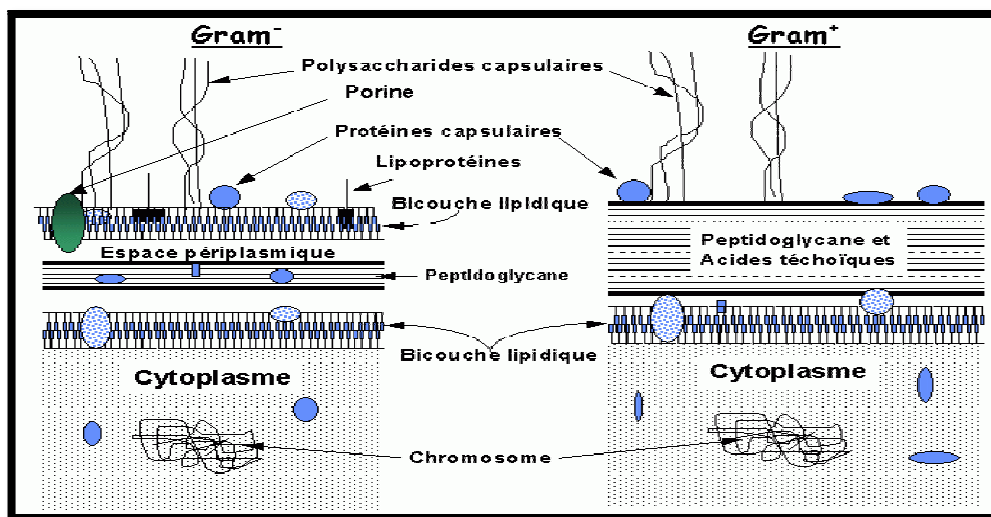
Les caractéristiques des peptides antimicrobiens déterminant leur action sont la conformation, la charge et l'amphiphilie. Leur mécanisme d'action diffère selon le type de la bactérie cible (Gram positif ou Gram négatif). En effet, leur spécificité d'action repose principalement sur les différences de composition et de propriétés physico-chimiques qui distinguent les membranes microbiennes de celles des cellules de l'hôte. Car, présents dans la plupart des tissus, les PAM sont capables de faire la distinction entre la cellule hôte et les agents pathogènes : il y a reconnaissance du soi et du non-soi (Powers et coll., 2003).

Pour expliquer le mécanisme d'action des peptides antimicrobiens deux hypothèses ont été émises : une privilégiant une action provoquant une déstabilisation de la membrane et pour laquelle 3 modèles ont été proposés : (modèles de perméabilisation membranaire). Une seconde indiquant une action intracellulaire par la présence de cible intracellulaire ou intracytoplasmiques comme l'ADN et l'ARN et des protéines, entraînant l'inhibition de différentes voies de synthèses (Powers et coll., 2003 ; Jenssen et coll., 2006).

Toutefois, quelque soit le mécanisme d'action proposé, une étape de fixation à la surface de la bactérie est nécessaire. Cela se produit en deux étapes. Une étape de structuration des peptides au contact de la membrane lipidique, par changements de conformation de linéaire à hélicoïdale. Une étape observée uniquement pour les peptides linéaires non structurés en solution (Tasseau, 2005). Alors que, les peptides à feuillet  $\beta$  avec, en plus des ponts disulfures, prennent des conformations beaucoup plus stables, Cependant, possédant des

surfaces hydrophobes et hydrophiles bien distinctes cela leur permet une interaction plus importante avec la paroi bactérienne.

En deuxième étape, les peptides antimicrobiens interagissent grâce à leurs charges positives avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes (Epanand et Vogel, 1999 ; Vorland et coll., 1999; Vogel et coll., 2002). Ils interagissent avec le phospholipide (LPS) des bactéries à Gram négatif ou le peptidoglycane des bactéries à Gram positif (Figure 2). Le peptidoglycane, constitué d'acide teichoïque et d'acide teichuronique, et les acides lipoteichoïques, permettent l'apport de charges négatives sur la membrane nécessaires pour interagir avec les peptides antimicrobiens (Bradshaw et coll., 2003; Wakayabashi et coll., 2003).

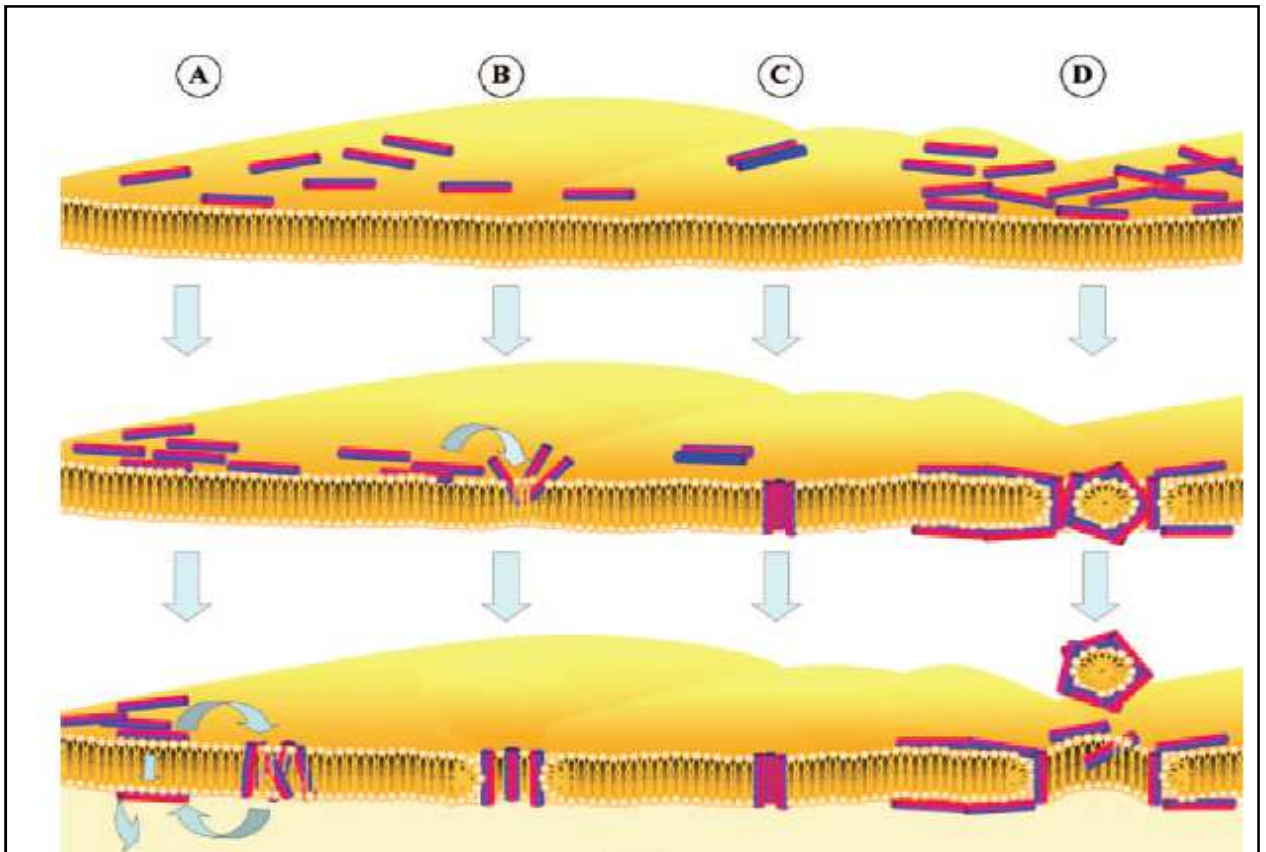


**Figure 2.** Structure de la paroi bactérienne (Corvec, 2009).

L'importante proportion de lipides chargés négativement à la surface de la paroi des bactéries permet aux peptides de s'orienter vers les bactéries et non les cellules de l'hôte. En effet, les phospholipides formant la membrane des cellules eucaryotes sont composés de phosphatidylcholine et de sphingomyéline ainsi que de stérols ayant une charge globale neutre. Cette richesse en phospholipides neutres et la présence de cholestérol comme élément stabilisateur entraînent peu d'interactions vis-à-vis des peptides cationiques antibactériens. Les doubles membranes riches en phospholipides zwitterioniques (phosphatidyléthanolamine, phosphatidylcholine), présents dans les membranes cytoplasmiques des mammifères, ont généralement une charge neutre (Yeaman et coll., 2003).

### I.3.1. Modèles décrivant le mécanisme déstabilisant la membrane cytoplasmique

La déstabilisation peut se faire selon quatre modèles appelés : « Barrel Stave », « torroïdal pore », « carpet-like » et « agregate » (Figure 3) (Dennison et coll., 2005 ; Jenssen et coll., 2006 ; Bechinger, 2009).



**Figure 3.** Modèles décrivant la déstabilisation de la membrane cytoplasmique par les peptides antimicrobiens (Jenssen et coll., 2006). La bicouche lipidique est représentée en jaune, les peptides sont représentés comme des cylindres avec une face hydrophobe colorée en rouge et une face hydrophile en bleu. (de A à D : modèle *agregat* « *agregate* », *en tapis* « *carpet-like* », *pores toroïdaux* « *torroïdal pore* » et *en douve de tonneau* « *Barrel-stave* » respectivement).

#### I.3.1. 1. Modèle des pores en douve de tonneau «Barrel-stave model »

Dans ce modèle, les peptides changent de conformation puis insèrent leurs domaines hydrophobes dans la membrane en repoussant les têtes hydrophiles des phospholipides. Lorsqu'un certain seuil est atteint, les peptides s'internalisent et se regroupent dans la membrane en créant des pores, dont la face externe est représentée par les domaines hydrophobes des peptides monomériques, et la face interne par leurs domaines hydrophiles.



Ainsi, ces pores sont constitués de plusieurs monomères peptidiques orientés comme les planches d'un tonneau (barrel stave) (Dennison et coll., 2005). L'introduction progressive de peptides au niveau de la membrane permet d'agrandir la taille des pores. La translocation des phospholipides et l'agrandissement des pores entraînent le transport des peptides à l'intérieur de la membrane cytoplasmique par le biais du gradient de concentration induit par les peptides liés à la surface. Tout ceci conduit à la fuite du contenu cytoplasmique par le pore ainsi formé et à la mort de la bactérie.

### **I.3.1.2. Modèle des pores toroïdaux « torroidal pore ou Wormhole model »**

Leurs pôles hydrophobes solidement fixés parallèlement à la paroi, les peptides s'insèrent dans la monocouche extérieure entre les phospholipides, induisant une distorsion de la membrane. La courbure de cette dernière permet au pore d'être bordé à la fois par la face polaire des peptides et les têtes polaires des lipides membranaires. Dans ce modèle, les peptides vont rester fixés à la tête polaire de la monocouche lipidique, même une fois qu'ils sont insérés perpendiculairement dans la bicouche (Yang et coll., 2001).

### **I.3.1.3. Modèle en tapis « carpet-like »**

Le modèle « tapis » correspond à un mécanisme sans insertion des peptides et sans formation de pores dans la membrane. Les peptides s'alignent et s'accumulent à la surface de cette dernière. La charge négative des lipides membranaires permet de réduire les forces électrostatiques de répulsion entre les peptides chargés positivement contribuant ainsi à la formation d'une couverture de la membrane par un tapis dense de peptides. Une fois la concentration seuil atteinte, les peptides s'organisent et provoquent l'effondrement de la membrane, créant ainsi un effet détergent. La désintégration de la bicouche provoque une dissipation du gradient électrochimique transmembranaire, perte de constituants cytoplasmiques, l'interférence avec le métabolisme énergétique des cellules vivantes et finalement la mort cellulaire (Bechinger, 2009).

### **I.3.1.4. Modèle par agrégat « agregate model »**

Selon ce modèle, des agrégats de peptides forment des micelles dans la membrane. A l'inverse du modèle des pores toroïdaux, les peptides n'adoptent aucune orientation particulière. Le peptide traverse la membrane lorsque l'agrégat se disperse.

## II. Obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse enzymatique de protéines

### II.1. Généralités

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

En effet, par hydrolyse enzymatique, *in vitro*, il était possible de libérer, à partir de protéines antimicrobiennes, des peptides plus actifs que les protéines initiales. Ou bien à partir de protéines dépourvues d'activité antimicrobienne à l'état natif (Kitts et Weiler, 2003 ; Pellegrini, 2003).

Le lysozyme, la lactoferrine et ovotransferrine sont des exemples de ces protéines antimicrobiennes. En 1998, Ibrahim et coll., ont isolé par hydrolyse acide ménagée de l'ovotransferrine de poule un peptide (109-200) actif contre de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli K 12.1*. Le lysozyme de blanc d'œuf de poule, libère, après action de la clostripaine, un peptide (98-112) ayant des propriétés antibactériennes vis-à-vis des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif (Ibrahim et coll., 2001).

L'activité antimicrobienne de la lactoferrine, a fait l'objet de nombreuses études (Masson et Heremans 1968 ; Bellamy et coll., 1992 ; Wakabayashi et coll., 2006 ; Sinha et coll., 2013). C'est une protéine mineure du lait, mais présente également dans la plupart des sécrétions des mammifères (larmes, salive, sécrétions nasales, plasma séminal ). L'hydrolyse enzymatique de cette protéine a permis, également, de libérer plusieurs peptides correspondants aux domaines actifs dans sa séquence. La lactoferricine correspondant au fragment f(17-41) est le premier peptide antimicrobien libéré par hydrolyse pepsique de la lactoferrine (Bellamy et coll., 1992). Les peptides correspondant aux fragments f(277-288), f(267-285), f(267-288), f(268-284) de cette protéine ont montré, également, une activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa* (Recio et Visser, 1999 ; Van der Kraan et coll., 2005 ; Vogel, 2012).

Plusieurs peptides antimicrobiens ont été obtenus par hydrolyse enzymatique d'hémoglobine bovine. Le premier peptide obtenu par hydrolyse pepsique de cette protéine était le fragment  $\alpha$  1-23, actif vis-à-vis de *Micrococcus luteus* (Froidevaux et coll, 2001). Par la suite, au sein du même laboratoire une trentaine de peptides actifs ont été purifiées et caractérisées. Ces peptides dérivent principalement des fragments  $\alpha$ 1-32,  $\alpha$ 107-141,  $\alpha$  107–136,  $\alpha$  107–141,  $\alpha$  107–133,  $\alpha$  37–141 et  $\beta$  126–145. Ces peptides montrent une activité contre *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* et *Micrococcus luteus* (Nedjar-Arroume et coll., 2006 et 2008).

Le poisson présente, également, une source intéressante de peptides à activité antimicrobienne. Tel que le misgurin, issu de silure (*Misgurnus anguillicaudatus*), un peptide fortement basique (contient 5 Arginines et 4 résidus Lysine) avec un large spectre d'activité et une faible activité hémolytique. Histone H1, séparé du tissu hépatique de saumon atlantique ainsi que les polypeptides antibactériens isolé à partir d'extraits d'acide acétique de peau de la barbue de rivière (*Ictalurus punctatus*) ou bien le parasin I, issu du poisson-chat (*Parasilurus asotus*) (Kitts et Weiler, 2003). En outre, l'hydrolyse enzymatique de protéines de poissons constitue une des méthodes prometteuses d'obtention de peptides antimicrobiens (Song et coll., 2011 ; Sila et coll., 2013).

Toutefois, se sont les protéines du lait qui ont suscités plus d'intérêt. En effet, les propriétés biodéfensives de ces dernières ont été bien décrites et largement reconnues depuis plusieurs décennies. Le colostrum et le lait fournis de nombreux facteurs antimicrobiens. Les immunoglobulines sont parmi les premières lignes de protection qui sont dispensés au nouveau-né grâce à l'allaitement et permettent de fournir passivement l'immunité acquise. Les propriétés antimicrobiennes de la lactoferrine, le lysozyme et la lactoperoxydase sont actuellement bien étudiées (El-Agamy et coll., 1992 ; Clare et coll., 2003 ; Lopez- Exposito et Recio, 2006).

En outre, plusieurs peptides antimicrobiens ont été libérés par hydrolyse enzymatique de protéines du lait, inactives à l'état natives. C'est le cas des protéines de lactosérum, l'  $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline qui génèrent, par hydrolyse enzymatique, plusieurs peptides antimicrobiens. La digestion trypsique de  $\alpha$ -lactalbumine a libéré deux fragments : LDT1 ( $\alpha$  1-5) et LDT2 ( $\alpha$  17-31/ 109-114). Alors que la digestion chymotrypsique à libéré le peptide LDC ( $\alpha$  61-86 /75-80) (Pellegrini et coll., 1999). Ces peptides sont principalement

actifs sur des bactéries à Gram positif. La digestion trypsique de la  $\beta$ -lactoglobuline a donné, quatre peptides (15-20, 25-40, 78-80, 92-100) ayant une activité antimicrobienne sur des bactéries à Gram positif (Pellegrini et coll., 2001). L'hydrolyse pepsique libère les fragments (14-18), (123-125), (50-54), (143-146), (134-136) (147-149) de la  $\beta$ -lactoglobuline et le fragment (117-121) de l' $\alpha$ -lactalbumine (Theolier et coll., 2013).

Par ailleurs, les caséines, protéines majeures du lait, libèrent, par hydrolyse enzymatique différents peptides antimicrobiens avec un large spectre d'action (actifs aussi bien sur les bactéries à Gram positif que celles à Gram négatif) (Zucht et coll., 1995 ; Recio et Visser, 1999 ; Malkoski et coll., 2001 ; Mc Cann et coll., 2006).

Dans la présente étude, l'obtention de peptides antimicrobiens a été recherchée par hydrolyse aux protéases gastriques des caséines bovines et camelines.

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

### **II.2.1. Les caséines**

Les caséines sont des protéines spécifiques du lait synthétisées dans la glande mamelle. Ce sont des complexes protéiques phosphorés à caractère acide. Elles se présentent dans le lait sous forme de micelles de protéines (caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ), de citrate, de phosphate, de calcium, de magnésium, de potassium et de sodium. Les micelles de caséines sont des particules colloïdales pouvant renfermer jusqu'à 11 000 molécules de caséine. Elles ont une masse moléculaire comprise entre  $10^7$  et  $10^9$  Da et elles sont de dimensions variables selon l'état physiologique, le degré de maturation du lait et l'espèce animale (entre 100 et 500 nm, avec un diamètre moyen près de 180 nm pour le lait de vache contre 260 à 300 nm pour le lait de chamelle) (Farah et Rüegg, 1989 ; Attia et coll., 2000). La forme est considérée comme sphérique mais avec une surface granuleuse la faisant ressembler à une framboise (Schmidt, 1982 ; Walstra, 1999).

#### **II.2.1.1. Caséines bovines**

Elles représentent la majeure partie des protéines du lait bovin (environ 82 % des protéines totales). Les fractions de la caséine bovine ont un certain nombre de caractères

communs, tels que la présence de phosphore sous la forme de groupements phosphoséryls et la forte proportion de résidus apolaires. Elles se distinguent les unes des autres par le nombre de groupements phosphoséryls, la présence ou non de cystéine, la présence ou non de glucides et leur caractère plus ou moins hydrophobe (Tableau 2). La présence des groupements phosphoséryls confère aux caséines une très grande affinité vis-à-vis du calcium, du magnésium et des oligoéléments. Dans le cas des caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ , et  $\beta$ , qui sont hautement phosphorylées, les sites phosphorylés sont en majeure partie groupés, ce qui a pour conséquence de créer dans la chaîne peptidique des zones à caractère acide et hydrophile très marqué. Les différentes formes d'un type de caséine se distinguent par leur composition, en particulier, le nombre de groupements phosphate.

#### II.2.1.1.1. Caséine $\alpha_{s1}$

La caséine  $\alpha_{s1}$  est la protéine la plus abondante du lait bovin, 10g/l pour 26g/l des caséines et 33g/l de protéine au total dans le lait bovin. Cette fraction compte 199 résidus d'acides aminés avec un PM de 23615 Da (Mercier et coll., 1971 ; Grosclaude et coll., 1973 cité par Farrel et coll., 2004).

La localisation des charges et des chaînes latérales hydrophobes est très irrégulière, ce qui confère à la molécule un comportement dipolaire avec un pôle plutôt hydrophobe et un pôle chargé. Trois tronçons hydrophobes sont décelés, compris entre les résidus 1-44, 30-113 et 132-199 et une partie très phosphorylée (résidus 41-80) qui représente presque la totalité de la charge négative (-20,6) à pH 6.6 (Figure 4).

#### II.2.1.1.2. Caséine $\alpha_{s2}$

Le lait de vache contient en moyenne 2.6 g/l de caséine  $\alpha_{s2}$ . La protéine de référence pour cette fraction est  $\alpha_{s2}$ -CN (A-11P), composée de 207 résidus (Figure 5) et possède une masse moléculaire de 25226 Da (Brignon et coll., 1977).

La caséine  $\alpha_{s2}$  a l'hydrophobie moyenne calculée la plus faible. Cela est dû aux nombreux groupements phosphorylés (10 à 13 résidus phosphoryl/mole) et leur répartition sur trois régions distinctes (entre les résidus d'acides aminés 8-16, 56-61 et 129-133) en présence, également, de résidus glutamyls. Les parties hydrophobes se limitent aux portions 90-120 et 160-207.

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

**Tableau 2.** Caractéristiques physico-chimiques des caséines bovines (Eigel et coll., 1984, Farrell et coll., 2004).

	<b>Caséine <math>\alpha_{s1}</math></b>	<b>Caséine <math>\alpha_{s2}</math></b>	<b>Caséine <math>\beta</math></b>	<b>Caséine <math>\kappa</math></b>
<b>Poids Moléculaire (Da)</b>	23617,2 $\pm$ 1,3	25230,0 $\pm$ 2.1	23984,8 $\pm$ 0,7	19007,0 $\pm$ 1,1
<b>Proportion dans les caséines totales</b>	36	10	34	13
<b>Formes présentes</b>	$\alpha_{s0}, \alpha_{s1}$	$\alpha_{s2}, \alpha_{s3}, \alpha_{s4}, \alpha_{s6}$	/	K <sub>1</sub> , K <sub>2</sub> , K <sub>3</sub> , K <sub>4</sub> , K <sub>5</sub> , K <sub>6</sub> , K <sub>7</sub>
<b>Variants génétiques</b>	A*, B, C, D, E, F, G, H.	A* et D	A <sup>1*</sup> , A <sup>2*</sup> , A <sup>3</sup> , B, C, D, E, F, G, H.	A*, B*, B <sup>2</sup> , C, E
<b>Point isoélectrique</b>	4,26	4,78	4,49	3,97
<b>Nombre d'acides aminés</b>	199	207	209	169
<b>Résidus cystéine</b>	0	2	0	2
<b>Nombre de Groupements phosphoséryles / mole</b>	8-9	10-13	5	1-2
<b>Charge à pH 6,6</b>	-20,9	-14,8	-12,3	-3,0
<b>Présence de glucides</b>	-	-	-	+
<b>Hydrophobicité (kJ mol<sup>-1</sup> / résidu)</b>	4,9	4,64	5,59	5,12

\* variants génétiques les plus répandus.

1	10	20
H-Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Val-Leu-Asn-Glu-Asn-Leu-		
21	30	40
Leu-Arg-Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys-Glu-Lys-Val-Asn-Glu-Leu-		
41	50	60
<i>SeP</i> -Lys-Asp-Ile-Gly- <i>SeP</i> -Glu- <i>SeP</i> -Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-		
61	70	80
Glu-Ala-Glu- <i>SeP</i> -Ile- <i>SeP</i> - <i>SeP</i> - <i>SeP</i> -Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- <i>SeP</i> -Val-Glu-Gln-Lys-His-		
81	90	100
Ile-Gln-Lys-Glu-Asp-Val-Pro-Ser-Glu-Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu-Gln-Leu-Leu-Arg-		
101	110	120
Leu-Lys-Lys-Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn- <i>SeP</i> -Ala-Glu-Glu-Arg-Leu-		
121	130	140
His-Ser-Met-Lys-Glu-Gly-Ile-His-Ala-Gln-Gln-Lys-Glu-Pro-Met-Ile-Gly-Val-Asn-Gln-		
141	150	160
Glu-Leu-Ala-Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu-Phe-Arg-Gln-Phe-Tyr-Gln-Leu-Asp-Ala-Tyr-Pro-		
161	170	180
Ser-Gly-Ala-Trp-Tyr-Tyr-Val-Pro-Leu-Gly-Thr-Gln-Tyr-Thr-Asp-Ala-Pro-Ser-Phe-Ser-		
181	190	199
Asp-Ile-Pro-Asn-Pro-Ile-Gly-Ser-Glu-Asn-Ser-Glu-Lys-Thr-Thr-Met-Pro-Leu-Trp-OH		

**Figure 4.** Structure primaire de la caséine  $\alpha_{S1}$  (B-8P) bovine (Mercier et coll., 1971, Grosclaude et coll., 1973 cité par Farrel et coll., 2004).

1	10	20
H-Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val- <i>SeP</i> - <i>SeP</i> - <i>SeP</i> -Glu-Glu-Ser-Ile-Ile- <i>SeP</i> -Gln-Glu-Thr-Tyr-		
21	30	40
Lys-Gln-Glu-Lys-Asn-Met-Ala-Ile-Asn-Pro-Ser-Lys-Glu-Asn-Leu-Cys-Ser-Thr-Phe-Cys-		
41	50	60
Lys-Glu-Val-Val-Arg-Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly- <i>SeP</i> - <i>SeP</i> - <i>SeP</i> -Glu-Glu-		
61	70	80
<i>SeP</i> -Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys-Ile-Thr-Val-Asp-Asp-Lys-His-Tyr-Gln-Lys-		
81	90	100
Ala-Leu-Asn-Glu-Ile-Asn-Gln-Phe-Tyr-Gln-Lys-Phe-Pro-Gln-Tyr-Leu-Gln-Tyr-Leu-Tyr-		
101	110	120
Gln-Gly-Pro-Ile-Val-Leu-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Val-Lys-Arg-Asn-Ala-Val-Pro-Ile-Thr-		
121	130	140
Pro-Thr-Leu-Asn-Arg-Glu-Gln-Leu- <i>SeP</i> -Thr- <i>SeP</i> -Glu-Glu-Asn-Ser-Lys-Lys-Thr-Val-Asp-		
141	150	160
Met-Glu- <i>SeP</i> -Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys-Lys-Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Glu-Lys-Asn-Arg-		
161	170	180
Leu-Asn-Phe-Leu-Lys-Lys-Ile-Ser-Gln-Arg-Tyr-Gln-Lys-Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-		
181	190	200
Lys-Thr-Val-Tyr-Gln-His-Gln-Lys-Ala-Met-Lys-Pro-Trp-Ile-Gln-Pro-Lys-Thr-Lys-Val-		
201	207	
Ile-Pro-Tyr-Val-Arg-Tyr-Leu-OH		

**Figure 5.** Structure primaire complète de la caséine  $\alpha_{S2}$  (A-11P) bovine (Brignon et coll., 1977).

#### II.2.1.1.3. Caséine $\beta$

La caséine  $\beta$  est présente en très forte proportion, 9,3 g/l en moyenne dans le lait de vache sur les 26g/l de caséine total soit 35%. La protéine de référence pour cette fraction est  $\beta$ -CN ( $A^2$ -5 P), composée de 209 résidus d'acides aminés et de masse moléculaire calculée de 23983 Da (figure 6) (Ribadeau-Dumas et coll., 1972 ).

L'action de la plasmine sur cette fraction génère les fragments  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$  – CN constitués des résidus (29-209), (106-209) et (108-209), respectivement. Ainsi que les polypeptides, précédemment només proteose peptone, correspondant aux fragments (1-105/107),(1-28) et (29-105) (farell et coll., 2004).

La caséine  $\beta$  est la plus hydrophobe de toutes les caséines bien qu'elle ait un caractère amphipolaire assez marqué. En effet, les charges négatives de la caséine  $\beta$ -CN ( $A^2$ -5P) sont essentiellement présentes dans la partie N-terminale, contenant les résidus phosphoséryl (résidus 1-40) (-11,5 pour les premier 21 acides aminés à pH 6,6) ce qui rend cette partie fortement hydrophile. Alors que la partie C-terminale (résidus 136-209) est très riche en groupements apolaires (les 21 acides aminés C-terminal ne présentent pas une charge nette). Cette répartition serait à l'origine de la libération de cette fraction de la micelle de caséine à basse température (Aoki et coll., 1990).

#### II.2.1.1.4. Caséine $\kappa$

Elle représente environ 12% des caséines de lait de vache, sa masse moléculaire est de 19000 Da et sa structure primaire compte 169 résidus d'acides aminés (figure 7) (Mercier et coll., 1973). La Caséine  $\kappa$  est la plus hydrophobe des caséines après la caséine  $\beta$ . Toute fois, elle est caractérisée par la présence d'une portion glycomacropeptide, du côté C-terminal contenant des résidus glucidiques à caractère très hydrophile, par contre, le reste de la chaîne protéique est de nature très hydrophobe. Cela confère à cette protéine un caractère amphipolaire (Hill et wake, 1969). L'hydrolyse de la liaison 105-106 entre le résidu phénylanyle et le résidu méthionyle par la chymosine entraîne la libération du caséino-macropeptide très hydrophile et la formation de la paracaséine  $\kappa$ , hydrophobe et insoluble (Delfour et coll., 1965 ; Jolles et coll., 1968).



1	10	20
H-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SeP-Leu-SeP-SeP-SeP-Glu-		
21	30	40
Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-SeP-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-		
41	50	60
Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-		
61	70	80
Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-		
81	90	100
Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-		
101	110	120
Ala-Met-Ala-Pro-Lys-His-Lys-Glu-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Glu-Pro-Phe-Thr-		
121	130	140
Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-		
141	150	160
Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-		
161	170	180
Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-		
181	190	200
Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Glu-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-		
201	209	
Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-OH		

**Figure 6.** Structure primaire de la caséine  $\beta$  (A<sup>2</sup>-5P) d'après Ribadeau-Dumas et coll., 1972 corrigée par Carles et coll., 1988. . ↓ : indiquent les sites d'action de la plasmine.

1	10	20
PyroGlu-Glu-Gln-Asn-Gln-Glu-Gln- Pro - Ile -Arg-Cys-Glu -Lys-Asp-Glu- Arg -Phe-Phe-Ser-Asp-		
	30	40
Lys- Ile -Ala-Lys-Tyr- Ile -Pro- Ile -Gln-Tyr-Val-Leu-Ser-Arg-Tyr- Pro -Ser-Tyr-Gly-Leu-		
	50	60
Asn-Tyr-Tyr-Gln-Gln-Lys-Pro- Val -Ala-Leu- Ile -Asn-Asn-Gln-Phe- Leu -Pro-Tyr-Pro-Tyr-		
	70	80
Tyr-Ala-Lys-Pro-Ala-Ala-Val- Arg -Ser-Pro-Ala-Gln- Ile -Leu-Gln- Trp -Gln-Val-Leu-Ser-		
	90	100
Asp-Thr-Val-Pro-Ala-Lys-Ser- Cys -Gln-Ala-Gln-Pro-Thr-Thr-Met- Ala -Arg-His-Pro-His-		
	110	120
Pro-His-Leu-Ser-Phe-Met-Ala- Ile -Pro-Pro-Lys-Lys-Asn-Gln-Asp- Lys -Thr-Glu- Ile -Pro-		
	130	140
Thr- Ile -Asn-Thr- Ile -Ala-Ser- Gly -Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr- <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Ile</span> -Glu-Ala-Val-Glu-	136	
		(variant A)
	148	150
Ser -Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu- <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Ala</span> -Ser-Pro-Glu-Val- Ile -Glu-Ser- Pro -Pro-Glu- Ile -Asn-		
		(variant A)
	169	
Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val.OH		

**Figure 7.** Structure primaire de la Caséine  $\kappa$  bovine d'après Mercier et coll., 1973 ↓ : indique la liaison peptidique hydrolysée par la chymosine.

Cette fraction est présente sous sept formes qui diffèrent par leur teneur en glucides constitués de N-acétyl galactosamine, du galactose et d'acide N-acétyl neuramique (Alais et Jolles, 1961). Ces trois sucres, associés en tri ou tétra saccharides, sont fixés sur les résidus thréonyl en position 131, 133, 135, (ou 136) (Fiat et coll., 1972 ; Jolles et coll., 1973 ; Kanamori et coll., 1980). Elles sont classées de la moins glycosylée ( $\kappa_1$ ) à la plus glycolysée ( $\kappa_7$ ),  $\kappa_1$  ne contenant pas de glucides.

### II.2.1.2. Caséines camelines

Les caséines sont présentes dans le lait camelin à un taux de 73 à 81% des protéines totales (Farah et Rüegg, 1989 ; Mehaia et coll., 1995). Les premières études réalisées sur les caséines camelines se sont limitées à l'analyse électrophorétique des protéines obtenues par précipitation acide et séparation par chromatographie. Ces études ont révélé la présence de trois bandes qui ont été attribuées aux caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  et  $\beta$  (Farah et Farah-Riesen, 1985) (Tableau 3).

La détermination de la composition en acides aminés et de la séquence N-terminale a permis, par la suite, de caractériser les différentes fractions ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  et  $\beta$  et  $\kappa$ ), (Larsson-Raznikiewicz et Mohamed, 1986 ; Ochirkhuyag et coll., 1997). Toutefois, la séquence complète des différentes fractions a été donnée par Kappeler et coll., (1998).

La caséine  $\alpha_{S1}$  et la caséine  $\beta$  se présentent sous deux formes de variants génétiques (A et B). Les caséines camelines semblent être moins phosphorylées par rapport à leurs homologues bovins. Comparé au lait bovin, une variabilité dans les taux des différentes fractions caséiniques est notée. Notamment pour la caséine  $\beta$  qui est la plus abondante dans le lait de chamelle (65% des caséines). La caséine  $\kappa$  est, par contre, présente en très faible quantité, 3,5 % contre 13% pour le lait de vache.

La caséine  $\alpha_{S1}$  cameline exprime un taux de similitude à son homologue bovin de 39%, alors qu'il est de 56% pour la caséine  $\alpha_{S2}$  et la caséine  $\kappa$  et 64% pour la caséine  $\beta$  (Tableau 3) (Ochirkhuyag et coll., 1997 et Kappeler et coll., 1998).

**Tableau 3.** Caractéristiques physico-chimiques des caséines camelines (Ochirkhuyag et coll., 1997 et Kappeler et coll., 1998).

	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\alpha_{s2}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$
<b>Poids Moléculaire (Da)</b>	24275-35500	21266-26300	24651-27500	18254-22987
<b>Proportion dans les caséines totales</b>	22-38	9,5-21	28-65	3,5-5
<b>Variant génétique</b>	A et B			
<b>Point isoélectrique</b>	4,41	4,58	4,76	4,11
<b>Nombre d'acides aminés</b>	207	178	217	162
<b>Résidus cystéine</b>	0	2	0	2
<b>Nombre de groupements phosphoséryles / mole</b>	6	9	4	1
<b>Présence de glucides</b>	-	-	-	+
<b>Similitude de structure (%)</b>	39	56	64	56

#### II.2.1.2.1. Caséine $\alpha_{s1}$

La caséine  $\alpha_{s1}$  caméline représente 22 à 38 % des caséines totales, possède 207 résidus d'acides aminés pour le variant génétique A et 215 pour le variant génétique B (Figure 8). Son poids moléculaire varie entre 24275 et 35500 Da (Farah et Farah-Riesen, 1985 ; Larsson-Raznikiewicz et Mohamed, 1986 ; Ochirkhuyag et coll., 1997 ; Kappeler et coll., 1998). Elle a un pHi acide égale à 4,41, ceci est dû à la prédominance des groupes acides (38 acides aminés acides) aux groupes basiques (30 acides aminés basiques) (Ochirkhuyag et coll., 1997).

#### II.2.1.2.2. Caséine $\alpha_{s2}$

La caséine  $\alpha_{s2}$  caméline représente 9,5 à 21 % des caséines totales. Son poids moléculaires varie de 21266 à 26300 Da et son pHi est égale à 4,58 (Larsson-Raznikiewicz et Mohamed, 1986 ; Ochirkhuyag et coll., 1997 ; Kappeler et coll., 1998). La caséine  $\alpha_{s2}$  est formée d'une séquence de 178 acides aminés (Figure 9). Les motifs de phosphorylation se

répètent dans cette protéine 9 fois aux niveaux des sérines : 8, 9, 10, 32, 53, 108, 110, 113 et 121 (Kappeler et coll., 1998).

10	20	30	40	50	60
RPKYPLRYPE	VFQNEPDSIE	EVLNKRKILE	LAVVSPIQFR	QENIDELKDT	RNEPTEDHIM
70	80	90	100	110	120
EDTERKESGS	SSSEEVVSST	TEQKDILKED	MPSQRYLEEL	HRLNKYKLLQ	LEAIRDQKLI
130	140	150	160	170	180
PRVKLSSHYPY	LEQLYRINED	NHPQLGEPVK	VVTQEQAQYFH	LEFPQFFQL	GASPYVAWYY
190	200	210			
PPQVMQYIAH	PSSYDTPEGI	ASEDGGKTDV	MPQWW		

**Figure 8.** Séquence primaire du variant génétique B de la caséine  $\alpha_{S1}$  cameline d'après Kappeler et coll., (1998).

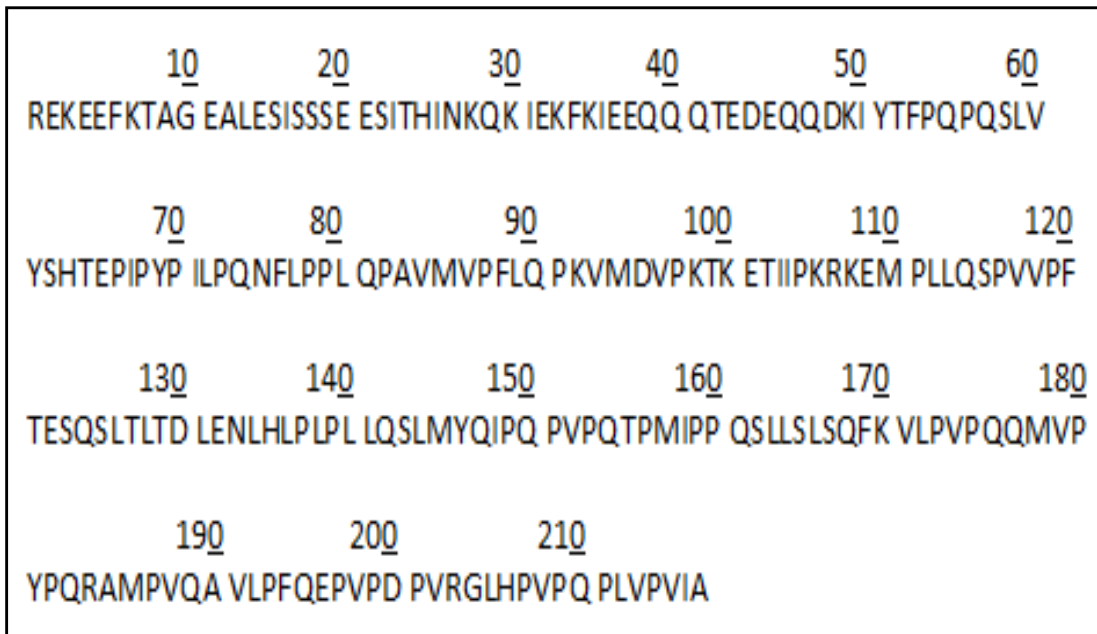
10	20	30	40	50	60
KHEMDQGSSS	EESINVSQK	FKQVKKVAIH	PSKEDICSTF	CEEAVRNIKE	VESAEPPTEN
70	80	90	100	110	120
KISQFYQKWK	FLQYLQALHQ	GQIVMNPWDQ	GKTRAYPFIP	TVNTEQLSIS	EESTEVPTTE
130	140	150	160	170	
STEVFTKKTE	LTEEEKDHQK	FLNKIYQYYQ	TFLWPEYLKT	VYQYQKTMTF	WNHIKRYF

**Figure 9.** Séquence primaire de la caséine  $\alpha_{S2}$  cameline (Kappeler et coll., 1998).

#### II.2.1.2.3. Caséine $\beta$

La caséine  $\beta$  est la protéine la plus importante en proportion (par rapport aux caséines totales) qui varie de 28 à 65 %, possède la plus longue chaîne d'acides aminés avec 217

résidus et un pHi de 4,76 (Figure 10). Son poids moléculaire peut varier de 24651 à 35000 Da (Farah et Farah-Riesen, 1985 ; Ochirkhuyag et coll, 1997 ; Kappeler et coll., 1998). Les sites de phosphorylation s'y présentent en 4 positions (Ser 15, 17, 18 et 19).

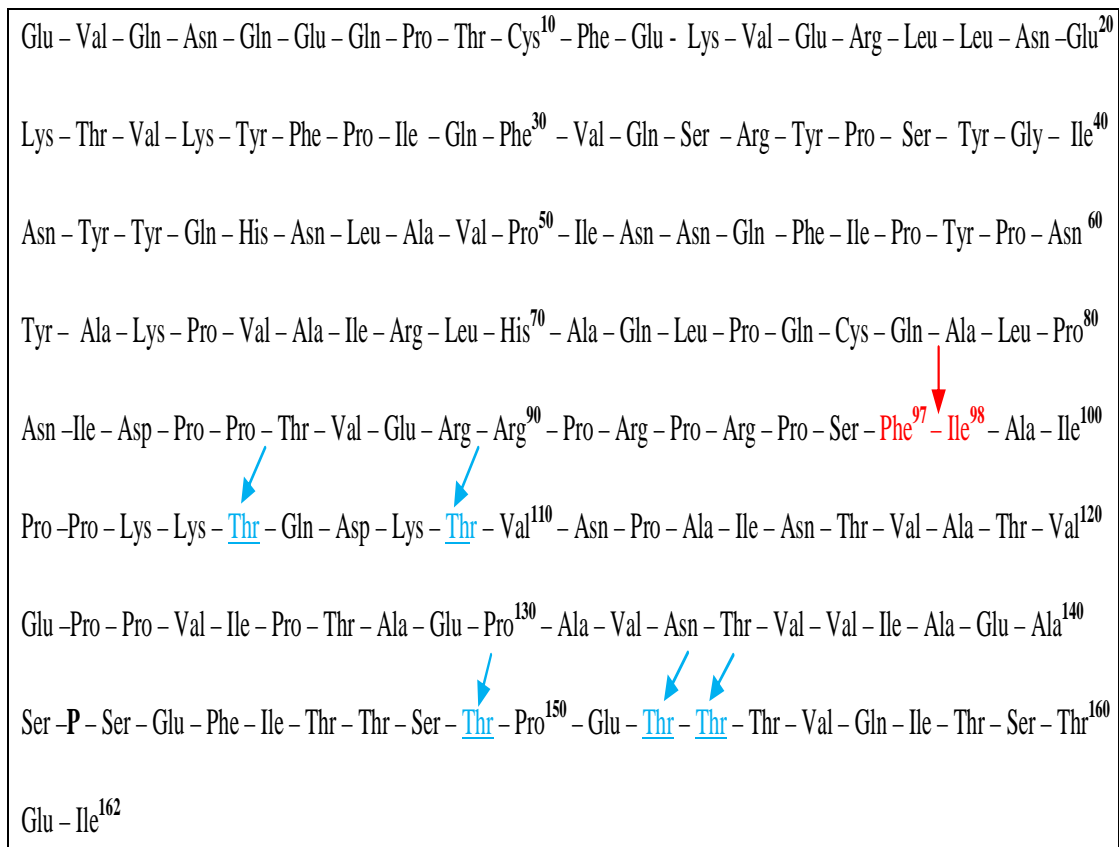


**Figure 10.** Séquence primaire de la caséine  $\beta$  cameline (Kappeler et coll., 1998).

#### II.2.1.2.4. Caséine $\kappa$

La caséine  $\kappa$  cameline est formée de 162 résidus d'acides aminés (Figure 11). Elle représente 3,5 à 5 % des caséines totales du lait camelin (Ochirkhuyag et coll, 1997 ; Kappeler et coll., 1998). Sa masse moléculaire est de 18254 Da et son point isoélectrique se situe à 4,11. Les sites de phosphorylation s'y présentent en 2 positions (Ser 141 et Ser 159). Kappeler et coll., (1998) ont proposé pour la caséine  $\kappa$  cameline une glycosylation de 5 résidus thréonine (Thr 105, 109, 149, 152 et 153).

La présure possède un site d'action différent de celui qu'il a sur la caséine  $\kappa$  bovine, elle scinde la caséine  $\kappa$  cameline au niveau la liaison peptidique 97-98 106 entre le résidu phénylanyle et le résidu Isoleucyle (Kappeler et coll., 1998).



**Figure 11.** Séquence primaire de la caséine  $\kappa$  cameline (d'après Kappeller et coll., 1998)

↙ : sites possibles de glycosylation. ↓ : site d'attaque par la chymosine.

## II.2.2. Protéases digestives (la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine)

### II.2.2.1. Pepsine porcine

#### II.2.2.1.1. Structure

La pepsine est une endoprotéase appartenant à la famille des protéases à acide aspartique, présente dans le suc gastrique de tous les mammifères et les oiseaux. L'une de ses remarquables caractéristiques est sa grande activité dans cet environnement acide ; elle est active même à pH 1 où plusieurs enzymes et protéines subissent une rapide dénaturation.

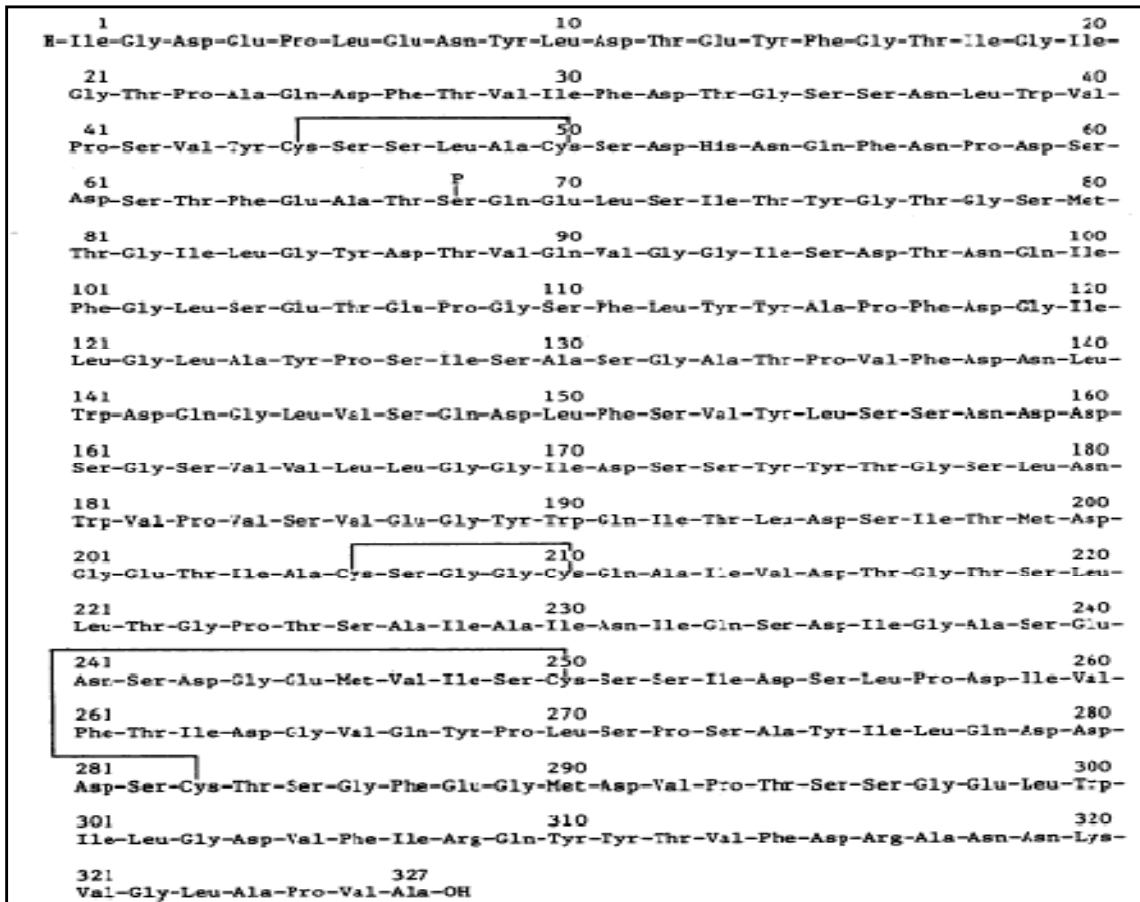
La pepsine du porc ou EC 3.4.23.1 est produite à partir de la muqueuse gastrique du porc sous sa forme inactive ; zymogène appelé, dans le cas de la pepsine, le pepsinogène, de PM égale à 42000 Da. Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire liée à la partie N-terminale de l'enzyme actif. Au niveau de la structure tridimensionnelle, cette chaîne peptidique, souvent nommée prosegment, occupe le site actif et

sert à bloquer l'entrée du substrat. Ainsi, l'activation du proenzyme nécessite la libération du prosegment et la dissociation de ce dernier du site actif (Richter et coll., 1998). Le zymogène gastrique, stable à pH neutre, est converti en enzyme actif sous l'effet de l'acidité naturelle du milieu stomacal. La conversion a lieu à des pH inférieurs à 5. Cette dépendance du pH de l'activation est due à la présence d'interactions électrostatiques entre les résidus basiques dans le prosegment et les résidus acides de la portion correspondante à l'enzyme actif. Ces interactions jouent un rôle essentiel dans le maintien du zymogène sous une forme inactive en stabilisant la position du prosegment dans le site actif. Aux valeurs de pH inférieurs à 5,0 les résidus acides impliqués deviennent protonés ; ce qui entraîne la rupture des interactions électrostatiques entre le prosegment et l'enzyme actif. Dès qu'une très faible quantité d'enzyme est libérée du précurseur à la faveur de l'acidité stomacale, la réaction devient autocatalytique, l'enzyme produite provoque l'activation du zymogène par libération du prosegment (Sanny, et coll., 1975 ; Richter et coll., 1998).

La pepsine porcine est formée d'une seule chaîne polypeptidique composée de 321 résidus d'acides aminés. Son poids moléculaire est de 35000 Da (Figure 12) (Sepulveda et coll., 1975). Son activité catalytique est la plus élevée entre pH 1 et 4 avec un maximum vers 1,8 et varie selon la nature du substrat.

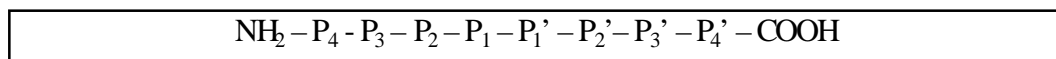
### II.2.2.1.2. Mécanisme d'action

Un mécanisme catalytique de base a été proposé pour l'hydrolyse des protéines par certaines protéases acides, comme la penicillopepsine et l'endothiapepsine, dont l'activité catalytique dépend essentiellement de la présence des résidus d'acide aspartique. Les études cristallographiques ont montré que les enzymes de la famille des pepsines possèdent une structure composée de deux lobes séparés par une fente profonde, et chaque lobe apporte l'un des résidus aspartiques. Les deux lobes montrent une grande homologie au niveau de la structure tridimensionnelle qui est préservée dans la plupart des protéases aspartiques, bien qu'ils présentent une séquence en acides aminés différentes (Rao et coll., 1998 ; Erskine et coll., 2003). Cette structure complexe assure l'approche étroite des deux résidus aspartyles, qui dans l'ordre de peptide sont séparés par environ 183 résidus (Rao et coll., 1998 ; Andreeva et Rumsh, 2001). Lors de la coupure de la liaison peptidique, les deux acides aspartiques jouent simultanément le rôle de donneur et de receveur de protons.



**Figure 12.** Séquence complète d'acides aminés de la pepsine porcine (Sepulveda et coll., 1975).

La pepsine coupe de préférence en C-terminal des acides aminés aromatiques (Phe et Tyr) et hydrophobes (Leu, Ala, Glu et Gln), en position P<sub>1</sub> (figure 13). Certains acides aminés des protéines peuvent avoir des effets négatifs sur l'activité de la pepsine selon leur position au sein de leur site actif : l'Arg en position, la Lys et l'His en position P<sub>3</sub>. Par contre, la Pro a un effet bénéfique lorsqu'elle se trouve en position P<sub>3</sub> et P<sub>4</sub> même si elle a un effet négatif quand elle est en position P<sub>2</sub> ou P<sub>3</sub>'. L'activité de la pepsine est réduite presque à nulle lorsque la Pro ou Gly se trouve en position P<sub>1</sub> (Dunn, 2002).



**Figure 13.** Représentation des positions des acides aminés au sein du site actif de la protéase.



## II.2.2.2. Trypsine

### II.2.2.2.1. Structure

La trypsine (EC 3.4.21.4) est une des protéases à sérine, sécrétée par les cellules acines du pancréas sous forme d'une pro-enzyme appelée le trypsinogène (Figure 14) (Mikes et coll., 1966). Ce dernier est activé au niveau du duodénum sous l'action de l'entéropeptidase, par hydrolyse spécifique de la liaison Lys15- Ile16. Dès qu'une très faible quantité de trypsine est libérée du précurseur, la réaction devient autocatalytique (Abita et coll, 1969). La trypsine est formée de 201 résidus d'acides aminés en une seule chaîne polypeptidique et possède quatre ponts disulfures, son poids moléculaire est de 24000 Da. (Kauffman, 1965 ; Huber et coll., 1974).

Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Ile-Val-Gly-	I		Gly-Tyr-Thr-Cys-Gly-Ala-Asn-Thr-Val-Pro- Tyr-
I	5	10	15 20
-Gln-Val-Ser-Leu-	II		Trp-
Asn-Ser-Gly-Tyr-His-	25	30	35 40
-Val-Val-Ser-Ala-	III		Asn-
Ala-His-Cys-Tyr-Lys-	45	50	55 60
-Ile-Asn-Val-Val-	IV		Pro-
Glu-Gly-Asn-Gln-Gln-	65	70	75 80
-Ser-Tyr-Asn-Ser-	V		Ala-
Asn-Thr-Leu-Asn-Asn-Asp-Ile-Met-Leu-Ile-	85	90	95 100
-Ser-Leu-Asn-Ser-	VI		Thr-
Arg-Val-Ala-Ser-Ile-	105	110	115 120
-Glx-Cys-Leu-Ile-	VII		Val-
Ser-Gly-Trp-Gly-Asn-	125	130	135 140
-Leu-Lys-Cys-Leu-	VIII		Gly-
Lys-Ala-Pro-Ile-Leu-	145	150	155 160
-Gln-Ile-Thr-Ser-	IX		Glx-
Asn-Met-Phe-Cys-Ala-	165	170	175 180
-Gly-Asp-Ser-Gly-	X		Gly-
Gly-Pro-Val-Val-Cys-	185	190	195 200
-Ser-Gly-Cys-Ala-	XI		Ser-
Gln-Lys-Asn-Lys-Pro-	205	210	215 220
-Trp-Ile-Lys-Gln-	XII		
Thr-Ile-Ala-Ser-Asn	225	229	

**Figure 14.** Structure primaire du trypsinogène selon Mikes et coll., 1966.

#### II.2.2.2.2. Mécanisme d'action

Comme toutes les protéases à sérine dont elle fait partie, la trypsine possède une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un acide aspartique, en position 57, 102 et 195 respectivement (Stroud, 1974). Le mécanisme de coupure de la trypsine est basé sur la polarisation de la liaison peptidique par un groupement sérine sous forme alcoolate. Pour atteindre cet état, l'histidine et l'acide aspartique, formant une triade avec la sérine, doivent être positionnés pour que la liaison OH de la sérine soit très fortement polarisée.

Le mécanisme se déroule en deux temps. Dans la première étape, la coupure est effective, le peptide C-terminal est relargué dans le milieu, le peptide N-terminal acyle la sérine (enzyme modifiée). Et dans la seconde étape, l'eau (second substrat) coupe la liaison acyle, ce qui permet de libérer le second peptide, régénérant la forme initiale de l'enzyme. En effet, la coupure de la liaison peptidique se traduit par une attaque nucléophile de la sérine sur la fonction carbonyle, suivie de la formation d'un intermédiaire tétraédrique, puis de la libération des deux peptides (Kossiakoff et Spencer, 1981 ; Craik et coll., 1987).

Le site actif de la trypsine ressemblant à une poche profonde, en partie hydrophobe, accueille les longues chaînes latérales chargée (+), des résidus comme Arg ou Lys, à cause de la présence d'un résidu Asp chargé (-) au fond de la cavité.

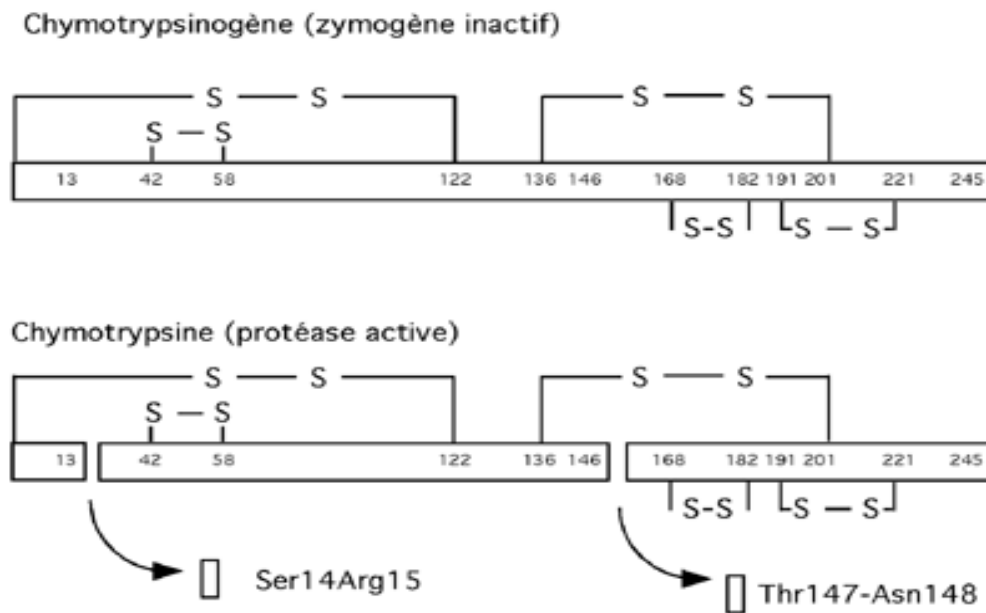
#### II.2.2.3. Chymotrypsine

##### II.2.2.3.1. Structure

La chymotrypsine est synthétisée dans le pancréas et sécrétée dans l'intestin grêle sous forme d'un zymogène, la chymotrypsinogène (Kiel et coll., 1963). L'activation est amorcée par la trypsine qui scinde la liaison entre les acides aminés 15 et 16. La chymotrypsine s'autolyse ensuite pour exciser deux dipeptides : Ser14-Arg15 et The147-Asn148 (figure 14).

La chymotrypsine est composée de 241 AA (Figure 15) avec un poids moléculaire de 25230 Da. Elle présente une structure globulaire compacte de trois chaînes reliées par deux ponts disulfures, inter chaînes, Cys1-Cys122, Cys136-Cys201 et repliées en 2 domaines (domaine 1 et domaine 2), de 120 acides aminés, chacun étant constitué essentiellement d'un tonneau  $\beta$ , formé de 6 brins  $\beta$  anti-parallèles. Il y a une certaine similarité de séquences entre

les deux domaines. Elle possède également trois ponts disulfures intra chaîne : Cys42-Cys58, Cys168-Cys182, Cys191-Cys220 (Brown et Hartley, 1966 ; Meloun et coll., 1966).



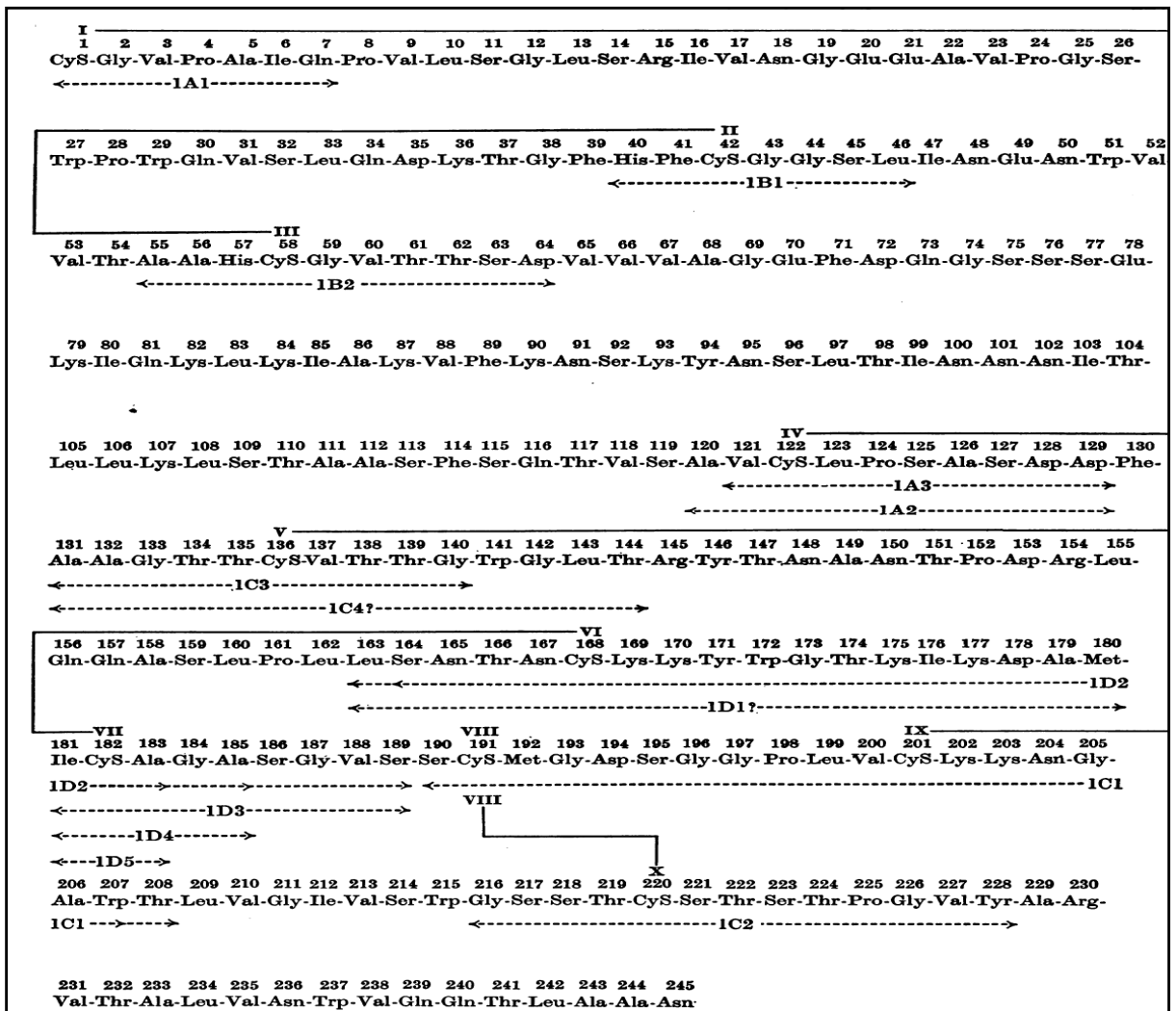
**Figure 15.** Activation du chymotrypsinogène.

### II.2.2.3. 2. Mécanisme d'action

La chymotrypsine comme les protéases à sérine dont elle fait partie, possède une triade catalytique caractéristique comprenant une sérine, une histidine et un acide aspartique. Les éléments de la triade sont fixés sur les deux domaines, qui participent ainsi tous les deux au même acte catalytique : l'histidine et l'acide aspartique sur le domaine 1, tandis que la sérine est sur le domaine 2. La chymotrypsine et la trypsine possèdent une structure tertiaire très semblable, Les positions des résidus clés, telles que celles de la triade, sont identiques dans les deux protéases. Toutefois, elles présentent une similitude de structure primaire de 50 % et elles diffèrent dans la spécificité du substrat (Walsh et Neurath, 1964). La trypsine agit sur des résidus de lysine et d'arginine, alors que la chymotrypsine agit sur de grands résidus hydrophobes tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine.

Le site actif de la chymotrypsine consiste en une région ressemblant à une crevasse bordée d'acides aminés hydrophobiques, accueille la chaîne latérale volumineuse de résidus d'acide aminés comme Phe, Trp, Tyr et Met. La chymotrypsine attaque en priorité en C-terminal des acides aminés aromatiques ; Phe, Trp et Tyr puis Leu Met et His. Elle s'attaque

moins fréquemment à Asn, Gln, Arg, Thr, Lys, Cys, Ala, Ile, Ser. La chymotrypsine est inactive en présence de la Pro, Asp, Glu et Gly en position P1 (Keil, 1987).



**Figure 16.** Structure de la chymotrypsine bovine avec localisation des ponts disulfures selon Brown et Hartley (1966).

### II.2.3. Peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse des caséines

Lahov et coll., (1971) étaient les premiers à identifier des polypeptides de haut poids moléculaires et de caractère basique només casécidins après traitement du lait acidifié par la présure. En 1974, Hill et coll. ont identifié l'Isracidin ; peptide antimicrobien correspondant au fragment N-terminal f(1-23) de la caséine  $\alpha_1$ . Ce peptide est obtenu par action de la chymosine sur la caséine bovine.

A partir de la caséine  $\alpha_2$ , Zucht et coll., (1995) ont isolé la casocidine I ;  $\alpha_2$  (165-203). Sous l'action de la pepsine, Recio et Visser (1999) ont pu séparer plusieurs peptides actifs de cette fraction caséinique (Tableau 4). Et ils ont pu purifier et caractériser deux peptides,  $\alpha_2$  (164-179) et  $\alpha_2$  (183-207). Mc Cann et coll., (2005), ont pu séparer par l'action de la chymosine d'autres peptides issus de la même région de la caséine  $\alpha_2$ . (181-207, 180-207, 175-207, 172-207, 164-207). En 2006, cette équipe, a pu séparer, par hydrolyse pepsique de la caséine entière, le fragment  $\alpha_2$  (183-207) déjà identifié et un fragment de la caséine  $\alpha_{s1}$  ;  $\alpha_{s1}$  (99-109).

La fermentation des caséinates de sodium par *Lactobacillus acidophilus* DPC6026 génère trois fragments montrant une activité antimicrobienne contre *Enterobacter sakazakii* ATCC 12868, *E.coli* JM 109 et *E.coli* DPC5063. Ces peptides correspondent aux séquences (21-29, 30-37, 195-208) de la caséine  $\alpha_{s1}$  (Hayes et coll., 2006). Sous l'action de la chymotrypsine, Srinivas et Prakash, (2009) ont pu séparer deux fragments actifs (79-88) et (148-161) de la caséine  $\alpha_2$ .

Deux peptides antimicrobiens ont été obtenus à partir de la caséine  $\kappa$ . Le premier, nommé kappacine a été obtenu par action de la chymosine et l'endoprotéinase Glu-C. Ce peptide, correspondant au fragment (138-158), a montré une action contre les bactéries cariogènes (Malkoski et coll., 2001).

Plusieurs peptides actifs ont été identifiés dans l'hydrolysate pepsique de la caséine  $\kappa$ . Trois d'entre eux ont montré des activités très intéressantes vis-à-vis des germes pathogènes (*L. innocua*, *Sal. Carnosus* et *E. coli*). Ces peptides correspondent aux fragments (18-24), (30-32) et (139-146) (Lopez-Exposito et Recio, 2006). L'hydrolyse pepsique de la caséine  $\kappa$  du lait humain a permis de libérer le peptide (63-117) caractérisé par sa richesse en résidus proline (Liepke et coll., 2001).

L'hydrolyse trypsique de la caséine  $\beta$  de lait de lapin a donné plusieurs peptides antimicrobiens (Baranyi et coll., 2003). Parmi les peptides identifiés, le fragment (64-77) était le peptide le plus actif mais uniquement sur les bactéries à Gram positif. L'hydrolyse du lait humain par la protéase de *Lactobacillus helveticus* PR4 a libéré un peptide correspondant au fragment (184-210) de la caséine  $\beta$  (Minervini et coll., 2003).

**Tableau 4.** Principaux peptides antimicrobiens issus de caséines

Protéine précurseur	Position du peptides	Séquence	Conditions d'hydrolyse	référence
caséine $\alpha_{s2}$	Bovine 150-188	KTKLTEEEKNRLNFLKKISQRYQKFALP QYLKTVYQHQQ	Chauffage et acidification du lait	Zucht et coll., 1995
	164-179	LKKISQRYQKFALPQY	Pepsine à pH 3,0	Recio et Visser, 1999
	181-207	KTVYQHQQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL		
	183-198	VYQHQQKAMKPWIQPKT		
	183-203	YQHQQKAMKPWIQPKTKVIPY		
	183-206	VYQHQQKAMKPWIQPKTKVIPYVRY		
	183-207	VYQHQQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	Chymosine pH 3,0	Mc Cann et coll., 2005
	164-207	LKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQQKAM KPWIQPKTKVIPYVRYL		
	172-207	QKFALPQYLKTVYQHQQKAMKPWIQPKT KVIPYVRYL		
	175-207	ALPQYLKTVYQHQQKAMKPWIQPKTKVI PYVRYL		
	180-207	LKTVYQHQQKAMKPWIQPKTKVIPYVRY L		
	181-207	KTVYQHQQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL	pepsine	Lopez-Exposito et coll., 2006
	Ovine 165-181	LKKISQYYYQKFAWPQYL		
184-208 203-208	VDQHQQKAMKPWTQPKTNAIPYVRYL PYVRYL			
caséine $\alpha_{s1}$	Bovine 1-23	RPKHPIKHQGLPEQVLNENLLRF	Chymosine pH 6,4	Lahov et Regelson, 1995
	99-109	LRLKKYKVPQL	Pepsine à pH 2,5	Mc Cann et coll., 2006
	21-29, 30-37, 195-208	IKHQGLPQE VLNENLLR SDIPNPIGSENSEK	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DPC6026	Hayes et coll., 2006
	Lapine 19-25	FHLGHLK	trypsine	Baranyi et coll., 2003
Caséine $\kappa$	Humaine 63-117	YQRRPAIAINNPYVPRTYANPAVVRPH AQIP	pepsine	Liepke et coll., 2001
	Bovine 138-158	AVESTVATLEDSPEVIESPPE	pepsine	Malkoski et coll., 2001
	17-21	FFSDK	trypsine	Matin et coll., 2000
	18-24 30-32	FSDKIAK YVL	pepsine	Lopez-Exposito et Recio, 2006
	139-146	VESTVATL		
Caséine $\beta$	Lapine 50-56	HVEQLLR	trypsine	Baranyi et coll., 2003
	64-77	ILPFIQSLFPFAER		
	Humaine 184-210	QELLLNPTHQYPVTQPLAPVHNPISV	Proteinase PR4 ( <i>Lactobacillus helveticus</i> )	(Minervini et al., 2003)

## **MATERIELS ET METHODES**

## I. Matériel biologique

### I.1. Caséine bovine

La caséine bovine employée est une caséine commerciale à l'état de poudre (C8654, SIGMA), préparée sous forme de caséinates de sodium avec un taux d'azote de 13,5-16% et un taux de sodium (Na)  $\leq$  3%. Cette poudre est soluble dans l'eau distillée. Une solution à 50mg/ml dans l'eau distillée présente un pH de 6,8.

### I.2. Caséine cameline

La caséine cameline utilisée dans ce travail a été préparée à partir d'un échantillon de lait cru de chamelle de la race « *Sahraoui* », (Ghardaïa, Algérie). Le lait préalablement chauffé, pendant 30 min, à 35°C et écrémé par centrifugation à 4500×g pendant 15min à 4°C.

Les caséines entières sont séparées des autres constituants du lait par précipitation à pH 4,3, par l'ajout de HCl 1N. Après un chauffage de 10 min entre 30 à 35°C, les caséines sont récupérées par centrifugation à 6370×g pendant 30min (4°C) (Alim et coll., 2005 ; Siboukeur, 2006). Le précipité ainsi obtenu est lavé à l'eau distillée et centrifugé de nouveau. Cette opération de lavage est répétée trois fois afin d'épuiser les protéines solubles du lactosérum ainsi que les constituants non protéiques tels que le lactose et les minéraux (Tomita et coll., 2002 et Wakabayashi et coll., 2006). Les caséines obtenues sont resolubilisées à pH 7,0 par ajout de NaOH 1N et une deuxième précipitation est effectuée comme indiquée ci-dessus (à pH 4,3). Les caséines sont finalement resuspendues dans une quantité d'eau distillée et resolubilisées à pH 7,0 (NaOH 1N). La pureté des caséines préparées est vérifiée par électrophorèse sur SDS-PAGE. Pour une meilleure conservation, les caséines camelines préparées sont lyophilisées et stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

### I.3. Protéases

Les enzymes employées sont fournis sous forme de poudre lyophilisée et dont les caractéristiques principales indiquées par le fabricant sont comme suit :

- Pepsine de la muqueuse gastrique de porc, 3,640 U/mg de solide et 4220 U/mg de protéine, (P6887, SIGMA).
- Trypsine bovine pancréatique, type I, 10,000 U/mg de protéine, (T8003, SIGMA)



-  $\alpha$ -Chymotrypsine bovine pancréatique, type I,  $\geq 40$  U/mg de protéine (C3142, SIGMA).

## II. Conditions de protéolyse des caséines

Dans le but d'obtenir des peptides à activité antimicrobienne par hydrolyse enzymatique des caséines, bovine ou cameline, ces protéines ont été soumises, chacune, à l'action de la pepsine, de la trypsine ou de la chymotrypsine.

Pour chaque enzyme étudiée, des cinétiques d'hydrolyse ont été réalisées pour une solution de caséine à 5% (5g de poudre de caséine dans 100ml d'eau distillée) incubée à 37°C. Des prélèvements de protéolysat ont été effectués à intervalles de temps suivants : 2,5, 5, 10, 15, 30 et 45min, puis, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24H sur une durée totale de 24 heures. Ces échantillons sont congelés à - 20°C jusqu'à analyse et caractérisation.

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

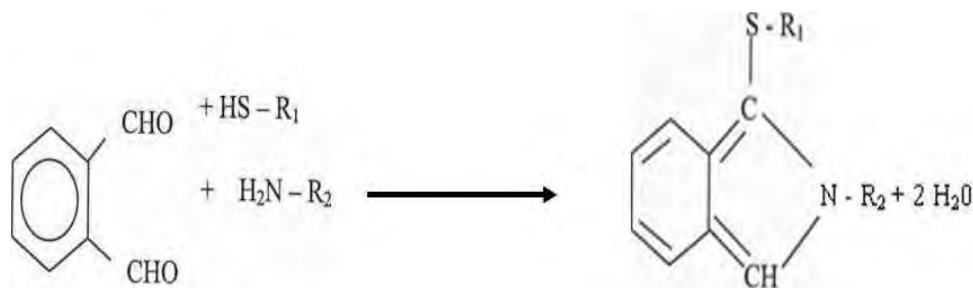
L'hydrolyse pepsique est réalisée à pH 2,5 alors que celles de la trypsine et de la chymotrypsine sont effectuées à pH 7.8 (tampon phosphate, 50mM). L'arrêt de l'hydrolyse se fait par chauffage à 80 °C pendant 15 minutes.

Le rapport enzyme/substrat (E/S) à appliquer pour chaque protéase à été préalablement déterminé en effectuant des hydrolyses durant 24H à différentes valeurs : E/S variant de 1/1000, 1/750, 1/250, 1/100, 1/50, 1/20 à 1/10 ( p/p : poids de l'enzyme en gramme de solide par poids de la caséine en gramme).

Dans les conditions d'hydrolyse précitées, les protéolysats obtenus au bout de 24H d'hydrolyse sont analysés par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Le rapport E/S à maintenir correspond à la plus faible quantité en enzyme pour la quelle il y a disparition totale du substrat après 24H d'hydrolyse.

### III. Détermination du degré d'hydrolyse par la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA)

Le degré d'hydrolyse (DH) correspond au nombre de liaisons peptidiques coupées sur le nombre total de liaisons. La méthode OPA est préconisée pour suivre la cinétique d'hydrolyse des protéines du lait ; elle est basée sur la réaction de l'orthophtaldialdéhyde (OPA), en présence du  $\beta$ -mercaptoéthanol, avec les groupements aminés relâchés lors de l'hydrolyse des protéines (figure1). Le complexe donne un composé détectable à 340 nm (Church et coll.; 1983; Nielsen et coll., 2001).



**Figure 1.** Réaction du orthophtaldialdéhyde (OPA) avec les groupements amines.

Le réactif OPA est préparé extemporanément en mélangeant 25ml de tetraborate disodique (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 10H<sub>2</sub>O) à 0.1M (pH 9,3), 5 ml de sodium dodécyl sulfate à 10% (p/v) et 100 $\mu$ l du B-mercaptoéthanol avec 80 mg d'OPA dissous dans 1ml de méthanol pur. Le mélange est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

A 1ml du réactif ainsi préparé est ajouté un volume de 50 $\mu$ l de l'échantillon à doser, contenant 5-100 $\mu$ g de peptides. Après 2 min d'incubation, l'absorbance est lue à 340nm contre un blanc constitué comme indiqué ci-dessus en remplaçant l'échantillon à analyser par 50 $\mu$ l d'eau distillée ou bien par du tampon employé pour préparer l'échantillon à tester.

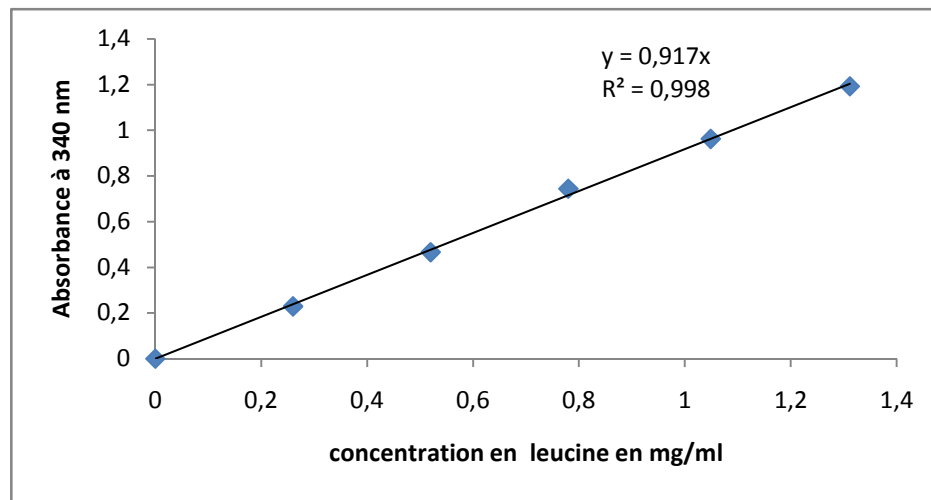
Une courbe d'étalonnage à la leucine est établie chaque fois qu'une nouvelle solution de réactif OPA est préparée (figure 2).

Expression du DH ;

$$DH = \frac{(\text{Taux de groupements NH}_2)_{\text{ech}} - (\text{Taux de groupements NH}_2)_{T0}}{(\text{Taux de groupements NH}_2)_{\text{ht}} - (\text{Taux de groupements NH}_2)_{T0}} \times 100$$

Où ;

- (Taux de groupements  $\text{NH}_2$ )<sub>ech</sub> ; dans chaque hydrolysats exprimé en mg/ml de leucine
- (Taux de groupements  $\text{NH}_2$ )<sub>T0</sub> ; du mélange réactionnel à T= 0 min d'hydrolyse, exprimé en mg/ml de leucine.
- (Taux de groupements  $\text{NH}_2$ )<sub>ht</sub> ; exprimé en mg/ml de leucine, déterminée sur un hydrolysats obtenu par digestion totale à HCl (6M) à 120°C au bout de 24H. Les profils HPLC des hydrolysats acides obtenus pour la caséine bovine et cameline sont donnés dans l'annexe 1.



**Figure 2.** Courbe d'étalonnage à la leucine (mg/ml) selon la méthode OPA.

#### **IV. Séparation des peptides actifs par précipitation sous l'effet de la force ionique et du pH**

La séparation des peptides actifs par précipitation est étudiée en fonction du pH et la force ionique. Ainsi, l'hydrolysats de caséine bovine, montrant une activité antimicrobienne, a été additionné d'une quantité de NaCl solide pour avoir une solution à différentes molarité en sel (0,5, 1,0, 1,5, 2M). Après 30 min d'agitation, l'hydrolysats est centrifugé à 10000\*g pendant 10 min à 4°C. Le précipité formé est récupéré. Le culot est lavé par centrifugation avec du tampon phosphate (5mM) ajusté au pH étudié pour éliminer les peptides solubles. Le culot obtenu est repris dans un volume d'eau distillée ajustée à pH 1,5 à 2,0. Le mélange est agité pendant 90 min en maintenant l'échantillon entre 4 à 7°C. Par la suite le mélange est centrifugé à nouveau à 10000\*g pendant 10 min à 4°C et les peptides actifs sont récupérés dans le

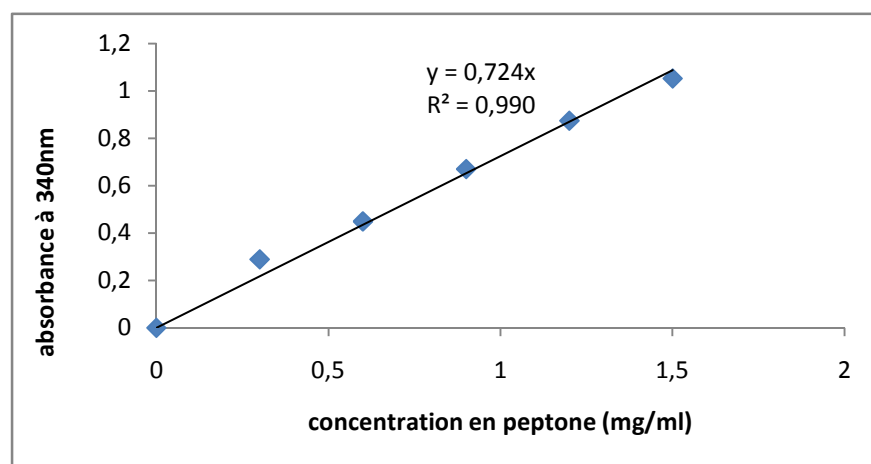
surgeant alors que le culot est éliminé. La concentration en peptides des extraits obtenus a été déterminée par la méthode OPA (Minervini et coll., 2003) comme indiqué ci-dessus.

L'effet du pH est étudié en ajustant l'hydrolysât à différentes valeurs de pH (3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,0, 7,5) par ajout de l'acide chlorhydrique (1N). Après 30 min d'agitation à 35°C, l'hydrolysât est traité en appliquant les mêmes étapes notées ci-dessus. Le surageant est récupéré et conservé à -20°C jusqu'à analyse par chromatographie liquide à haute performance (RP-HPLC).

## V. Dosage du taux de protéines et de peptides

Le taux de protéine est dosé selon la méthode Bradford (1976). La méthode est basée sur le principe de l'utilisation d'un réactif composé de bleu de Coomassie (réactif Bradford ; bio-Rad, Richmond, USA) qui se fixe aux protéines. Il se forme ainsi, en milieu acide, un complexe bleu qui présente un maximum d'adsorption à 595 nm. L'absorbance mesurée est comparée à une courbe d'étalonnage tracée avec différentes concentration en sérum albumine bovine.

Le taux de peptides est mesuré en utilisant le réactif O-PhthaldiAldehyde (OPA) (church et coll.; 1983). Le mélange réactionnel est préparé comme indiqué ci-dessus. Pour le dosage des peptides, une courbe étalon à la peptone pancréatique de caséines est tracée (figure 3).



**Figure 3.** Courbe d'étalonnage à la peptone (mg/ml) selon la méthode OPA.

## **VI. Méthode d'analyse des peptides**

L'analyse de protéolysats est réalisée par électrophorèse sur SDS-PAGE et par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC). L'analyse de peptides est effectuée par spectrométrie de masse.

### **VI.1. Analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodicyl Sulfate (SDS-PAGE)**

Les hydrolysats de caséines préparés pour les trois enzymes employées ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) suivant la méthode de Laemmli (1970). Cette technique est basée sur la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. En effet, le SDS de nature fortement anionique confère aux protéines une même charge globale négative ainsi leur migration, dans un champ électrique, va dépendra que du poids moléculaire.

L'échantillon à analyser est préalablement dénaturé par chauffage à 95°C pendant 5 min en présence d'une solution contenant du SDS et un agent réducteur ;  $\beta$ -mercaptoéthanol pour assurer la rupture des ponts disulfures.

L'électrophorèse a été réalisée dans une cuve verticale BIO-RAD (Mini Protean Tetra system) selon les conditions opératoires suivantes :

- Gel de concentration : à 4 % d'acrylamide (37/1, C = 2.63%) en tampon Tris, pH 6,8.
- Gel de séparation (8,0 × 6,0 × 0,075 cm) : à 15 % d'acrylamide en tampon Tris, pH 8,8.
- Migration sous un voltage de 100 V, pendant 20 min (dans le gel de concentration) ensuite à 200V pendant 45 min (dans le gel de séparation).

Les masses des protéines et des peptides de l'échantillon analysé sont déterminés en comparant leur mobilité avec celle des protéines standards (SM0661, Fermentas).

## **VI.2. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance en Phase Inverse (RP-HPLC)**

La chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC, de l'anglais Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography) est une technique qui permet la séparation des molécules en fonction de leur différence d'affinité pour une phase stationnaire apolaire et une phase mobile plus au moins polaire. La phase stationnaire comprend un support de particules de silice de 5 à 10 $\mu$ m de diamètre très poreux et un revêtement greffé de chaînes aliphatiques de 4 (C4), 8 (C8) ou 18 (C18) atomes de carbone qui déterminent l'hydrophobie de la phase. Pour l'analyse de peptides de plus de 20 à 30 acides aminés, il est recommandé d'utiliser une colonne de type C4, pour des peptides plus courts, c'est des colonnes en C18 qui sont plutôt utilisées. Le choix de la phase mobile, cependant, est fonction des molécules à analyser. La phase stationnaire utilisé dans notre travail est une colonne xbridge C18 (5 $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm) réglée à un débit de 1ml/min. La phase mobile est constitué d'un solvant A composé d'eau ultra pure (milliQ, Millipore, résistivité : 18,2 M $\Omega$ .cm à 25°C) à 0,1% de TFA et d'un solvant B composé de l'acétonitrile à 0,1% de TFA. Les deux solvants sont utilisés selon un gradient d'élution de 0-40% de solvant B pendant 80 min, de 40-100 % B pendant 5min et à 100% de B pendant 5min, la phase est rééquilibrée par l'envoi du solvant A pendant 15min.

L'analyse en RP-HPLC est réalisée grâce à un système automatique constitué d'un contrôleur de gradient à barrette de pompe waters TM 600E, un injecteur automatique Waters 717 et un détecteur Waters 996 à barrette de diode et un dégazeur en ligne Waters. Le détecteur permet la mesure de l'absorbance aux longueurs d'ondes allant de 400-900 nm, cependant la lecture de l'absorbance à 215nm permet la visualisation des liaisons peptidiques au sein des protéines ou bien d'un peptide. L'élution est réalisée à température ambiante. Avant injection, les échantillons sont filtrés à travers un filtre d'acétate de cellulose 0,2  $\mu$ m. Le logiciel Millennium a été utilisé pour tracer, d'acquérir et d'analyser des données chromatographiques.

## **VI.3. Analyse des peptides par Spectrométrie de masse**

Les spectres de masse ont été réalisés dans le laboratoire d'application de Spectrométrie de Masse du service Commun de Physicochimie de Lille II (France), et dans celui du Centre Commun de mesure de Spectrométrie de masse de Lille I.

L'analyse par spectrométrie de masse d'un échantillon est constituée d'une série d'opérations successives : les molécules à analyser sont vaporisées puis ionisées dans la source de l'appareil. Ces ions formés sont filtrés selon leur rapport masse/charge par un analyseur, et terminent leur course sur un détecteur. Le spectre de masse est obtenu par le traitement du signal émis par le détecteur.

Un spectromètre de masse est toujours composé de cinq parties :

Une **chambre d'introduction** dans laquelle l'introduction de l'échantillon peut se faire directement avec une seringue et un pousse-seringue ou par couplage à la chromatographie liquide haute-performance lorsque la technique utilisée le permet.

Une **source**, appelée également chambre d'ionisation et de volatilisation, au niveau du quelle l'échantillon à analyser passe à l'état gazeux (vaporisation/sublimation/désorption), suivie par une ionisation des molécules et la décomposition des ions. Plusieurs méthodes d'ionisation existent, le choix de celle-ci est directement lié à la nature de l'échantillon et au type d'analyses souhaitées.

Les molécules ionisées sont entraînées vers **l'analyseur** (appelé également chambre de séparation) ou niveau du quel les ions sont séparés en fonction du rapport masse/charge ( $m/z$ ) sous l'effet d'un champ magnétique et/ou électrique.

Les ions ainsi triés, arrivent au niveau du **détecteur**, constitué d'un collecteur d'ions et d'un ensemble électronique de mesure et d'amplificateur des signaux associés aux ions de différentes masses. Les ions viennent heurter un multiplicateur et l'énergie amplifiée est transcrite en un signal électrique, l'intensité du signal étant proportionnelle au nombre d'ions.

La dernière partie de l'appareil correspond à un **enregistreur**, permettant l'acquisition des données, qui est faite par un microprocesseur nécessitant une interface. Le rôle de celui-ci est de transcrire sous forme digitale les signaux analogiques. Les données issues de cette conversion sont stockées dans la mémoire de l'ordinateur pour le traitement.

Les sources, analyseurs et détecteurs existants peuvent être associés de manière différente et ainsi créer une grande variété d'appareil. Le choix d'un type de source ou d'un type d'analyseur dépend de la nature de l'échantillon à analyser et du type de données souhaitées.

Pour l'analyse des peptides issus de l'hydrolyse des caséines, deux types d'ionisation ont été utilisés : la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF) et l'Electrospray.

### **VI.3.1. Analyse des peptides par couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse (LC/MS)**

L'analyse a été réalisée sur une chaîne UHPLC de type Accela ((Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), constitué d'un injecteur automatique, un contrôleur, de pompes et d'un dégazeur. Le système est piloté par un ordinateur muni d'un logiciel : Xcalibur. La chaîne UHPLC est couplée à un spectromètre de masse Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) équipé d'une source d'ion électrospray (ESI). Les analyses sur HPLC ont été effectuées sur une colonne C18 xbridge (5 $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm), employée lors de l'analyse des peptides par HPLC, en appliquant un gradient identique. Un diviseur de débit appelé "splitter" est utilisé pour réduire le débit à 300 $\mu$ l/min à l'entrée du spectromètre.

Les conditions d'entrée d' ESI sont les suivantes : l'azote a été utilisé à la fois comme une gaine et auxiliaire à des débits arbitraires de 20 à 10  $\mu$ L\*min<sup>-1</sup> , la température capillaire a été fixée à 275° C , dans le mode positif , la tension capillaire a été réglée à 93,4 V , la tension de source à 3,3 kV et le courant de la source entre 0-8 JA ; les spectres ont été enregistrés sur une gamme de masse / charge de 400-2000 m / z.



**Figure 4.** Photo de la chaîne UHPLC de type Accela ((Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) couplée à un spectromètre de masse Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) équipé d'une source d'ion électrospray (ESI).



### **VI.3.2. Analyse des peptides par la technique de la désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF)**

La technique de désorption laser assistée par matrice (MALDI-TOF) permet de travailler sur une grande gamme de masses (moins de 1kDa à plusieurs centaines de kDa) avec une bonne précision de mesure de masse et une mise en œuvre relativement simple ainsi qu'une grande rapidité d'analyse.

La technique MALDI utilise en général un faisceau laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (U.V.) ou l'infrarouge (I.R) pour désorber et ioniser un mélange matrice /échantillon co-cristallisé sur une surface métallique (appelée cible). L'énergie est restituée en partie et transférée à l'échantillon qui sera alors volatilisé et ionisé par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma pour former des ions mono ou dichargés de type  $[M+nH]^{n+}$ . Les ions formés sont ensuite accélérés par application d'un champ électrique intense entre la cible et la première lentille électrostatique du spectromètre appelée lentille d'extraction.

L'analyse en MALDI nécessite une première étape de co-cristallisation d'une faible quantité de l'échantillon avec une grande quantité de matrice, sur une surface métallique appelée cible généralement en métal inoxydable conducteur et traité en surface de manière à être chimiquement inerte par rapport à l'échantillon.

La matrice va permettre d'isoler les molécules de l'échantillon les unes des autres pour éviter la formation de complexes de taille trop importante, minimiser la dégradation de l'échantillon par absorption de l'énergie du faisceau laser incident et améliorer le rendement d'ionisation. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice ce qui provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon.

La source MALDI utilisée, est couplée à un analyseur en temps de vol (TOF pour "Time Of Flight") en mode réflecteur, bien adapté à l'ionisation pulsée par désorption laser. L'analyseur en temps de vol sépare les ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans un tube de vol. Le mode d'ionisation MALDI génère essentiellement des ions monochargés pour lesquels l'analyseur TOF offre une gamme de masses théoriquement illimitée.

L'analyse a été réalisée sur un spectromètre de type UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), en mode réflecteur, équipé par une source laser (Smartbeam™). L'analyse est effectuée sur une marge de masse allant de 500  $m/z$  à 6000 ou bien de 3000 à 20000. Un total de 1000 spectres est acquis à chaque spot à une fréquence de laser de 100Hz. Un logiciel : FlexImaging™ 2.1 est utilisé pour l'acquisition des données. Les standards pour les calibrations spectrales employés sont constitués d'un mélange de peptides de masse allant de 900 à 3500 Da ou bien d'un mélange de protéines de masse allant 3000-9000 Da (exprimé en masse sur charge :  $m/z$  ). Deux matrices sont employées (absorbant le rayonnement U.V.), la première est une solution à 10 mg/ml d'acide cyano-4-hydroxycinamique (ACHC) préparé dans un mélange à 30/70 (v/v) d'eau et d'acetonitrile à 0,1% de TFA. La deuxième correspond à une solution à 10 mg/ml d'acide sinapinique (AS) préparée dans un mélange 25/75 (v/v) d'eau et d'acetonitrile à 0,1% de TFA. 1  $\mu$ l de la matrice et 1  $\mu$ l de chaque fraction sont déposés sur la cible. Les échantillons sont séchés avant d'être analysés. 1000 tirs au laser sur chaque cible sont généralement accumulés pour produire le spectre de mass final. Un logiciel de traitement de spectre à permis d'intégrer chaque pic détecté et de déterminer ainsi les masses correspondantes en mode positif. La précision sur la masse est de 0,01%.



**Figure 5.** Photo du spectromètre de masse de type UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## VII. Tests antimicrobiens

### VII.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

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

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées : 4 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* **ATCC 6633** (Rockville, MD, USA), *Listeria innocua* **LMG 11387**, *Listeria monocytogenes* **ATCC 3512** (CM/NCTC, UK), *Staphylococcus aureus* **CIP 4.83** et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* **JM 109**, *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  et *Escherichia coli* **CIP 54127**.

Une culture de chaque souche à tester dans du bouillon BHI à 37°C (500 $\mu$ l/ 5ml) est prélevée en phase exponentielle et une suspension dans du bouillon Müller-Hinton (MH) est réalisée pour avoir approximativement  $1 \cdot 10^6$  UFC/ml. Un milieu solide MH est ensemencé par inondation en introduisant 2 ml de la suspension et élimination de l'excès. Après séchage du milieu sous la hotte microbiologique pendant 20 minutes, 20  $\mu$ l de l'hydrolysat à tester sont déposées en spot à la surface de la gélose et laissés diffuser à 4°C pendant 2 H. Après incubation à 37°C pendant 18 à 24 H, l'activité antimicrobienne se traduit par la présence de zone d'inhibition autour des spots.

### VII.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des peptides actifs

Le principe de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne d'un peptide vis-à-vis d'une souche cible en milieu liquide. La croissance ou non de la culture bactérienne en présence d'un peptide est alors comparé à une culture témoin sans peptide. Ainsi, l'absence de croissance bactérienne après une durée d'incubation (18-24H) reflète l'activité antimicrobienne de ce peptide. Cette technique est employée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et qui correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche. La détermination de la CMI se fait sur microplaques stériles (Costar 3799, Corning Incorporated, USA). La concentration

en peptide de départ est fixée à 2mg/ml dans du milieu (MH) ensuite une série de dilutions au un demi sont préparée. Dans chaque puits contenant 190µl du milieu (MH) sont ajoutés 50 µl du peptide et 10µl de la souche à tester préalablement diluée dans du milieu (MH) pour avoir une charge bactérienne finale entre  $2-8 \times 10^4$  UFC/ml. L'absence de croissance bactérienne est révélée par mesure de l'absorbance à 630 nm par un lecteur à microplaque (MRX II, Dynex Technologies, microcicer company) après 24H d'incubation à 37°C. L'absorbance des puits correspondant à des concentrations décroissantes du peptide est comparé à celle des puits d'un témoin négatif constitué du milieu Müller-Hinton et d'un témoin de culture. La CMI correspond à la concentration en peptide du dernier puits présentant une absence de croissance. Deux témoins positifs sont employés ; la tétracycline (T3383, SIGMA) et la nisine A,  $5,2 \times 10^7$  UI/g (Danisco, Beaminster Dorset, UK), préparée par solubilisation dans le HCl à 0,01M.

### VII.3. Mise en évidence de l'effet bactéricide ou bien bactériostatique des peptides actifs

La détermination de la CMI est suivie par une mise en évidence d'un effet bactéricide ou bien bactériostatique du peptide testé. L'effet bactériostatique correspond à une inhibition de la croissance microbienne sans mort des cellules alors que l'effet bactéricide correspond à une mortalité cellulaire. Cet effet est déterminé par dénombrement des cellules bactériennes dans les puits correspondant à la CMI. A partir de ces derniers 100 µl du milieu est prélevé et un dénombrement en surface est réalisé sur du milieu LB à 0,5% de glucose. Un dénombrement des puits correspondant au témoin de culture est également réalisé de la même façon après une série de dilution dans des tubes de milieu tryptone-sel à 900µL. Une comparaison entre le nombre de colonies en UFC/ml déterminé dans les puits correspondant à la CMI et celui du témoin de culture permet de déterminer le pourcentage de mortalité des cellules bactériennes d'après la formule suivante :

$$\% \text{ Mortalité} = \frac{P_{\text{témoin de culture}} - P_{\text{puits CMI}}}{P_{\text{témoin de culture}}} \times 100$$

$P_{\text{témoin de culture}}$  = population du témoin de culture

$P_{\text{puits CMI}}$  = population des puits correspondant à la CMI

} après 24H d'incubation à 37°C

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## **I. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens issus de la protéolyse de caséine bovine**

Il est de plus en plus montré que l'hydrolyse enzymatique des caséines (essentiellement par des enzymes digestives ou microbiennes) génère des peptides à activité biologique (Clare et Swaisgood, 2000 ; Korhonen et Pihlanto, 2003; Yamamoto, Ejiri et Mizuno, 2003).

A côté des différents peptides antimicrobiens issus de l'hydrolyse enzymatique des caséines, plusieurs peptides à activité anti-hypertensive ont été identifiés, ces derniers sont libérés, principalement, de la caséine  $\beta$  bovine et humaine et des caséines  $\alpha$ s. Ces peptides sont libérés sous l'action combinée des protéases digestives (Maruyama and Suzuki, 1985 ; Yamamoto et coll., 2003 ; Haque et Chand, 2008).

L'hydrolyse enzymatique des caséines libère également des peptides opiacés, tels que, les fragments (60-66) de la caséine  $\beta$  bovine ( $\beta$ -casomorphines), (90-96) de la caséine  $\alpha$ s<sub>1</sub> et (51-57) pour la caséine  $\beta$  humaine (Severin et Wenshui, 2005 ; Meisel, 2005). Les phosphopeptides, caractérisés par un haut pouvoir de séquestration des minéraux et doués d'activité de transfert d'oligoéléments, sont générés, essentiellement, par hydrolyse trypsique des caséines  $\alpha$ s (la séquence 43-79 de la caséine  $\alpha$ s<sub>1</sub>) et  $\beta$  (recouvrant la séquence 1-25) (Clare and Swaisgood, 2000).

Des peptides localisés dans le segment N-terminal du caseinoglyco-macropéptide (extrémité C-terminale 106-169 de la caséine  $\kappa$ ), ont montré une activité anti-thrombotique. Parmi ces peptides, ceux libérés sous l'action de la trypsine (Jolles et coll., 1986). Les caséines sont également source de peptides à activité immuno-modulatrice, telles que les séquences issues de la caséine  $\beta$  humaine (séquence 54-59) et bovine (séquence 63-68 et 191-193) et de la caséine  $\alpha$ s<sub>1</sub> bovine (Coste et Tomé, 1991).

L'objectif de cette partie de l'étude est la recherche de peptides à activité antimicrobienne par hydrolyse aux protéases digestives des caséines bovines, l'étude de la possibilité de séparation de peptides actifs afin d'obtenir des solutions enrichies en peptides d'intérêt et en outre, l'étude du mécanisme d'action des protéases digestives sur la caséine bovine.

## I.1. Comportement à la protéolyse de la caséine bovine

### I.1.1. Hydrolyse pepsique

Afin de déterminer les meilleures conditions permettant l'obtention des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de caséine, l'hydrolyse a été menée sur une solution de caséine bovine à 5% (p/v), ajustée à pH 2,5 et maintenue à 37°C. Des prélèvements d'une partie aliquote d'hydrolysats sont effectués à des temps réguliers et l'activité antimicrobienne est recherchée.

Le rapport enzyme sur substrat (E/S) appliqué pour la cinétique d'hydrolyse pepsique est choisi suite à l'examen des profils HPLC des hydrolysats obtenus en appliquant différents rapports E/S. Le rapport à maintenir correspond à la plus faible quantité en enzyme pour laquelle il y a disparition totale du substrat au bout de 24 H d'hydrolyse (figure 1). Ainsi, le rapport maintenu était de  $E/S = 1/100$ . Bien que, à des quantités en enzyme plus faibles il y a également une hydrolyse assez poussée du substrat. Toutefois, la vitesse d'hydrolyse pour des intervalles d'hydrolyse plus courts peut être plus faible.

En outre, afin de suivre l'évolution de l'hydrolyse et étudier le mécanisme d'action de la pepsine sur la caséine bovine, les échantillons d'hydrolysats prélevés sont analysés en RP-HPLC selon les conditions décrites précédemment. La figure 2 montre les chromatogrammes de l'hydrolyse pepsique de la caséine bovine en fonction du temps d'hydrolyse obtenu pour un rapport E/S de 1/100.

L'examen des profils obtenus indique l'apparition dès le début de l'hydrolyse (2,5min) de plusieurs fragments de grande taille, avec des temps d'élution proches de ceux du substrat initial. Au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse, le taux de ces fragments diminue en faveur de celui des peptides de faible taille, qui apparaissent en faible quantité au début des chromatogrammes et continuent d'augmenter de concentration au cours de l'hydrolyse. Cette évolution se produit tandis qu'une partie du substrat demeure intacte. Cela suggère que la pepsine agit sur la caséine selon un mécanisme dit «one by one» et qui caractérise les réactions enzymatique où la protéine est dégradée immédiatement en peptides de petites tailles, aucune quantité appréciable de peptides intermédiaire n'est présente et le mélange réactionnel est constitué essentiellement de substrat intact et de produit finaux de petite taille. Cela signifie que la protéase dégrade une molécule de protéine à la fois. Ce mécanisme a été proposé pour

la première fois par Linderstrom-lang, en 1952, pour décrire l'action de la pepsine sur l'hémoglobine à son état globulaire native. Par contre, lorsque la structure globulaire de l'hémoglobine est préalablement dénaturée, l'action de la pepsine suit un mécanisme appelé « zipper » par Linderstrom-lang. Ce mécanisme suppose une conversion rapide de la protéine en produits de dégradation intermédiaires suivie par un clivage progressif (par étapes) des intermédiaires formés en peptides de plus petite taille (Vaintraub et Lapteva, 1994).

Cependant, dans le cas de l'action de la pepsine sur la caséine, la disparition progressive du substrat et l'apparition également de peptides intermédiaires dès le début de l'hydrolyse, caractéristique du mécanisme zipper, indique que l'action de la pepsine sur la caséine suit plutôt un mécanisme intermédiaire entre les deux décrits (Choisnard et coll., 2002 ; Srividhya et Schnell, 2006). En outre, l'apparition de peptides intermédiaires au début de l'hydrolyse, en parallèle à la dégradation progressive du substrat, est montrée sur le gel d'électrophorèse en SDS-PAGE (à 15% de polyacrylamide) (figure 3). Ce mécanisme d'action intermédiaire, peut être expliqué, pour la caséine, par sa structure native non globulaire et ouverte due principalement à la présence de plusieurs résidus prolines qui interrompent la structure secondaire et entraîne ainsi la formation d'une structure tertiaire ouverte avec une flexibilité conformationnelle plus grande que celle des protéines globulaires (Guo et coll., 1995). Cela offre une abondance des liaisons accessibles à l'enzyme qui favorise une action plus rapide de la pepsine.

Toutefois, la présence de certaines zones hydrophobes dans les chaînes peptidiques induit des interactions entre ces dernières qui sont à l'origine d'obstacle stérique à l'action de la protéase et l'inaccessibilité de certains sites d'action. Cet effet est connu par le masquage des sites d'action et qui représente un facteur limitant de la protéolyse. En effet, certains auteurs ont étudié la possibilité de la présence d'une étape de démasquage de ces sites, qui précède l'étape d'hydrolyse et qui est initiée par la scission de certaines chaînes peptidiques principales dont la conformation compact est initialement stabilisée par des interactions entre les régions hydrophobes des chaînes peptidiques (Vorobev et coll., 2009 ; 2011).

En outre, selon Qi et coll. (2007) la caséine en solution se présente dans un état d'équilibre entre monomères et agrégats avec un ratio de 2,5 : 2,0. Et lors de l'hydrolyse pepsique à pH 2,0, notamment au début de l'hydrolyse (les premières 30 minutes), ces auteurs ont remarqué une diminution de la concentration de ces agrégats mais une augmentation de

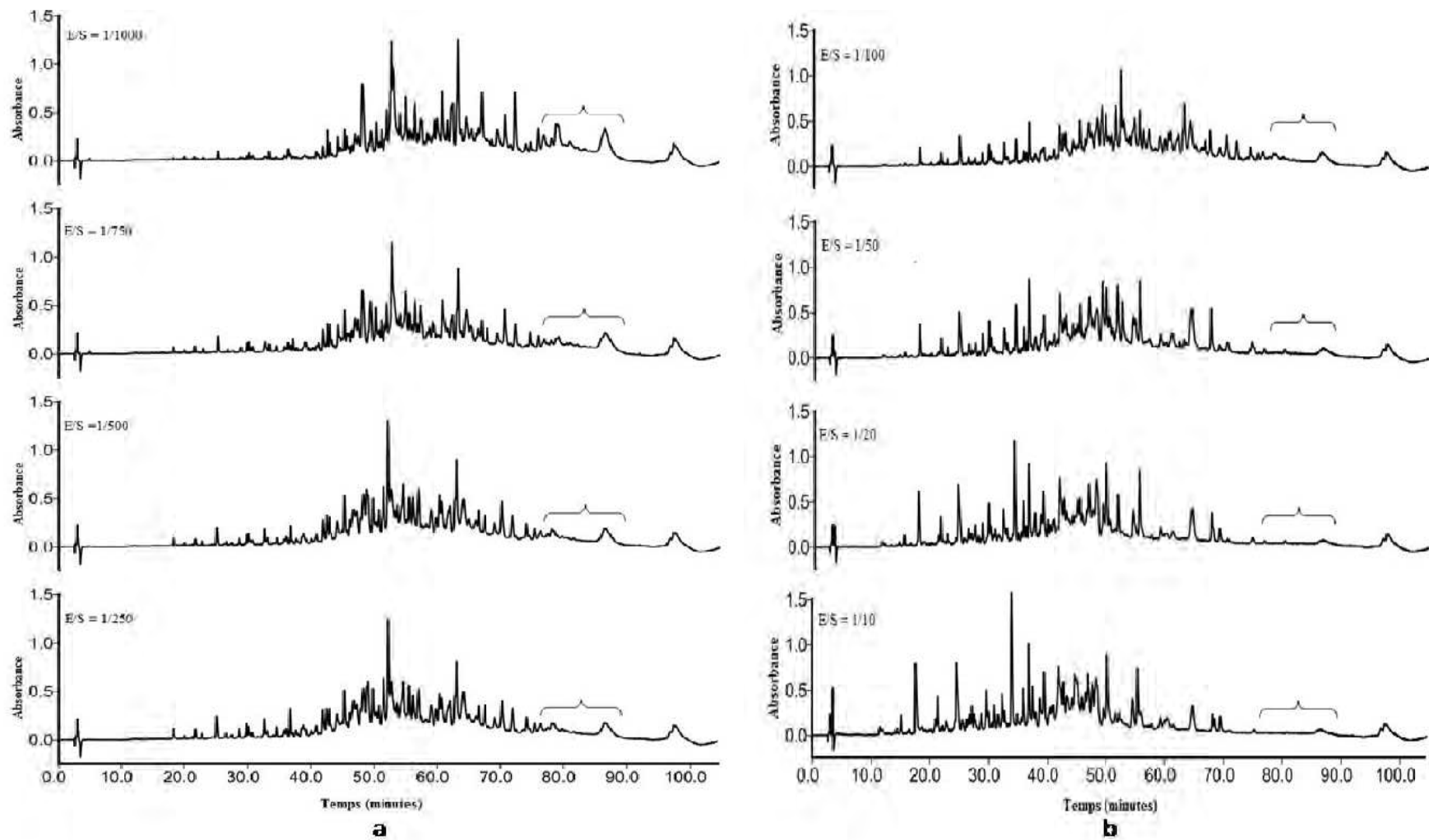


leur taille et une réduction dans la répulsion intermoléculaire. Ce qui suggère la formation de nouvelles interactions hydrophobes suite à une hydrolyse limitée.

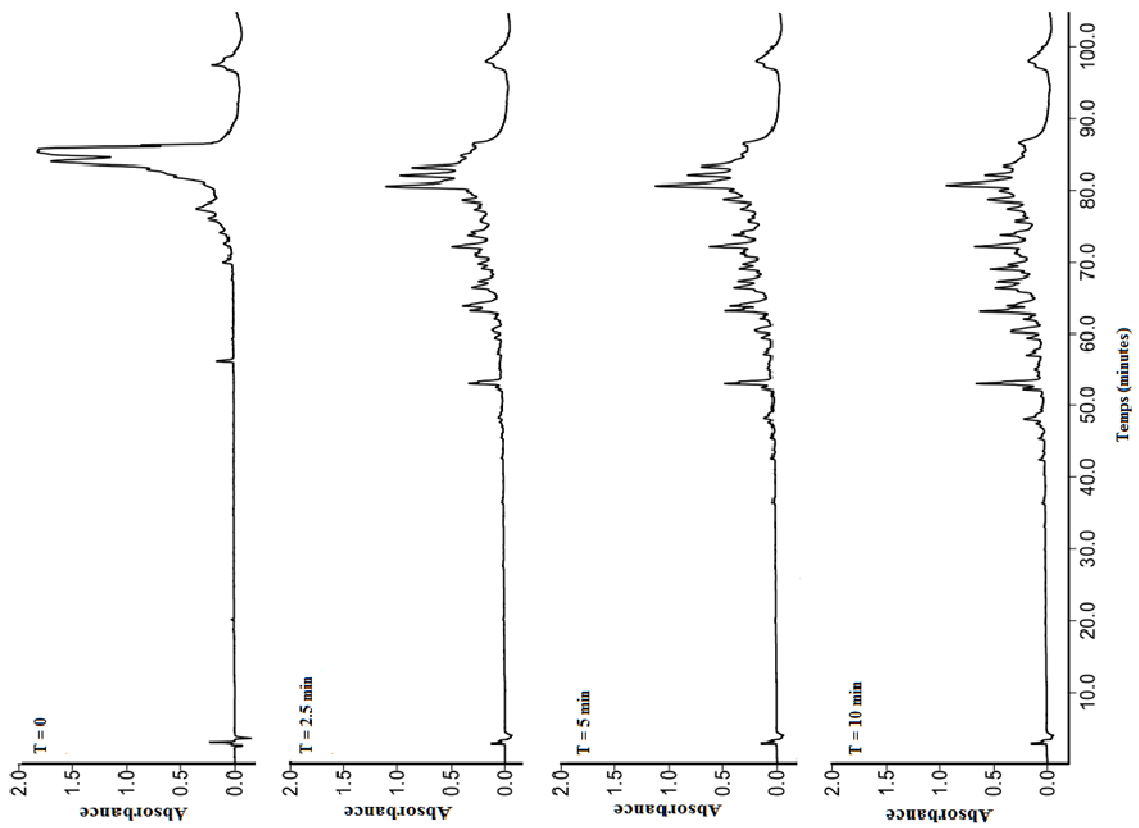
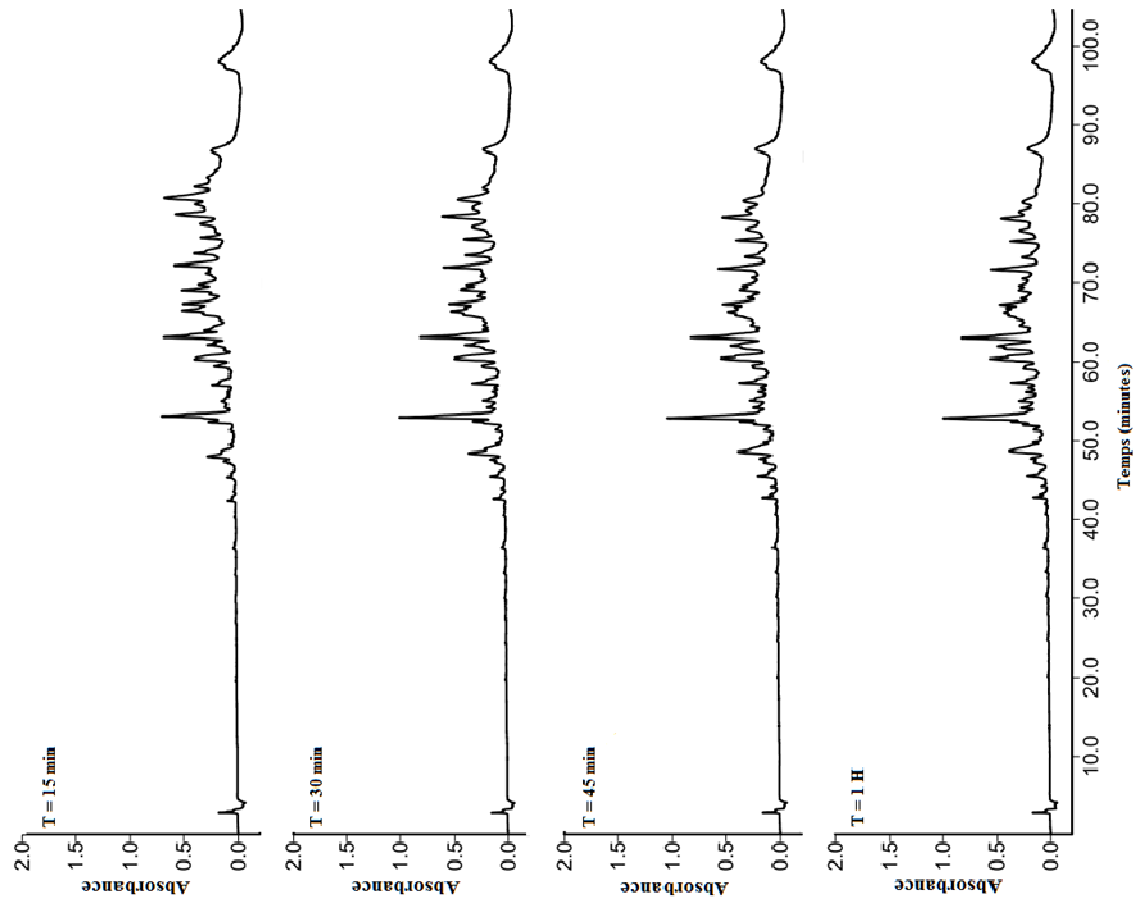
Comme indiqué ci-dessus, le mécanisme réactionnel, pour le même couple enzyme-substrat, peut passer du mécanisme « one by one » au mécanisme « zipper » en modifiant la structure native de la protéine par l'emploi d'agents dissociants et dont le choix dépend de la nature des interactions intervenants dans la structure tertiaire de la protéine (l'urée pour les liaisons hydrogènes, SDS pour les interactions hydrophobes...). Cela permet d'orienter l'hydrolyse dans un sens favorable pour l'obtention de peptides d'intérêt qui peuvent être des peptides intermédiaires ou bien des produits finaux. Le mécanisme zipper est favorable pour l'obtention de peptides intermédiaires alors que le mécanisme « one by one » donne directement des peptides finaux. En outre la production d'un peptide donné peut être plus importante par un mécanisme par rapport à l'autre (Choisnard et coll., 2002 ; Daoud et coll., 2005).

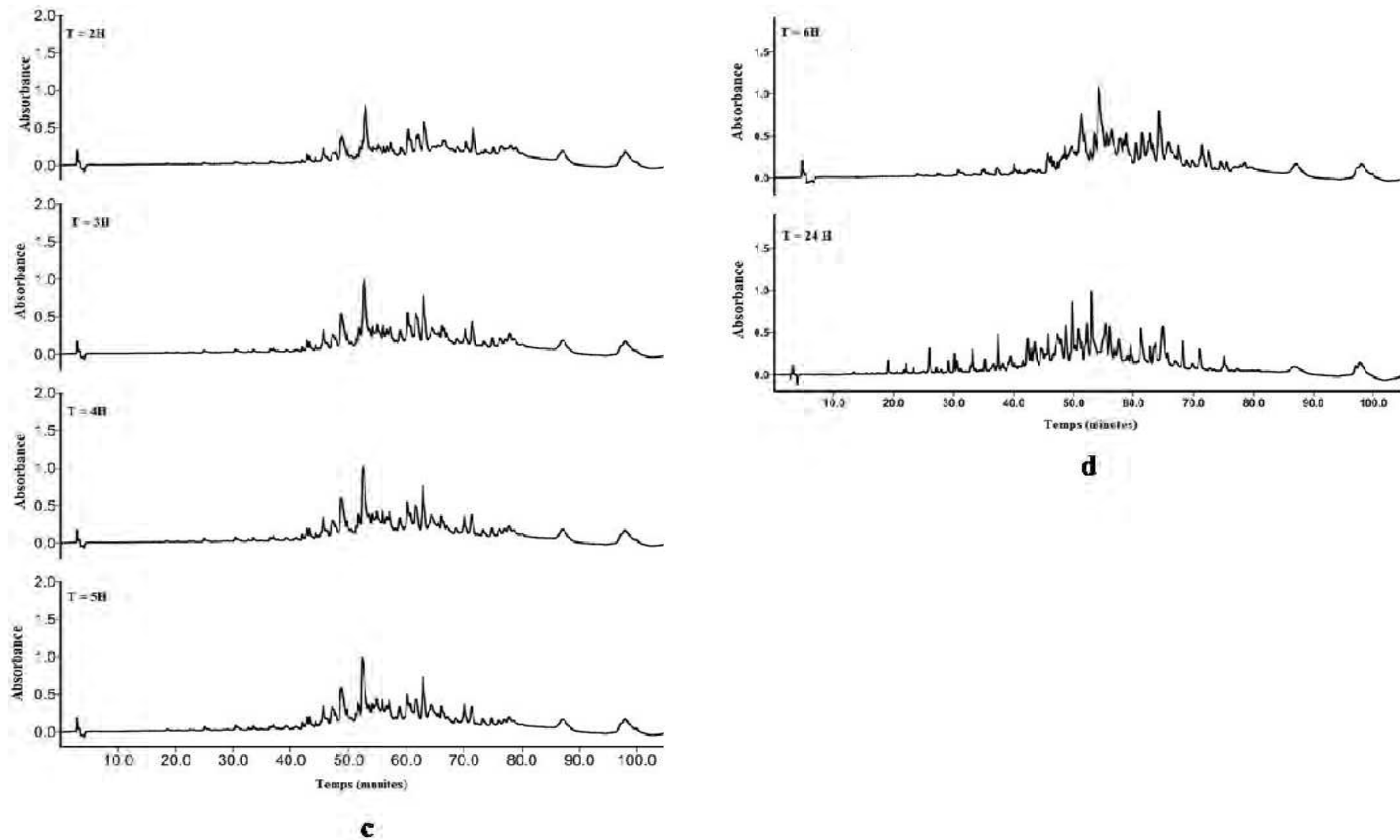
Par ailleurs, l'évolution de l'hydrolyse pepsique de la caséine a été suivie par mesure du degré d'hydrolyse (DH) par la méthode OPA et qui exprime le taux de liaisons peptidiques rompues par rapport au nombre total des liaisons. La figure 4 montre l'évolution du DH au bout de 6H d'hydrolyse.

Le suivie de l'évolution du DH renseigne sur la vitesse avec laquelle l'enzyme dégrade le substrat. En effet, le DH passe de 1,64 % à 2,5 min d'hydrolyse à 5,79 % à 6H d'hydrolyse. Toutefois nous avons noté une vitesse moyenne d'hydrolyse (exprimée par la variation du DH en fonction du temps) de 0,15 % par minute durant la première heure d'hydrolyse. A partir de ce point, la vitesse d'hydrolyse tend à s'annuler et le DH atteint un taux maximal qui tend vers une valeur constante. En effet, jusqu'à 6 H d'hydrolyse, la mesure du DH donne des valeurs très rapprochées avec des différences non significatives (valeurs comprises dans le même intervalle d'écart type).

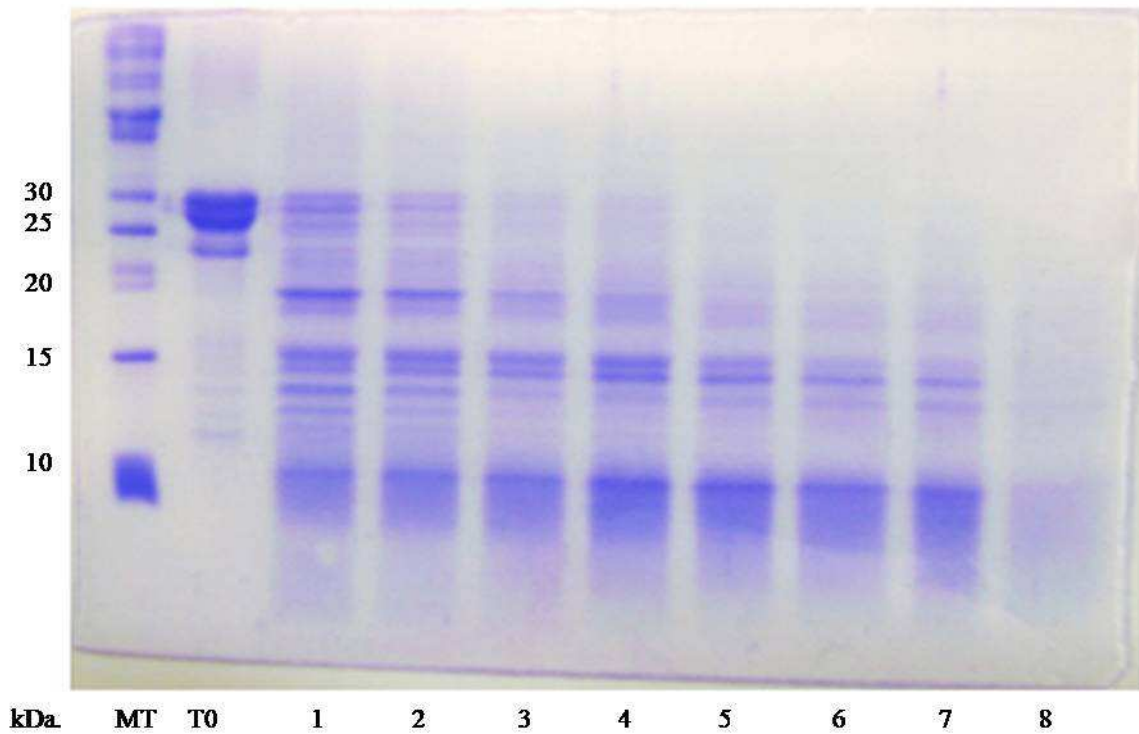


**Figure 1.** Profils HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C, (L'intervalle de temps de l'éluion du substrat est délimité par une accolade).

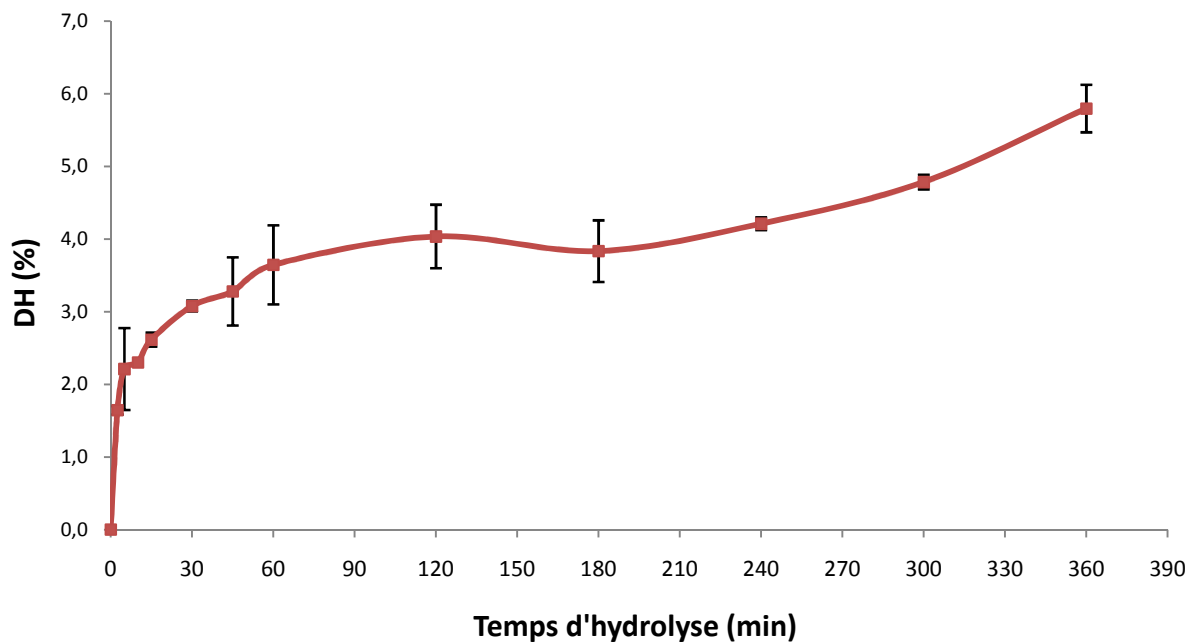




**Figure 2.** Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100.



**Figure 3.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine bovine (E/S =1/100) (MT : marqueur de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 :1 H, 8 :2 H).



**Figure 4.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la pepsine (E/S=1/100).

### I.1.2. Hydrolyse trypsique

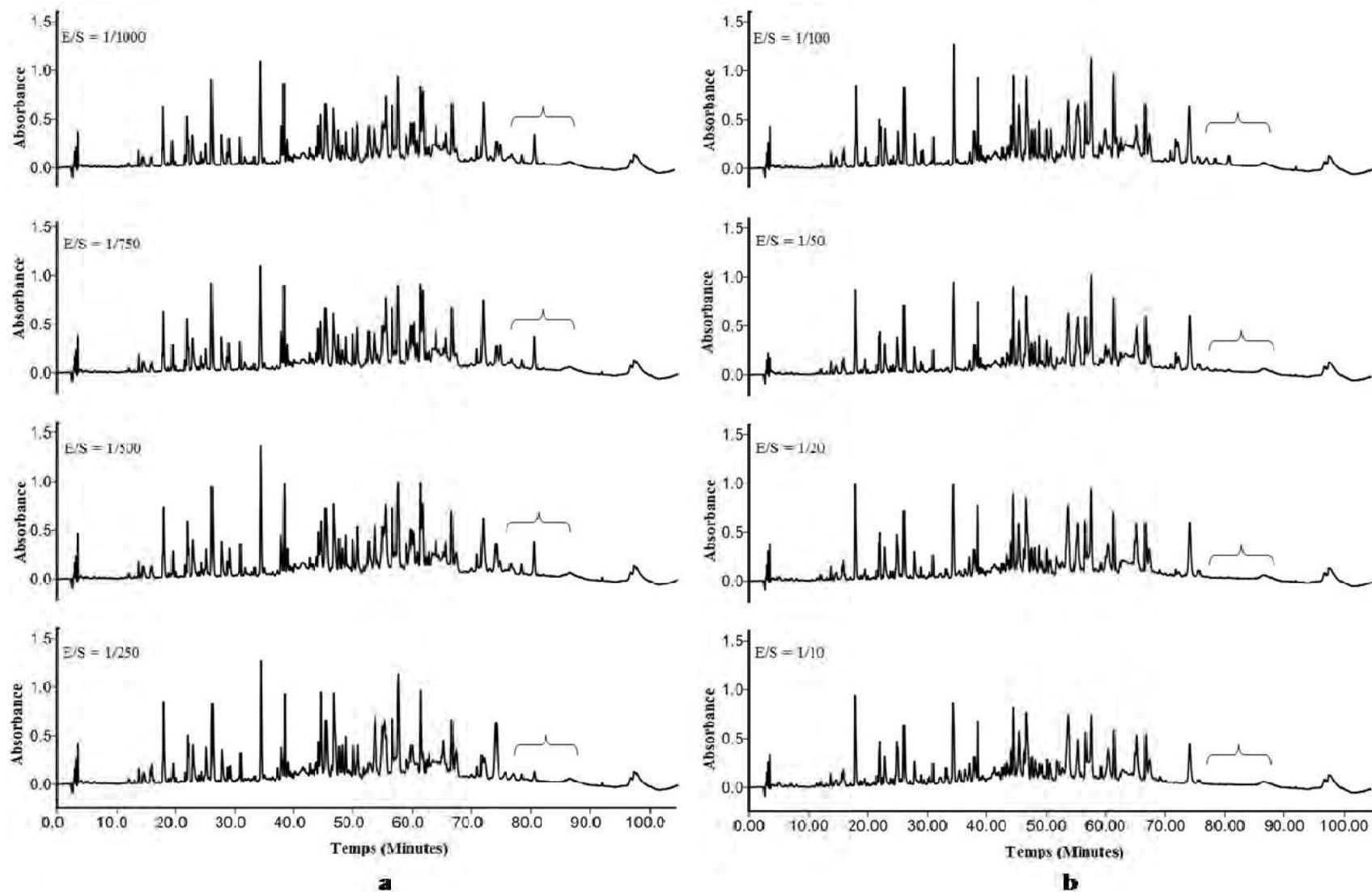
L'hydrolyse trypsique de la caséine bovine a été effectuée à pH 7,8 (tampon phosphate, 50 mM), à 37°C et à 1/100 de rapport E/S. Ce dernier est choisi par examen des profils RP-HPLC des hydrolysats de 24H obtenus pour différents rapports E/S (figure 5).

Une cinétique d'hydrolyse trypsique est réalisée en effectuant des prélèvements à des temps réguliers. Les hydrolysats obtenus sont analysés en RP-HPLC. La figure 6 montre les chromatogrammes de l'hydrolyse trypsique de la caséine bovine en fonction du temps d'hydrolyse.

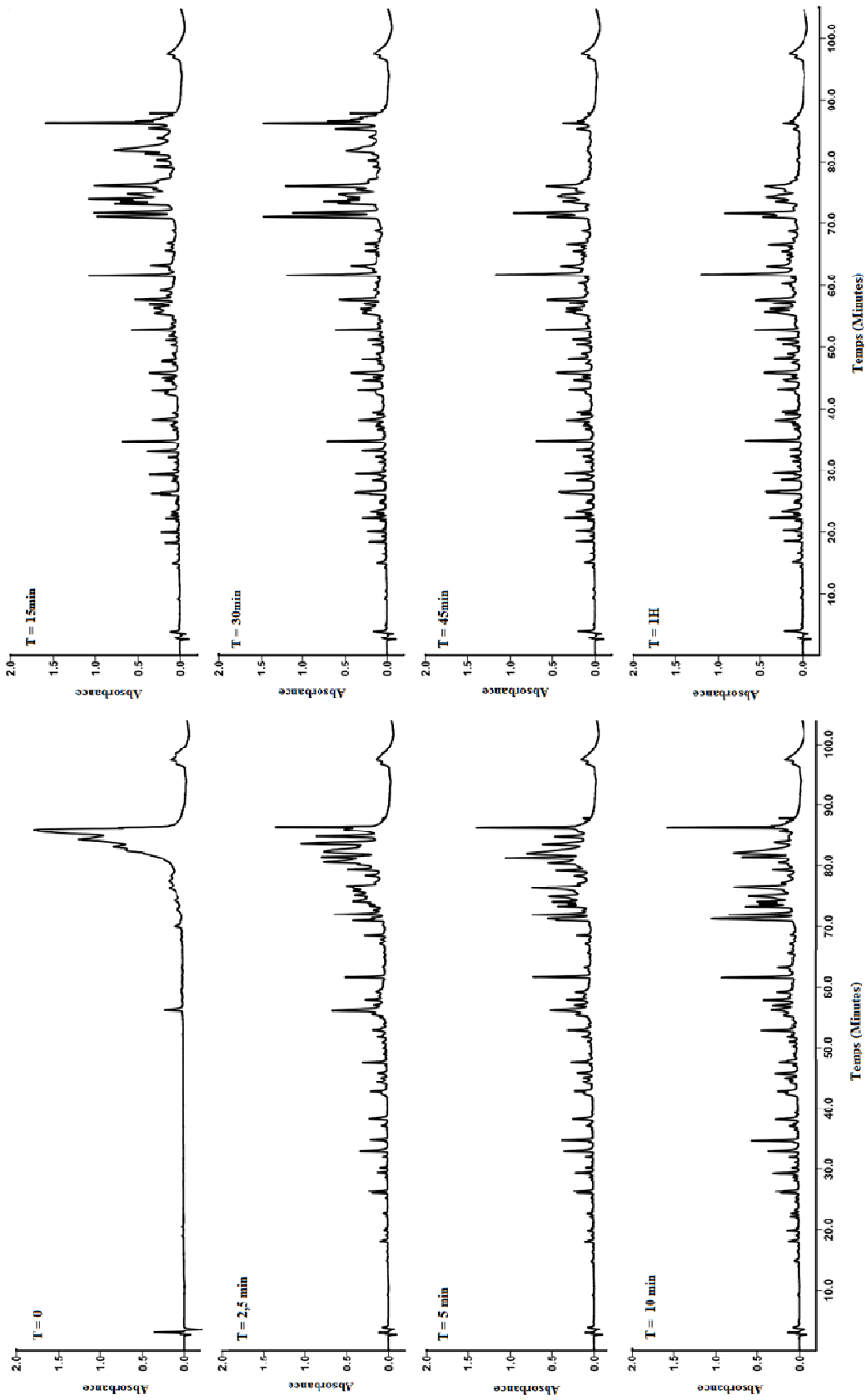
Contrairement à ce qui a été observé pour l'hydrolyse pepsique de la caséine bovine, l'action de la trypsine se caractérise par l'apparition de peptides finaux (temps d'élution entre 10 et 40 min) dès les premiers temps d'hydrolyse (2,5 min). Ces peptides sont reconnus comme des produits finaux du fait que leurs fractions d'élution ne disparaissent pas durant l'hydrolyse mais, plutôt, les pics correspondant augmentent. Ces peptides apparaissent en présence également de peptides intermédiaires et d'une quantité résiduelle du substrat.

Cependant, il semble qu'une fraction caséinique persiste à l'action de la trypsine (de 75 min de temps d'élution). Cette fraction est observée, également après 24 H d'hydrolyse pour des rapports E/S plus grands (1/250, 1/750 1/1000) (figure 5). Cette fraction est, également, observée sur le profil électrophorétique sur SDS-PAGE de la cinétique d'hydrolyse (figure 7).

Sous l'action de la trypsine, le DH passe de 2,06 % à 2,5 min d'hydrolyse à 8,27 % à 6 H d'hydrolyse (figure 8) avec une vitesse moyenne (exprimée par la variation du DH en fonction du temps) de 0,22 % par minute durant les 30 premières minutes d'hydrolyse. Par la suite la vitesse moyenne diminue pour atteindre une valeur de 0,022 %/min entre 30 min et 2 H d'hydrolyse. A partir de ce point, la vitesse d'hydrolyse tend à s'annuler (les valeurs du DH notées jusqu'à 6 H sont dans le même intervalle d'écart type).



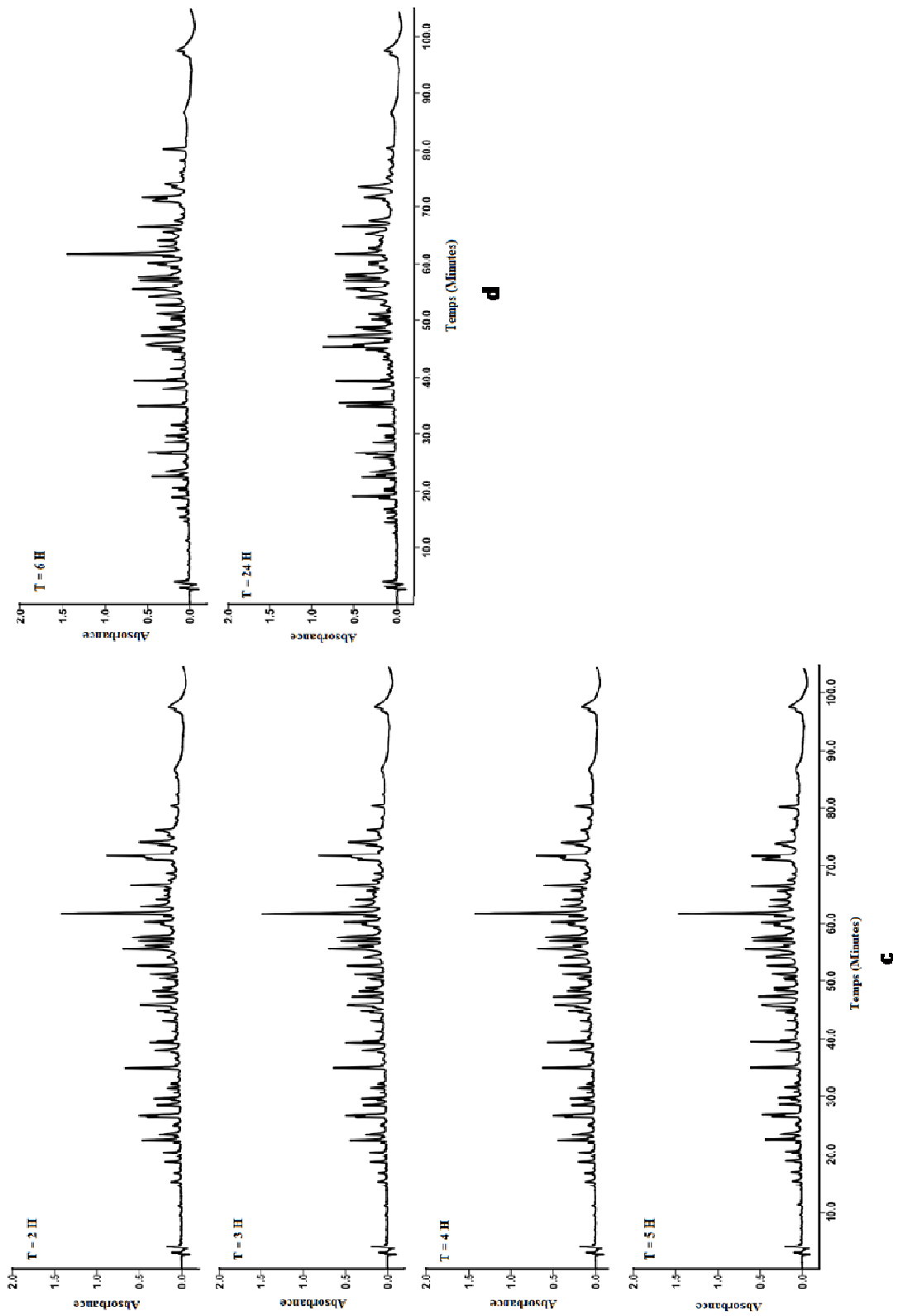
**Figure 5.** Profil HPLC (**a** et **b**) de l'hydrolyse des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine à différents rapports (E/S) par la trypsine à pH 7,8 et à 37°C (L'intervalle de temps de l'éluion du substrat est délimité par une accolade).



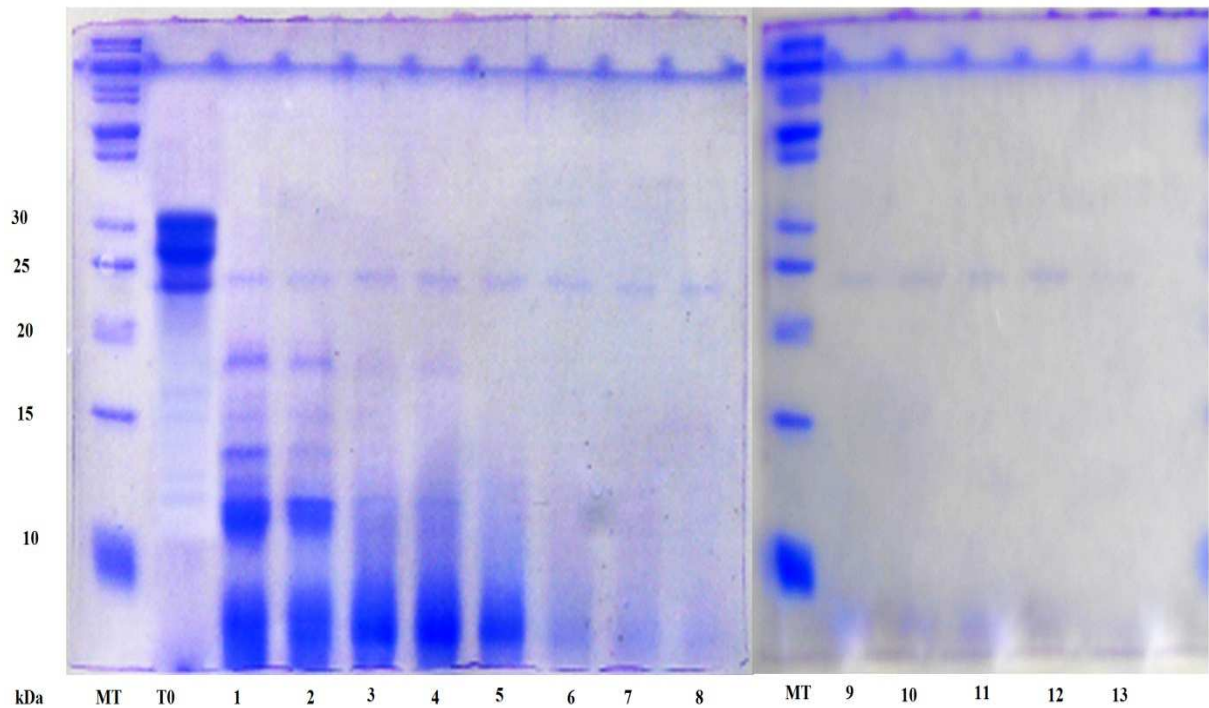
**b**

**a**

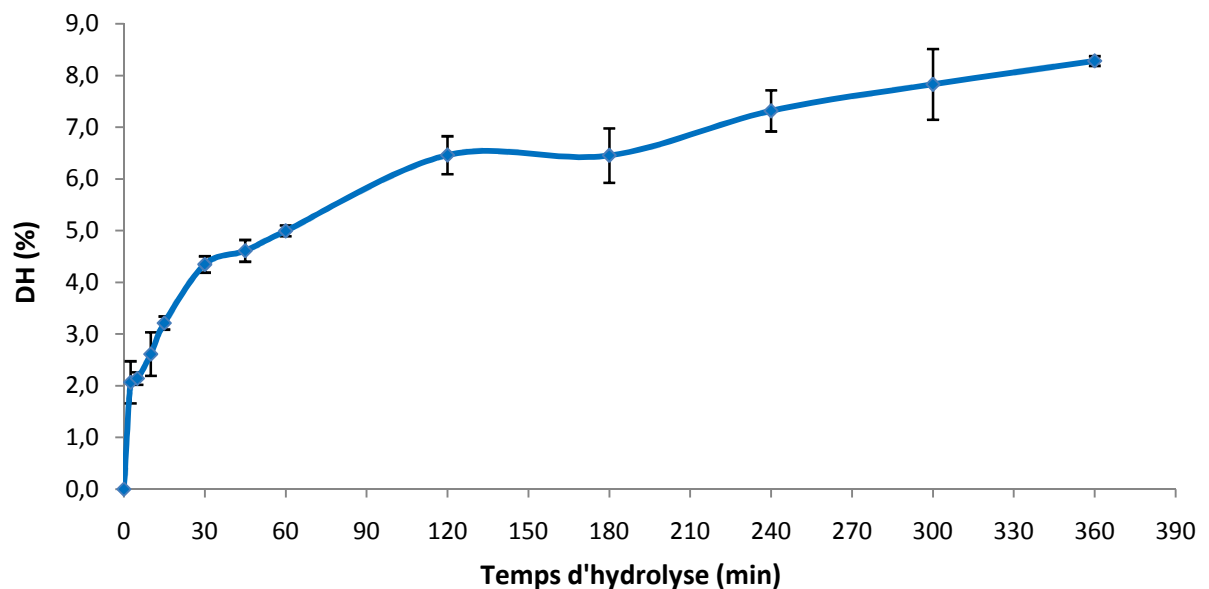




**Figure 6.** Profil HPLC à 215 nm (**a**, **b**, **c** et **d**) de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 7,8 et à 37°C, E/S = 1/100.



**Figure 7.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine bovine (E/S=1/100), (MT : marqueur de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 : 1 H, 8 : 2 H, 9 : 3 H, 10 : 4 H, 11 : 5 H, 12 : 6H, 13 : 24 H).



**Figure 8.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la trypsine (E/S = 1/100).

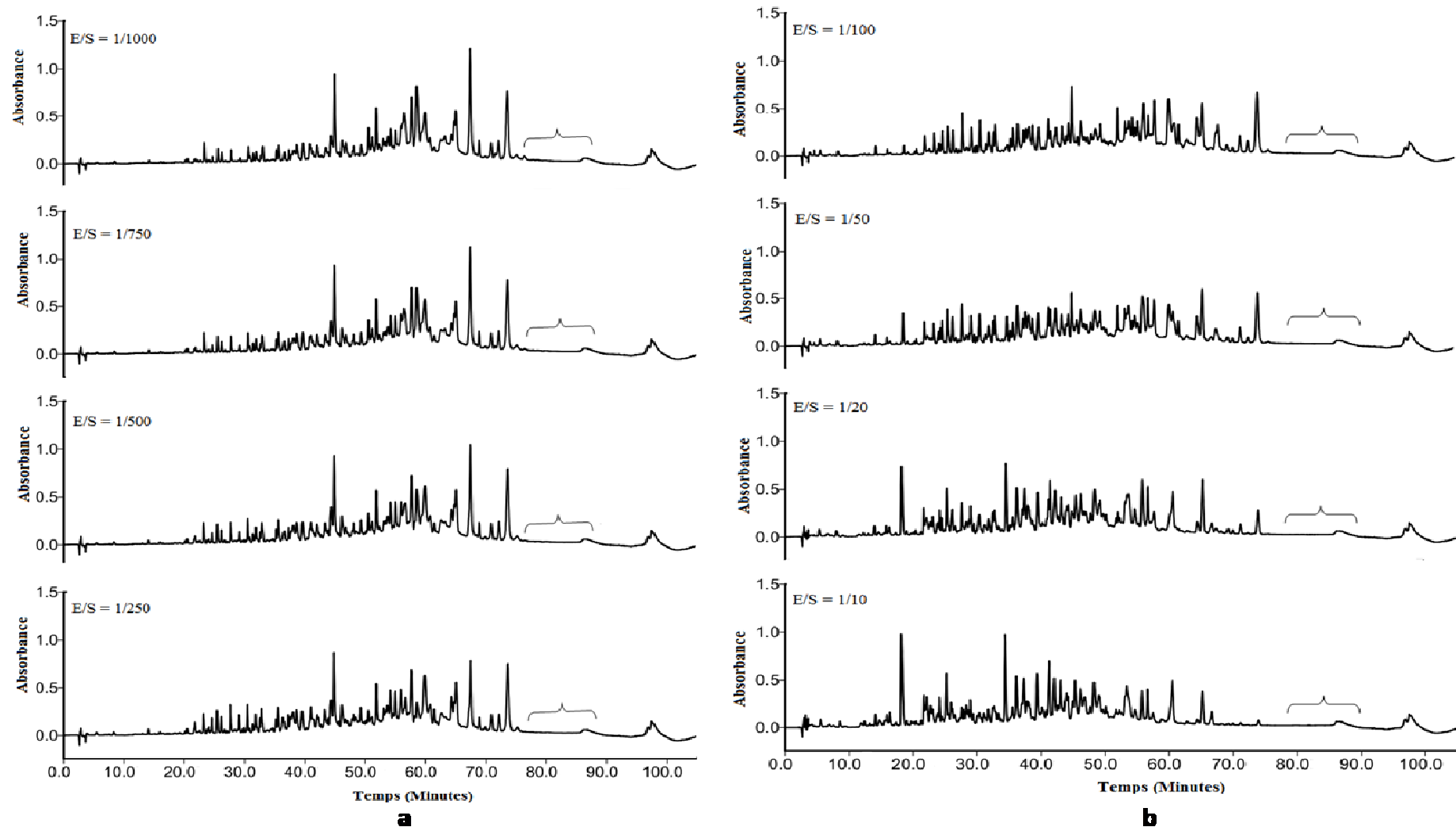
### I.1.3. Hydrolyse chymotrypsique

L'hydrolyse chymotrypsique de la caséine bovine est réalisée dans les mêmes conditions indiquées pour la trypsine. L'examen des profils HPLC des hydrolysats de 24 heures, obtenus à différents rapports (E/S) indique l'absence de quantité résiduelle du substrat pour les différents rapports E/S testés (figure 9). Ainsi, le rapport maintenu était de E/S = 1/250 pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse.

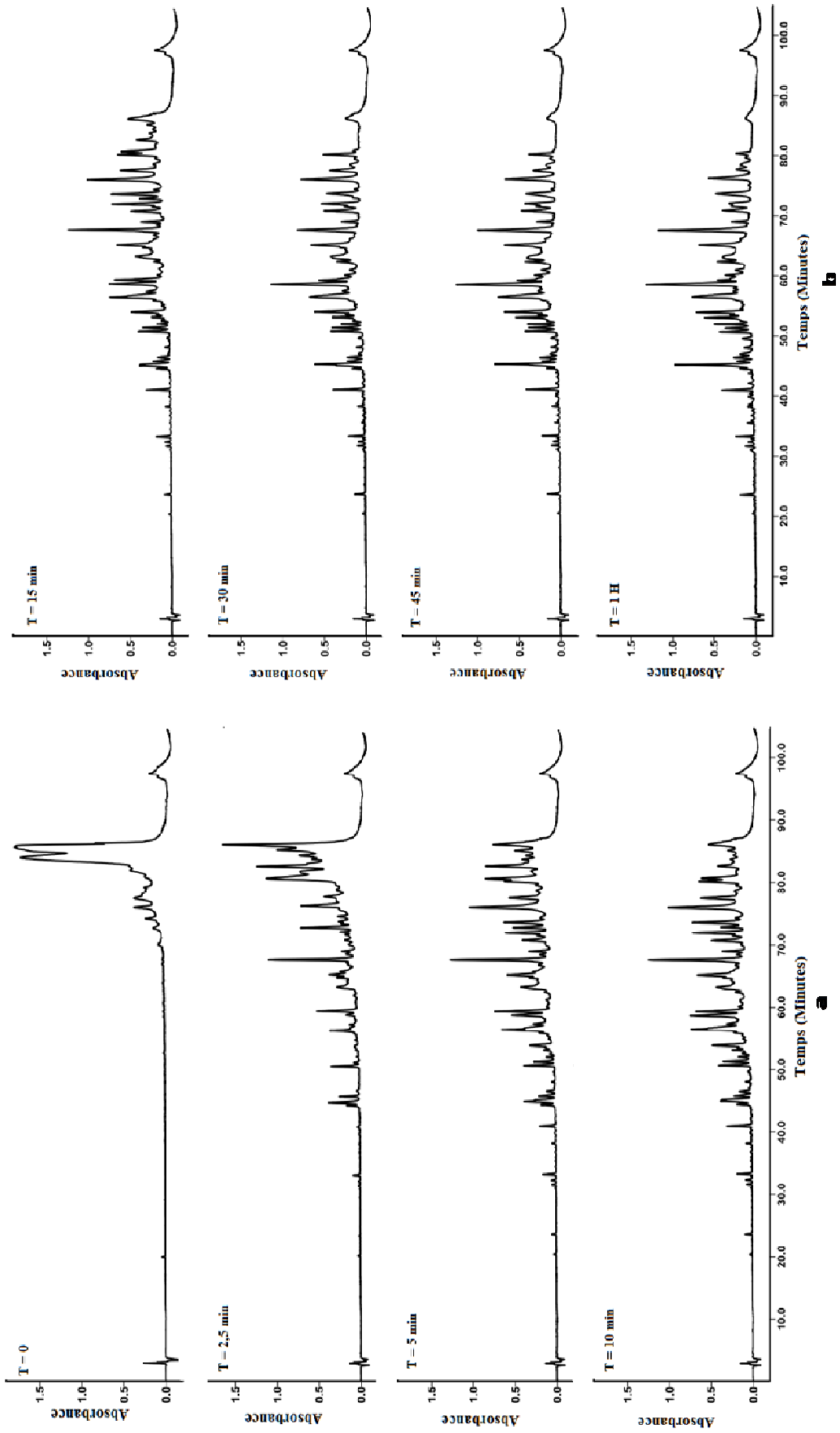
La figure 10 montre les profils HPLC des protéolysats chymotrypsiques de la caséine bovine obtenus à différents intervalles de temps d'hydrolyse. L'action de la chymotrypsine sur les caséines bovines se traduit par une dégradation progressive du substrat en peptides intermédiaires qui donnent à leur tour des peptides finaux (temps d'élution entre 20 min et 45min). Cependant, ces peptides apparaissent en faible quantité durant les premiers temps d'hydrolyse (de 2,5 min à 30 min d'hydrolyse), contrairement à ce qui a été observé pour la trypsine. Mais leurs concentrations augmentent au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse. La dégradation progressive de la caséine bovine par la chymotrypsine est observée, également, sur les profils électrophorétiques sur SDS-PAGE obtenus pour la même cinétique (figure 11).

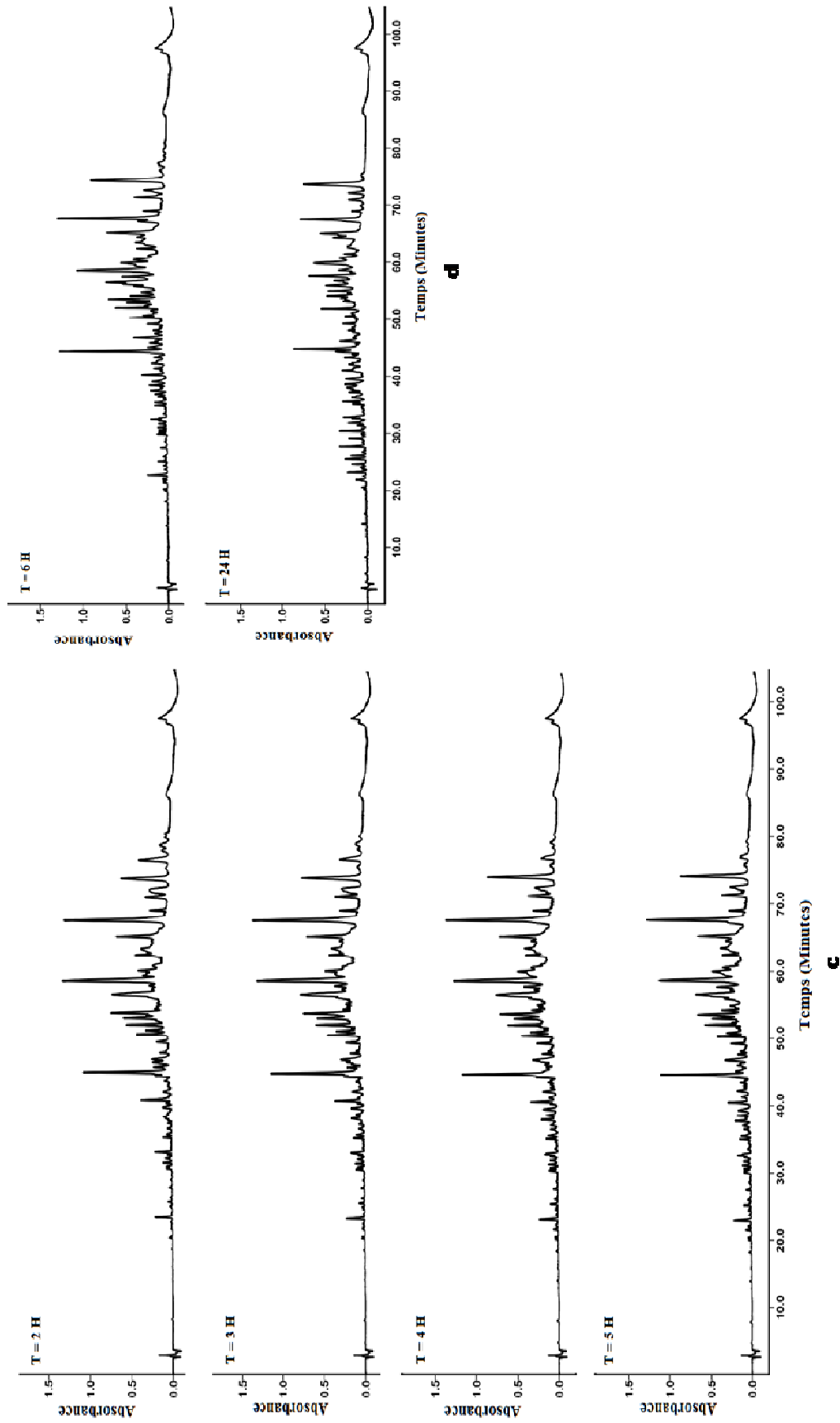
Le DH de la caséine bovine sous l'action de la chymotrypsine passe de 1,19 % à 2,5 min d'hydrolyse à 7,03 % à 6 H d'hydrolyse (figure 12). L'hydrolyse se produit à une vitesse moyenne de 0,18% par minute durant les 30 premières minutes d'hydrolyse. Par la suite la vitesse diminue pour atteindre une valeur de 0,021%/ min entre 30 min d'hydrolyse et 2 H d'hydrolyse. A partir de ce point, la différence dans le DH est considérée comme non significative du fait que les valeurs notées sont dans le même intervalle d'écart type.

En comparant l'action des trois enzymes étudiées sur les caséines bovines, en fonction de la vitesse d'apparition des peptides finaux, nous pouvons constater que c'est la pepsine qui montre la vitesse d'hydrolyse la plus faible (apparition de peptides finaux de temps d'élution inférieur à 40 min à partir de 3 H d'hydrolyse) suivie par la chymotrypsine (temps d'élution inférieur à 40 min à partir de 1 H d'hydrolyse). Alors que la trypsine a montré la vitesse la plus élevée (inférieur à 40 min des peptides finaux, dès les premiers temps d'hydrolyse ; 2,5 min). Toutefois, il semble que l'action de la chymotrypsine et de trypsine sur la caséine bovine suit également un mécanisme intermédiaire entre le mécanisme « one by one » et zipper, (Choisnard et coll., 2002 ; Srividhya et Schnell, 2006).

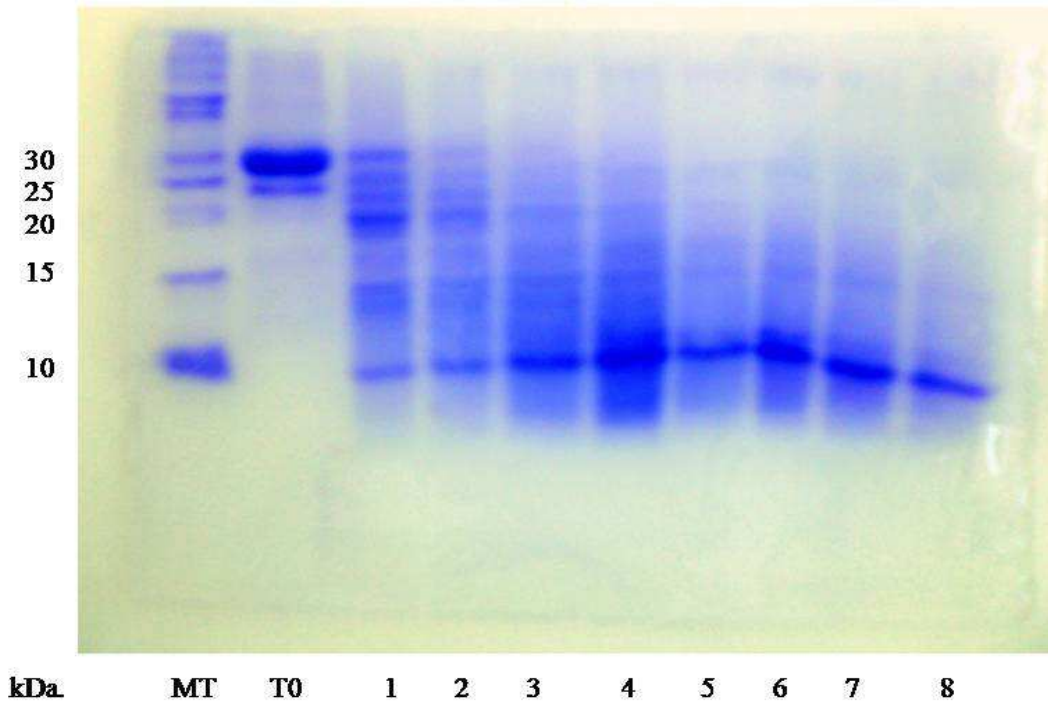


**Figure 9.** Profil HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine bovine à différents rapports (E/S) par la chymotrypsine à pH 7,8 et à 37°C (L'intervalle de temps de l'élué du substrat est délimité par une accolade).

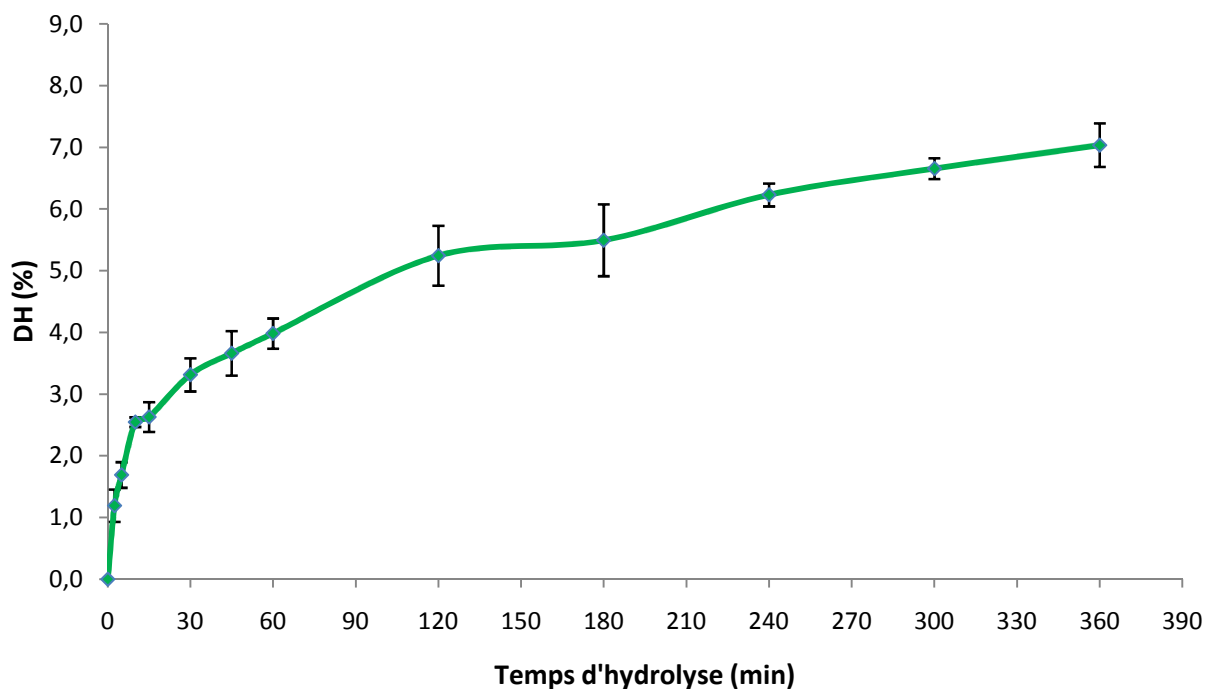




**Figure 10.** Profil HPLC à 215 nm (a, b, c et d) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine bovine à 5 % (p/v), à pH 7,8 et à 37°C, E/S = 1/250.



**Figure 11.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine bovine ( $E/S=1/250$ ) (1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 : 1 H, 8 : 2 H).



**Figure 12.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine bovine sous l'action de la chymotrypsine ( $E/S = 1/250$ ).

## I.2. Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne dans les hydrolysats de caséines bovines

L'activité antimicrobienne est recherchée dans les différents hydrolysats de caséine bovine préparés sous l'action des trois protéases employées. L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les hydrolysats sont testés contre 5 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* **ATCC 6633**, *Listeria innocua* **LMG 11387**, *Listeria monocytogenes* **ATCC 3512**, *Staphylococcus aureus* **CIP 4.83**, *Bacillus cereus* et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* **JM 109**, *Escherichia coli* **DH5 $\alpha$**  et *Escherichia coli* **CIP 54127**.

L'activité antimicrobienne a été observée pour les hydrolysats pepsiques de la caséine bovine. En effet, En premier lieu, l'activité a été recherchée dans les hydrolysats obtenus à différentes intervalles de temps d'hydrolyse pour les rapports E/S maintenus pour chaque enzyme. Cependant, les hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques de la caséine bovine n'ont montré aucune activité sur les différentes souches testées. De ce fait, d'autres cinétiques d'hydrolyse pour les différents rapports E/S ont été réalisés pour ces deux protéases (E/S de 1/1000, 1/750, 1/250, 1/100, 1/50, 1/20 à 1/10, p/p). Les hydrolysats prélevés à différentes intervalles de temps sont testés contre les souches cibles. Cependant, aucune activité antimicrobienne n'a pu être démontrée. Ainsi, sous les conditions d'hydrolyses imposées, seule l'action de la pepsine a pu générer des peptides antimicrobiens.

En effet, plusieurs études indiquent la possibilité de générer des peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de caséines bovines (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann et coll., 2006). Des zones d'inhibition nettes sont observées pour les hydrolysats obtenus à partir de 15 min d'hydrolyses. Ainsi, afin de pouvoir isoler les peptides actifs et ses précurseurs, l'analyse a été réalisée sur l'hydrolysat de 30 min qui a montré une activité antimicrobienne contre cinq souches testées (Figure 13). Afin de séparer les peptides actifs, l'hydrolysat correspondant à 30 min d'hydrolyse a été fractionné sur RP-HPLC en colonne C18 préparative. Les fractions de 1 min d'intervalle ont été collectées et séchées afin de rechercher l'activité antimicrobienne. Trois fractions ont montré une activité contre *L. innocua* et correspondent à des temps d'élution de 61, 66, et 69 min (Figure 14).



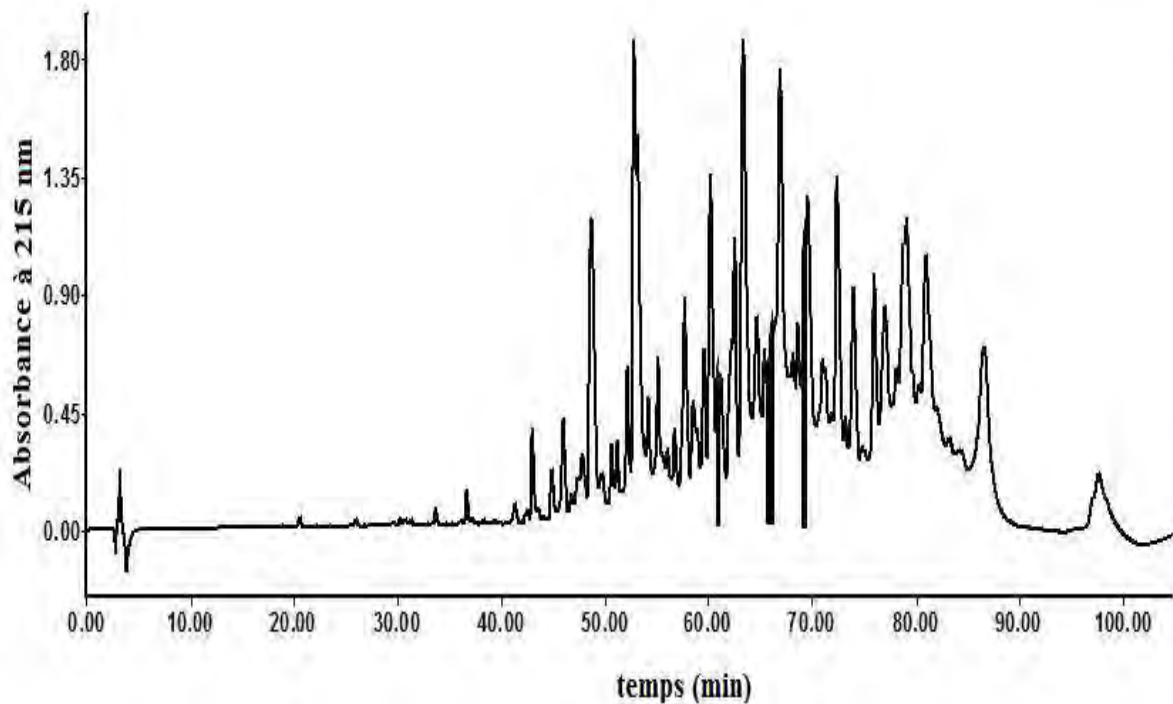
**Tableau 1.** Activité antibactérienne des hydrolysats peptiques de la caséine bovine, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide

Hydrolysats	Souches cibles						
	<i>L. innocua</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogène</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> CIP	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	LMG 11387	ATCC 6633	ATCC 3512	CIP 4.83	54127	JM109	DH5 $\alpha$
<b>T0</b>	–	–	–	–	–	–	–
<b>2.5 min</b>	–	–	–	–	–	–	–
<b>5 min</b>	–	–	–	–	–	–	–
<b>10 min</b>	–	–	–	–	+	–	–
<b>15 min</b>	+	–	+	–	+	+	–
<b>30 min</b>	+	+	+	–	+	+	–
<b>45 min</b>	+	+	+	–	+	+	–
<b>1 H</b>	+	+	+	–	+	+	+
<b>2 H</b>	+	+	+	–	+	+	+
<b>3 H</b>	+	+	+	–	+	+	+
<b>4 H</b>	+	–	+	–	+	+	+
<b>5 H</b>	+	–	+	–	+	+	+
<b>6 H</b>	+	–	+	–	+	+	+
<b>24 H</b>	+	–	+	–	+	+	+

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



**Figure 13.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche *E. coli* JM109 des hydrolysats peptiques de la caséine bovine.



**Figure 14.** Profil HPLC de l'hydrolysate de caséine bovine obtenu à 30 min d'hydrolyse pepsique, (les fractions actives sont indiquées en noire).

### **I.3. Séparation des peptides antimicrobiens à partir d'hydrolysate de la caséine bovine par précipitation sous l'effet de la force ionique et du pH**

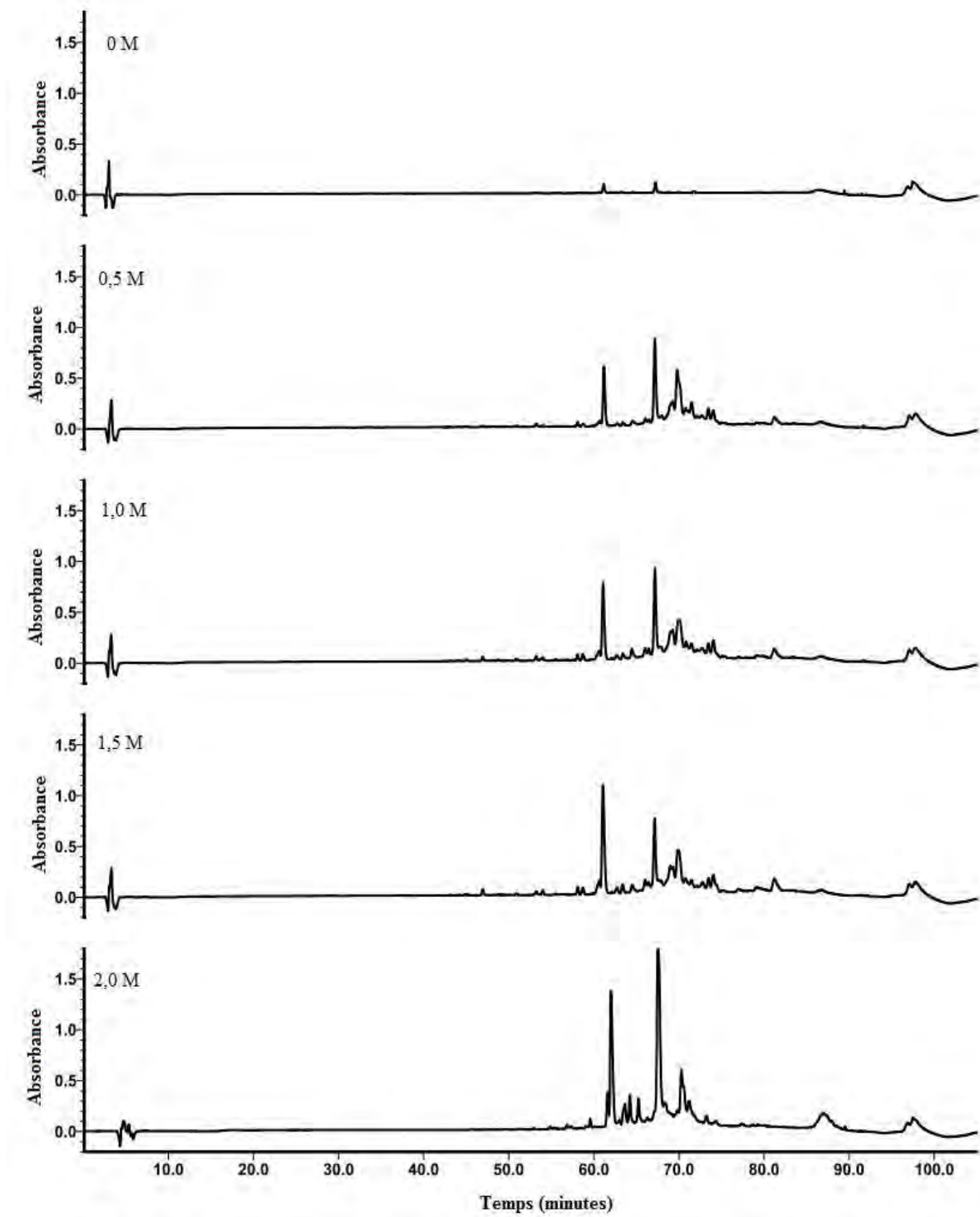
L'hydrolysate total renferme à côté des peptides actifs un grand nombre de peptides sans activité antimicrobienne. Ainsi, dans le but de séparer les peptides actifs de cet hydrolysate hétérogène, ces derniers sont précipités sous l'effet de la force ionique par addition de sel (NaCl) tout en maintenant le pH de l'hydrolysate traité dans la zone de neutralité. Cependant, sous ces conditions différents peptides inactifs sont également précipités. De ce fait, une autre étape de resolubilisation à pH bas était nécessaire pour séparer les peptides actifs. Ces derniers sont récupérés après 1H d'agitation à 4°C par centrifugation à 10000×g. L'étude a été réalisée pour des taux en sel allant de 0,5 à 2 M. Les profils HPLC des préparations obtenues sont donnés par la figure 15. Les profils chromatographiques des solutions obtenues à différents taux de sel indiquent la présence de pics montrant des temps d'élution qui coïncident avec ceux des fractions actives déjà séparés et collectés sur l'hydrolysate total entre 60 et 69 min d'élution. Ces profils montrent la présence de trois fractions majoritaires avec des temps de d'élution de 61, 66 et 69 min respectivement. Toutefois, le taux de ces fractions varie en

fonction de la force ionique appliquée notamment pour les fractions de 66 min et 69 min de temps d'éluion. Afin d'identifier les peptides précipités, les différentes fractions d'un extrait obtenu à 2M de sel (numérotées de 1 à 18 sur le chromatogramme, figure 16) ont été collectées par RP-HPLC sur une C<sub>18</sub> préparative. L'activité antimicrobienne des fractions collectées a été déterminée en premier lieu sur *L. innocua*. Par la suite d'autres souches ont été testées sur les fractions qui ont montré des zones d'inhibition claires sur *L. innocua*. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2. Toutes les fractions collectées ont été par la suite analysées par spectrométrie de masse.

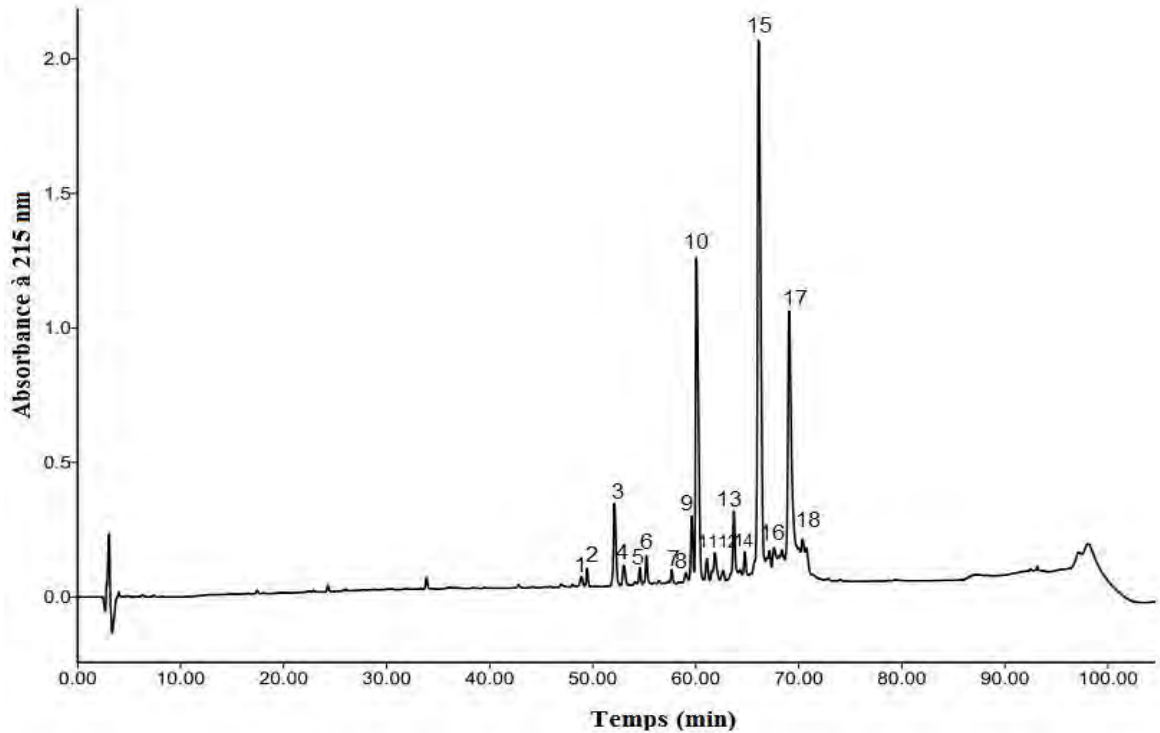
La précipitation des peptides présents dans ces fractions est influencée également par le pH. En comparant les profils chromatographiques obtenus à différents pH (5, 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5) de précipitation pour un taux de sel maintenu à 2 M, nous pouvons remarquer l'apparition progressive de ces derniers au fur et à mesure de l'augmentation du pH (Figure 17).

L'activité antimicrobienne des solutions obtenus est déterminée sur deux souches ; *L. innocua* et *E.coli JM109*. L'activité n'a pas été observée pour les solutions obtenues à pH 3,5 et 4,5. Alors qu'elle semble apparaitre progressivement à partir du pH 5,5 à pH 7,5 (Figure 18). Cela indique que la précipitation des peptides actifs se produit sous l'effet de la force ionique et à pH neutre alors qu'à des pH plus bas se sont d'autres peptides non actifs qui précipitent.

En outre, la récupération des peptides actifs après précipitation, selon la méthode appliquée, se fait par abaissement du pH à des valeurs inférieures à 2,0. Cela confirme que ces derniers sont plus solubles à pH bas qu'à des pH proches de la neutralité. Notamment, pour la fraction de 61 min et de 66 min d'éluion pour lesquelles nous observons une apparition progressive des fractions correspondantes, sur les profils HPLC, au fur et à mesure de l'augmentation du pH de précipitation. Cette apparition est accompagnée par une détection de l'activité antimicrobienne qui se traduit par des zones d'inhibition plus nette pour ces préparations (figure 18). Par ailleurs, que la solubilité de ces peptides antimicrobiens à des valeurs de pH bas est évoquée par Mc Cann et coll. (2005). Ces derniers indiquent que la centrifugation de l'hydrolysate brut de caséines à pH 3,0 permet d'obtenir une solution plus claire tout en maintenant l'activité antimicrobienne.



**Figure 15.** Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différentes forces ioniques exprimé en molarité de NaCl ajouté à l'hydrolysate, pH maintenu à 7,5.

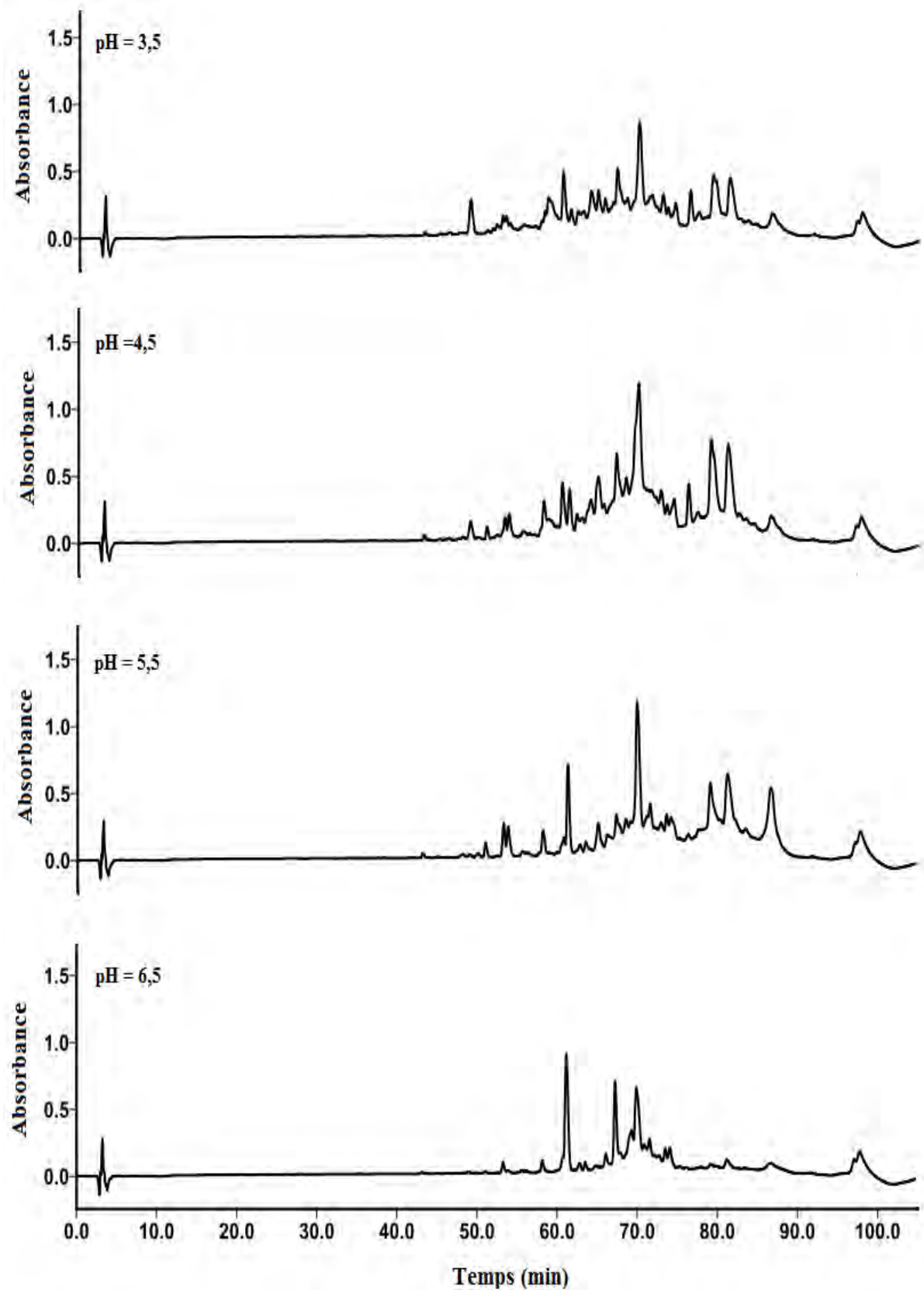


**Figure 16.** Profil HPLC de l'extrait peptidique issu de l'hydrolysat pepsique à 30min de la caséine bovine par précipitation à 2M de NaCl et à pH 7,5.

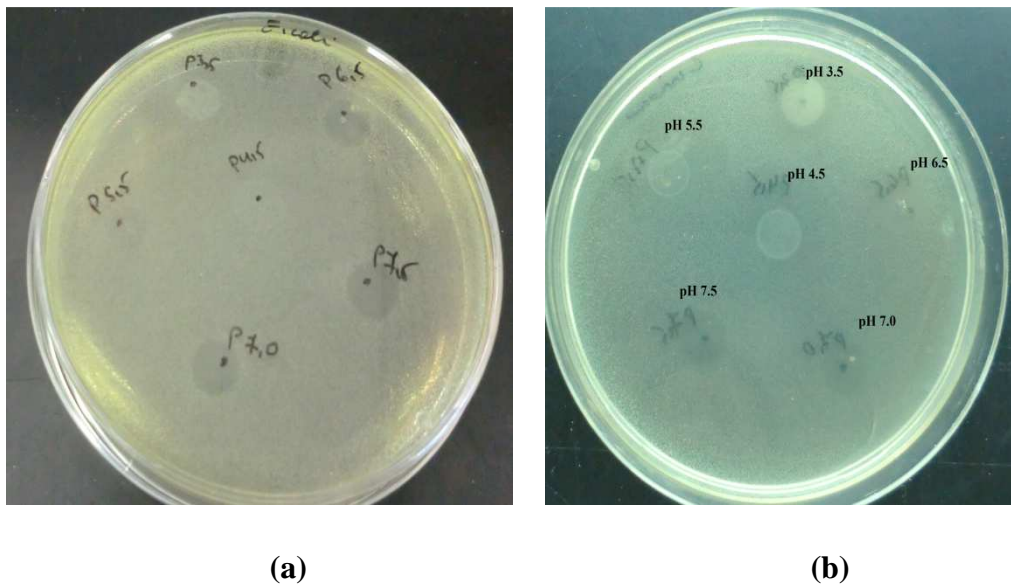
**Tableau 2.** Activité antibactérienne des fractions peptidiques collectées sur HPLC à partir de l'extrait peptidique

Fraction <sup>a</sup>	Diamètre d'inhibition (mm)			
	<i>L. innocua</i> LMG1138	<i>E.coli</i> JM109	<i>S.aureus</i> CIP 4,83	<i>B.subtilis</i> ATCC6633
<b>Fraction 4</b>	5	—	—	—
<b>Fraction 10</b>	5	5	—	—
<b>Fraction 13</b>	8	8	—	7
<b>Fraction 14</b>	10	8	—	7
<b>Fraction 15</b>	11	11	8	11
<b>Fraction 17</b>	11	11	8	11

Note : <sup>a</sup> fait référence aux fractions du profil HPLC dans la Figure. 17, — : absence de zone d'inhibition.



**Figure 17.** Profil HPLC des peptides antimicrobiens précipités à différents pH de l'hydrolysate pepsique de la caséine bovine.



**Figure 18.** Photos montrant les zones d'inhibition observées sur *E.coli* **JM109** (a) et *L. innocua* (b) des solutions obtenues par précipitation à différents pH de l'hydrolysate pepsique de la caséine bovine.

#### **I.4. Identification et caractérisation des peptides actifs issus de la caséine bovine par spectrométrie de masse**

Les fractions peptidiques collectées sur l'extrait peptidique obtenu par précipitation ont été analysées en LC/MS et en MALDI-TOF. Les résultats obtenus, indiquent la présence de plusieurs peptides dans chaque fraction, excepté la fraction 15 qui contenait un seul peptide. Ainsi, ces fractions ont subi une purification supplémentaire sur RP-HPLC. Les sous fractions obtenues sont testées à nouveau afin d'identifier celles responsables de l'activité antimicrobienne et analysées en LC/MS et en MALDI-TOF.

L'identification des peptides est réalisée en comparant les masses obtenues en spectrométrie de masse à celles des peptides théoriquement générés sous l'action de la pepsine sur les différentes fractions de la caséine bovine. Cela est effectué en traitant les données sur le serveur **ExPASy** (de l'anglais Expert Protein Analysis System) de l'Institut suisse de bioinformatique (**SIB**) ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)). Ce serveur donne accès à des bases de données scientifiques et des logiciels dans les différents domaines des sciences de la vie.

La recherche a été réalisée sur les différentes fractions de la caséine bovine en précisant les conditions de l'hydrolyse ( $\text{pH} > 2,5$ ), le type de protéase utilisée (pepsine A) et que les masses traitées sont des mono-isotopiques. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 3.

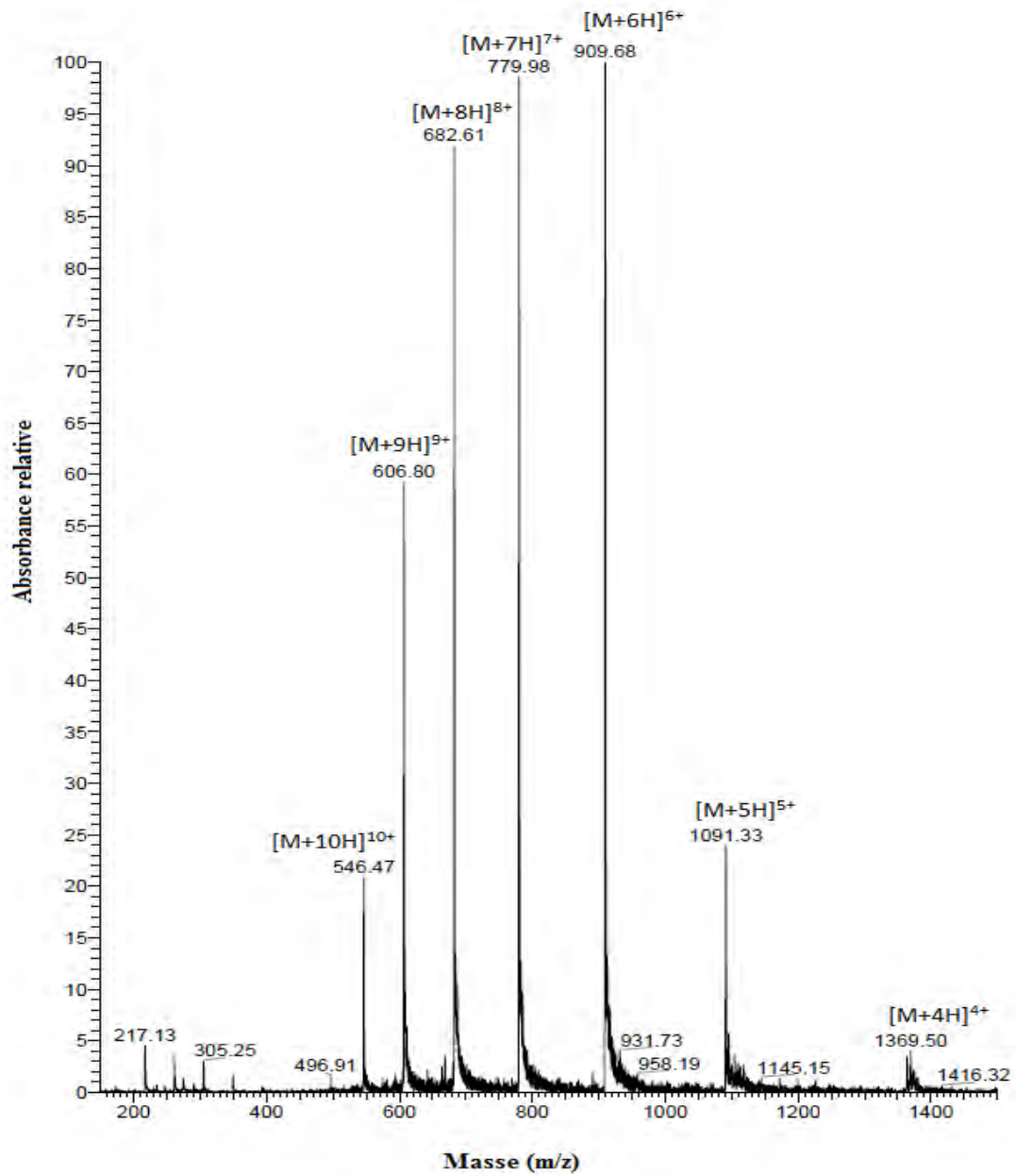
L'ensemble des peptides actifs identifiés correspondent principalement à des fragments générés de l'hydrolyse de la caséine- $\alpha_{s2}$  et de la caséine- $\alpha_{s1}$ . L'analyse de masse en LC/MS indique que la fraction 15 est pure et renferme un seul peptide de masse moléculaire égale à 5254 Da (figure 19). La pureté de cette fraction est confirmée par l'analyse en MALDI-TOF (Figure 20 E). Ce peptide est identifié comme étant le fragment  $\alpha_{s2}$  (164-207).

La fraction 4 renferme deux fragments majoritaires de masse moléculaire égale à 2012 et 2348 Da (Figure 20 A). Le premier correspond au peptide  $\alpha_{s2}$  (164-179) reporté par Recio et Visser (1999). Le second correspond au résidu  $\alpha_{s2}$ (148-166). L'activité antimicrobienne de la fraction 10-1 est due à la présence de deux peptides de masse égale à 3459 et 3115 Da., correspondant, respectivement, aux résidus (180-207) et (183-207) de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine (figure 20 B). La fraction 13-1 inclue quatre fragments majoritaires de masses ; 5430, 4921, 4463,5 et 4080,8 Da., correspondant, respectivement, aux peptides (131-174), (153-196), (99-137) de la caséine  $\alpha_{s2}$  et au peptide (20-55) de la caséine  $\alpha_{s1}$  (Figure 20 C). L'activité antimicrobienne de ces peptides n'est pas reportée dans la littérature, à notre connaissance. Trois fragments majoritaires sont présents dans la fraction 14-1, celles avec les masses égale à 5470 et 3793 correspond aux peptides  $\alpha_{s1}$ (141-147) et  $\alpha_{s1}$ (161-195) alors que celui possédant une masse moléculaire de 3957 Da correspond au fragment  $\alpha_{s2}$ (176-207) (Figure 20 D).

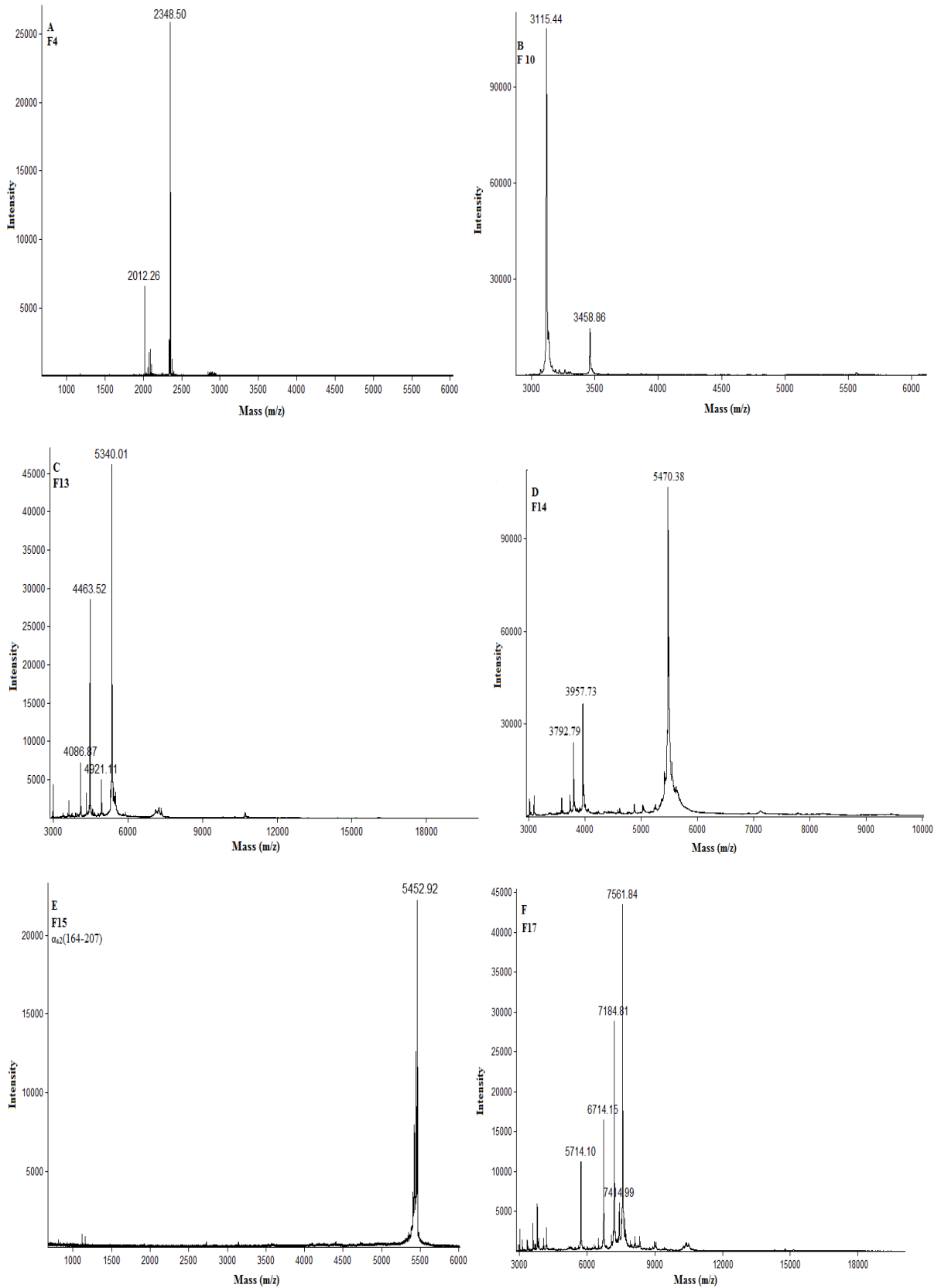
La fraction 17-1 est caractérisée par la présence de peptides présentant des poids moléculaires élevés. Ces fragments de masse égale à 7562, 7415, 7185, 5714 Da sont identifiés comme étant des peptides (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90) et (138-184) de la caséine  $\alpha_{s2}$  (figure 20 F). Le peptide de masse égale à 6714 correspond aux fragments (9-68/70-126) de la caséine  $\alpha_{s1}$ . Ces fractions ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis de bactéries à Gram-positif et Gram-négatif (Tableau 2).

Les peptides contenus dans les différentes fractions de l'extrait peptidiques sont donnés dans le tableau 3. La figure 21 montre une représentation de ces peptides sur la séquence de la caséine  $\alpha_{s1}$  et celle de la caséine  $\alpha_{s2}$ . Les spectres de masse des fractions inactives sont donnés en Annexes 2.





**Figure 19.** Spectre de masse du peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) analysé en LC/MS, (ESI/Q).



**Figure 20.** Spectres de masse des fractions 4, 10, 13, 14, 15 et 17 collectées sur HPLC à partir de l'extrait peptidique et analysées par MALDI-TOF.

**Tableau 3.** Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides contenus dans l'extrait peptidique de l'hydrolysate pepsique de la caséine bovine

Fraction <sup>a</sup>	masse (Da)	Position de la séquence <sup>b</sup>	Séquence
<b>Fraction 1</b>	1878,043	$\alpha_{s1}$ 1-16	RPKHPIKHQGLPQEVL
		$\alpha_{s2}$ 149-163	KKTKLTEEEKNRLNF
	1219,59	//	//
	2348,88	$\alpha_{s1}$ 27-47	PFPEVFGKEKVNELSKDIGSE
		$\alpha_{s2}$ 82-99	LNEINQFYQKFPQYLQYL
		$\beta$ 172-193	FPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAV
$\kappa$ 47-67		PVALINNQFLPYPPYAKPAAV	
<b>Fraction 2</b>	1198,02	$\alpha_{s1}$ 60-70	MEAESISSSEE
		$\alpha_{s2}$ 12-21	ESIISQETVK
		$\alpha_{s2}$ 166-174	KISQRYQKF
		$\beta$ 93-103	TQTPVVVPPFL
	2124,24	$\kappa$ 67-76	VRSPAQLQW
		$\alpha_{s1}$ 21-38	LRFFVAPFPEVFGKEKVN
		$\alpha_{s1}$ 91-107	YLGYLEQLLRLKKYKVP
		$\alpha_{s2}$ 164-180	LKKISQRYQKFPALPQYL
	$\beta$ 32-49	SSSEESITRINKKIEKFQ	
<b>Fraction 3</b>	1386,48	$\alpha_{s2}$ 137-148	KTVDMESTEFT
<b>Fraction 4</b>	<b>2012,20</b>	$\alpha_{s2}$ <b>164-179</b>	<b>LNFLKKISQRYQKFPALPQY</b>
	<b>2348,58</b>	$\alpha_{s2}$ <b>148-166</b>	<b>TKKTKLTEEEKNRLNFLK</b>
<b>Fraction 5</b>	8264	$\alpha_{s1}$ 123-194	MKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAWYVPLGTQY TDAPSFSDIPNPIGSENSEKT
		$\alpha_{s1}$ 17-89	NENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEE IVPNSVEQKHQKEDVPSSE
	1177,39	$\alpha_{s2}$ 119-187	ITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFLKISQRYQK FALPQYLKTVYQHQ
		$\alpha_{s2}$ 123-132	LNREQLSTSE
	3004,8	$\alpha_{s1}$ 91-115	YLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNS
	$\alpha_{s2}$ 162-185	NFLKISQRYQKFPALPQYLKTVYQ	
<b>Fraction 6</b>	2354,88	$\alpha_{s1}$ 99-118	LRLKKYKVPQLEIVPNSAEE
	1499,74	$\alpha_{s2}$ 145-163	EVFTKTKLTEEEKNRLNF
		$\alpha_{s2}$ 135-147	SEENSKKTVDMESTEVF
<b>Fraction 7</b>	1499,997	$\alpha_{s2}$ 135-147	SEENSKKTVDMESTEVF
<b>Fraction 8</b>	3131,71	$\alpha_{s1}$ 5-31	PIKHQGLPQEVLENENLLRFFVAPFPEV
		$\alpha_{s2}$ 115-142	NAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDM
		$\beta$ 89-117	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSKVKEAM
		$\kappa$ 58-85	YPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPA
	3024,97	$\alpha_{s1}$ 36-62	KVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEA
		$\alpha_{s2}$ 180-204	LKTVYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYV
		$\alpha_{s2}$ 158-181	KNRLNFLKISQRYQKFPALPQYLK
		$\beta$ 179-205	SLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPAQAF
6221,59	$\kappa$ 16-40	RFFSDKIAKYIPIQYVLSRPSYGL	
	//	//	
<b>Fraction 9</b>	3345	$\alpha_{s1}$ 101-129	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHA
	2124,32	$\alpha_{s2}$ 164-180	LKKISQRYQKFPALPQYL
	3115	$\alpha_{s2}$ 183-207	VYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	3074,56	$\alpha_{s1}$ 90-114	NQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAW
	3130	$\alpha_{s2}$ 139-164	VDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFL
<b>Fraction 10-1</b>	<b>3458,86</b>	$\alpha_{s2}$ <b>180-207</b>	<b>LKTVYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL</b>
	<b>3115,44</b>	$\alpha_{s2}$ <b>183-207</b>	<b>VYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL</b>
<b>Fraction 11</b>	3622,992	//	//
	3230,608	//	//
<b>Fraction 12</b>	3848,72	$\alpha_{s2}$ 53-87	SIGSSSESAEVATEEVKITVDDKH
		$\alpha_{s1}$ 114-146	NSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFY

	4220,81	$\alpha_{s1}$ 115-150	SAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELF
<b>Fraction 13-1</b>	<b>5340.01</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 131-174</b>	<b>SEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKF</b>
	<b>4921.11</b>	<b><math>\alpha_{s1}</math> 153-196</b>	<b>FYQLDAYPSGAWYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTM</b>
	<b>4463.52</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 99-137</b>	<b>LYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK</b>
	<b>4086.87</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 62-95</b>	<b>AEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFYQKFPQYL</b>
		<b><math>\alpha_{s1}</math> 20-55</b>	<b>LLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAME</b>
<b>Fraction 13-2</b>	2763	//	//
	2575	$\alpha_{s1}$ 121-143	HSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELA
		$\alpha_{s2}$ 18-39	ETYKQEKMAINPSKENLCSTF
	1881	$\alpha_{s1}$ 88-102	SERYLGYLEQLLRK
	2734	$\alpha_{s1}$ 100-122	LKKYKVPQLEIVPNSAEERLHS
	1725	/	/
	2154	$\alpha_{s1}$ 54-72	MEDIKQMEAESISSEEIV
		$\alpha_{s2}$ 159-175	NRLNFKKISQRYQKFA
	2521	/	/
	2265,33	$\alpha_{s1}$ 128-146	HAQQKEPMIGVNQELAYFY
		$\alpha_{s2}$ 17-35	QETYKQEKMAINPSKENL
	1530,9	$\alpha_{s1}$ 95-106	LEQLLRKKYKV
		$\alpha_{s2}$ 78-89	YQKALNEINQFY
<b>Fraction 14-1</b>	<b>5470.38</b>	<b><math>\alpha_{s1}</math> 141-187</b>	<b>LRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMESFS DIPNPIG</b>
	<b>3957.73</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 176-207</b>	<b>LPQYLKTVYQHQAAMKPKWIQPKTKVIPYVRYL</b>
	<b>3792.79</b>	<b><math>\alpha_{s1}</math> 161-195</b>	<b>SKDIGSESTEDQAMESFS DIPNPIGSENSEKTT</b>
<b>Fraction 14-2</b>	568,27	$\alpha_{s1}$ 178-182	SFS DI
		$\alpha_{s1}$ 22-25	RFFV
		$\alpha_{s2}$ 51-55	EYSIG
		$\beta$ 87-91	QNIPP
		$\beta$ 187-191	PVPQK
		$\kappa$ 103-107	LSFMA
	1060,29	//	//
	524,28	//	//
<b>Fraction 15</b>	<b>5452.92</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 164-207</b>	<b>LKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMKPKWIQPKTKVIPYVRYL</b>
<b>Fraction 16</b>	656	$\alpha_{s2}$ 171-175	YQKFA
	1919	$\alpha_{s1}$ 168-185	PLGTQYTDAPSFSDIPNP
	4770	$\alpha_{s2}$ 77-114	HYQKALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR
	4757.74	$\alpha_{s1}$ 88-127	SERYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGI
	5086.0	$\alpha_{s1}$ 119-160	RLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYP
	5604,0	$\alpha_{s1}$ 90-136	RYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMI
<b>Fraction 17-1</b>	<b>7561.84</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 99-163</b>	<b>LYQGPIVLNPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTK</b>
			<b>KKLTEEEKNRLNF</b>
	<b>7414.99</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 114-176</b>	<b>RNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFAL</b>
	<b>7184.81</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 28-90</b>	<b>INPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA EVATEEVKITVDDKHYQK</b>
			<b>ALNEINQFY</b>
		<b><math>\alpha_{s1}</math> 9-72</b>	<b>QGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQ</b>
			<b>MEAESISSEEIV</b>
	<b>6714.15</b>	<b><math>\alpha_{s1}</math> 9-68</b>	<b>SSEESIISQETYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA</b>
			<b>EVATEE</b>
		<b><math>\alpha_{s1}</math> 70-126</b>	<b>EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRKLYKVPQLE</b>
	<b>5714.10</b>	<b><math>\alpha_{s2}</math> 138-184</b>	<b>TVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVY</b>
		<b><math>\alpha_{s1}</math> 26-77</b>	<b>MAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEEYSIGSSSEESA EVATEEVKITVDDKH</b>
<b>Fraction 17-2</b>	10511,86	$\alpha_{s1}$ 35-125	EKNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPS
			ERYLGY LEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKE
		$\alpha_{s1}$ 70-157	EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRKLYKVPQLEIVPNSAEERLHSM
			KEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLD
		$\beta$ 106-198	EVMGVSKVKEAMAPKHKEMPPKYPVEPFTESQSLTLTDVENLHPLPLLOS
			WMHQPHQP LPPTVMFPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQR
	7579,07	$\alpha_{s1}$ 21-87	LRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSEEIVPN
			SVEQKHIQKEDV
		$\alpha_{s1}$ 46-110	SESTEDQAMEDIKQMEAESISSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLL
			RLKLYKVPQLE

## Résultats et discussions

		$\alpha_{s1}$ 60-124	MEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPN SAEERLHSMK
		$\beta$ 119-184	PKHKEMPFKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHPLPLLSQSWMHQPHQLPPTV MFPPQSVLSLSQSK
7431,39		//	//
7202,41		$\alpha_{s1}$ 114-174	NSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAYPSGAW YYVPLGTQYT
		$\alpha_{s1}$ 98-157	LLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR QFYQLD
		$\alpha_{s2}$ 86-146	NQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK TVDMESTEV
		$\alpha_{s2}$ 126-185	EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKFALPQYL KTVYQ
4196,04		$\beta$ 123-158	EMFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHPLPLLSQSW
4435,28		//	//
<b>Fraction 18-1</b>	7074,45	$\alpha_{s2}$ 100-160	YQGPVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKK LTEEENR
		$\alpha_{s2}$ 126-184	EQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRLNFKKISQRYQKFALPQYL KTVYQ
		$\alpha_{s2}$ 115-174	NAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRLNFKKISQR YQKF
		$\beta$ 15-75	ARELEELNVPGEIVESLSSEESITRINKKIEKFQSEEQQQTEDELQDKIHFAQT QSLVY
		$\kappa$ 34-95	RYPYGLNYYQKPVALLINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPA KSCQAQPTTM
6844,42		$\alpha_{s1}$ 10-70	GLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEA ESISSEE
		$\kappa$ 32-91	LSRYPYGLNYYQKPVALLINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVP AKSCQAQ
7580,04		$\alpha_{s1}$ 56-120	DIKQMEAESISSSEEIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEI VPNSAEERL
		$\beta$ 154-220	LLQSWMHQPHQLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQ AFLLYQEPVLPVGRPF
		$\kappa$ 53-119	NQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTTMARHHPHPL SFMAIPPKNQDKTEI
3065,41		$\alpha_{s1}$ 167-195	VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTT
		$\alpha_{s2}$ 5-31	EHVSSSEESIISQETKQEKMAINPS
		$\beta$ 198-224	RDMPIQAFLLYQEPVLPVGRPFPIV
5185,87		$\alpha_{s1}$ 8-53	HQGLPQEVLENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQA
		$\beta$ 61-107	QDKIHFAQTQSLVYPPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEV
		$\beta$ 74-121	VYPPFGPIPNLQNIPLTQTPVVVPPFLQPEV/MGVSKVKEAMAPKH
		$\kappa$ 48-94	VALINQFLPYPPYAKPAAVRSPAQLQWQVLSNTVPAKSCQAQPTT
7979,33		$\alpha_{s1}$ 107-174	PQLEIVPNSAEERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDAY PSGAWYYVPLGTQYT
		$\alpha_{s1}$ 74-141	NSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSAEERLHSMKEGI HAQQKEPMIGVNQE
		$\beta$ 95-164	TPVVVPPFLQPEV/MGVSKVKEAMAPKHKEMFPKYPVEPFTESSQLTLTDVE NLHPLPLLSQSWMHQPHQ
<b>Fraction 18-2</b>	7058,37	$\alpha_{s1}$ 15-77	VLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISS EEIVPNSVE
		$\alpha_{s2}$ 18-79	ETYKQEKMAINPSKENLCSTFCKEVVRNANEEYSIGSSSESAEVATEEVKIT VDDKHQY
		$\beta$ 124-185	MFPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHPLPLLSQSWMHQPHQLPPTVMFPP QSVLSLSQSKV
6828,56		//	//
5600,83		//	//
7563,89		$\alpha_{s2}$ 85-148	INQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLPWDQVKRNAVPITPTLNREQLSTSEENSKK TVDMESTEVFT
		$\alpha_{s2}$ 132-193	EENSKKTVDMESTEVFTKTKLTEEENRLNFKKISQRYQKFALPQYLKTVYQ HQAAMKPW
		$\beta$ 126-192	FPKYPVEPFTESSQLTLTDVENLHPLPLLSQSWMHQPHQLPPTVMFPPQSV LSLSQSKVLPVQKA

	$\beta$ 156-222	QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSKVLPVPQKAVPYPQRDMPIQAF LLYQEPVLGPPVRGPFPI
7962,78	$\beta$ 18-87	LEELNVPGEIVESLSSSEESITRINKKIEKFQSEEQQTDELDQDKIHPFAQTQSL VYPF PGPIPNLSPQ
3064,98	$\alpha_{s1}$ 14-39	EVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNE
	$\alpha_{s2}$ 5-31	EHVSSSEESIISQETKQKKNMAINPS

<sup>a</sup>: fait référence au numéro de la fraction dans la figure 17 ;

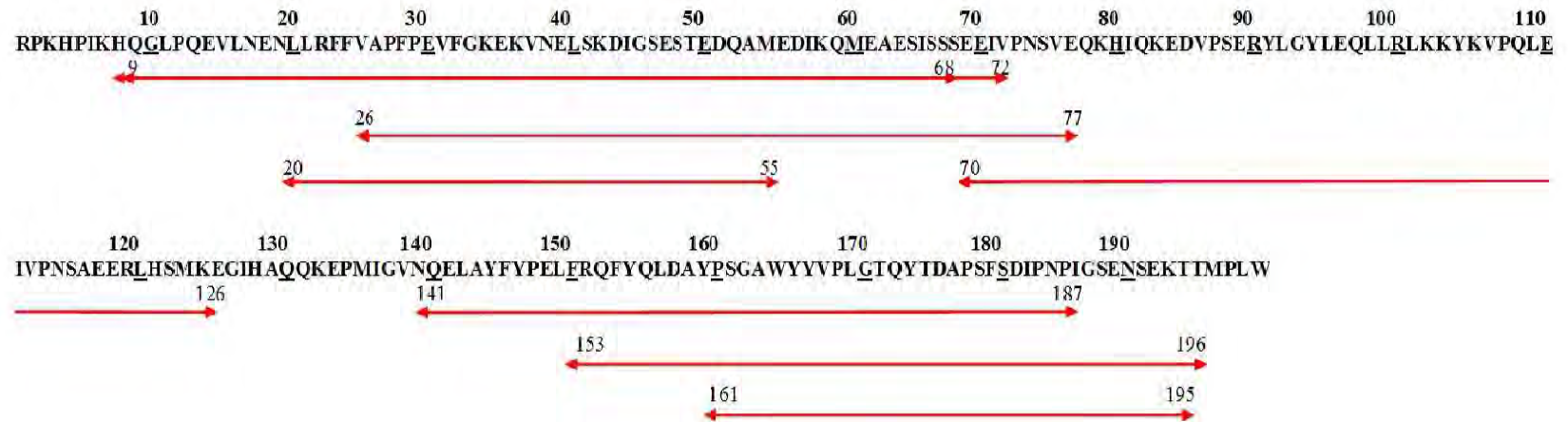
<sup>b</sup>: position des peptides dans les différentes fractions de la caséines.

// : séquence non déterminée.

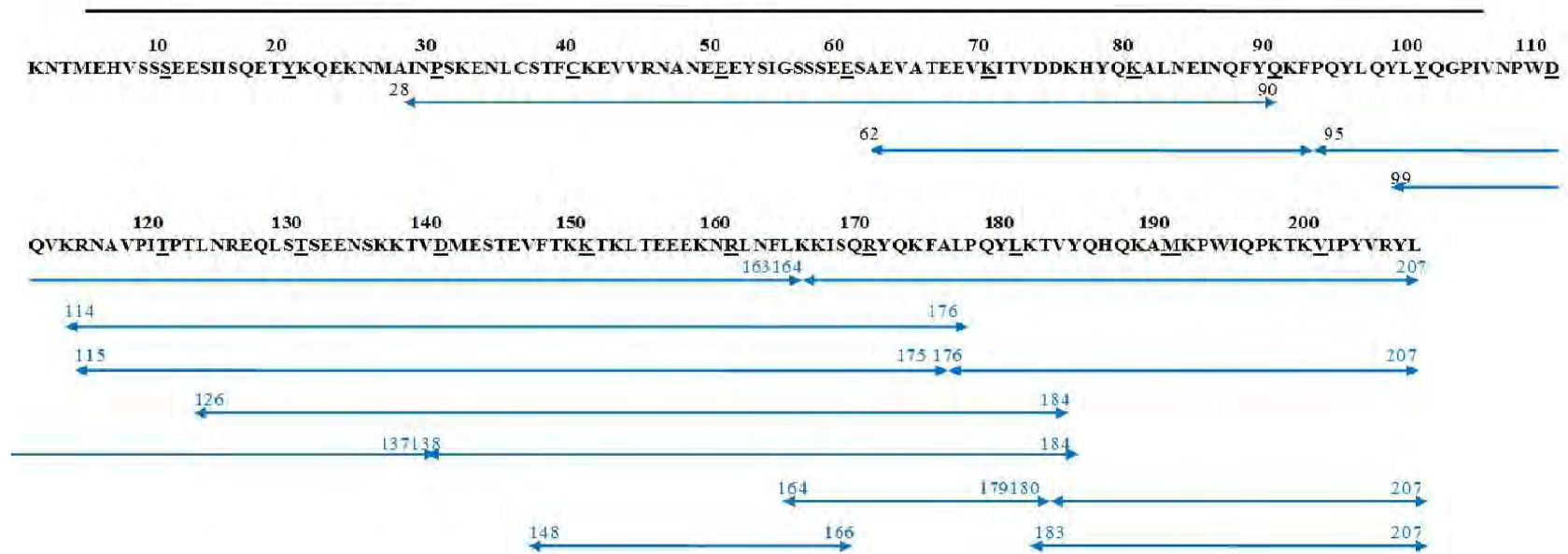
## I.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et du mode d'action des peptides actifs

Le pouvoir antimicrobien d'une molécule est, généralement, exprimé par sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette dernière correspond à la plus faible concentration de l'agent antimicrobien capable d'inhiber la croissance de la souche bactérienne testée, après un temps d'incubation de 24 heures à 37°C. La CMI est déterminée en milieu liquide sur microplaques dans du milieu Müller-Hinton (MH) contenant des concentrations décroissantes de peptide. L'activité antimicrobienne est détectée par l'absence de croissance dans des puits contenant la souche bactérienne et le peptide à la concentration testée. Des dilutions successives au 1/2 du peptide ont été testées vis-à-vis de sept souches cibles. La concentration initiale des peptides a été évaluée par la méthode OPA en utilisant la peptone pancréatique de caséine comme étalon. La CMI a été déterminée pour le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) que nous avons pu séparer à l'état pur. La concentration de départ de ce peptide est de  $0,624 \pm 0,00192$  mg/mL. La CMI est également déterminée pour l'extrait peptidique, obtenu par précipitation au sel, renfermant  $1,929 \pm 0,03684$  mg/mL de peptide. La nisine ainsi qu'un antibiotique ; la tétracycline ont été prises comme témoin positif. Le tableau 4 présente les valeurs de la CMI obtenues.

Le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) ainsi que l'extrait peptidique ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif comparées à celles déterminées sur les souches à Gram-négatif testées. Le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) a montré une activité plus élevée que la nisine vis-à-vis de *L. innocua* **LMG 1138** avec une CMI égale à 9,754  $\mu$ g/mL contre 31,25  $\mu$ g/mL pour la nisine. Et une CMI de 19,5  $\mu$ g/mL vis-à-vis de *B. subtilis* **ATCC 6633** contre 15,625  $\mu$ g/mL pour la nisine. Mc Cann et coll., (2005) ont déterminé, pour le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) une CMI de 0,9  $\mu$ M vis-à-vis de ces mêmes souches.



(a)



(b)

**Figure 21.** Représentation des peptides antimicrobiens sur la chaîne de la caséine  $\alpha_1$ (a) et de la caséine  $\alpha_2$  (b) bovine.

Ce peptide présente ainsi le pouvoir antimicrobien le plus élevé parmi le groupe de peptides actifs issus des fractions  $\alpha_s$  de la caséine bovine.

Comparé au peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207), l'extrait peptidique, a montré des valeurs de CMI plus élevées sur les différentes souches testées (Tableau 4). Toutefois, cet extrait a montré une activité comparable à celle de la nisine contre *L. innocua* et *L. monocytogène* (CMI = 30,14  $\mu\text{g/mL}$  et 60,28  $\mu\text{g/ml}$  contre 31,25  $\mu\text{g/mL}$  et 62,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivement). La faible activité de l'extrait peptidique comparé au peptide pur peut être due à la présence de peptides inactifs dans le mélange. Mc Cann et coll. (2005) ont également noté des valeurs élevées de CMI pour une fraction peptidique séparée de l'hydrolysate brut de caséine par chromatographie échangeuse de cation (CMI de 312 à 625  $\mu\text{g/mL}$  et de 625 à 5000  $\mu\text{g/mL}$  pour des souches à Gram positif et à Gram négatif, respectivement). Bien que cette dernière renferme plusieurs peptides actifs tels que les peptides  $\alpha_{s2}$  (164-207, 175-207 et 181-207), la présence de peptides inactifs semble affecter l'activité antimicrobienne.

Aux concentrations testées, la CMI n'a pas pu être déterminée sur la souche de *S. aureus*, **CIP 4.83**, pour le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) et l'extrait peptidique, la (MIC > 624,2  $\mu\text{g/mL}$  pour le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) et MIC >1929  $\mu\text{g/mL}$  pour l'extrait peptidique). Bien qu'une activité sur milieu solide a été préalablement observée sur cette souche mais en présence de quelques colonies sur les zones d'inhibition (Figure 22). Ainsi, des concentrations en peptides plus élevées doivent être testées pour déterminer la CMI sur la souche en question.

L'effet bactéricide ou bactériostatique des peptides est déterminé à partir des puits de la CMI en dénombrant les cellules restantes. Un dénombrement est en parallèle réalisé sur les puits contenant la culture bactérienne sans ajout de peptides (témoin de croissance) afin de définir un pourcentage de mortalité cellulaire. Après incubation à 37°C pendant 24 H, un dénombrement est effectué afin de déterminer le nombre d'UFC par mL. Les résultats obtenus pour les peptides testés sont donnés dans le tableau 5. Un agent antimicrobien est considéré comme bactéricide lorsqu'il ne laisse qu'une bactérie viable sur 10000 ce qui correspond à un taux de mortalité de 99,99 %, à la concentration de la CMI ou bien à une valeur proche. A des taux de mortalité plus faibles, l'effet est dit bactériostatique.

Le mode d'action du peptide  $\alpha_{s2}$ -CN f(164-207) et de l'extrait peptidique est étudié sur deux souches à Gram-positif : *L. innocua* **LMG1138** et *B. subtilis* **ATCC 6633** et deux souches à Gram-négatif : *E. coli* **JM109** et *E. coli* **DH5 $\alpha$** . Selon les résultats obtenus, les



peptides testés présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif, lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à la CMI (Tableau 5).

Parmi les peptides identifiés, certains ont été reportés par d'autres travaux et pour lesquels l'activité antimicrobienne a été mise en évidence. C'est le cas des peptides (164-179, 180-207, 183-207 et 164-207) issus de la région C-terminale de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine. Ces peptides possèdent un point isoélectrique compris entre 10,00 et 10,40, (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann et coll., 2005). Présentant, ainsi, des propriétés communes au groupe de peptides antimicrobiens caractérisés par la présence dans leur structure d'une région chargée positivement et capables d'adopter une conformation dipolaire permettant leur présence au niveau des interfaces hydrophiles/hydrophobes. Ce caractère bipolaire est à l'origine des perturbations de la membrane microbienne, chargée négativement, conduisant à la mort cellulaire (Bradshaw et coll., 2003).

Une étude réalisée sur le mécanisme d'action du peptide  $\alpha_{s2}$  (183-207) indique que le site initial de liaison de ce peptide était l'acide lipotéichoïque chez les bactéries à Gram positif et les lipopolysaccharides chez les bactéries à Gram négatif. Le peptide était capable de perméabiliser les membranes externe et interne et de générer des pores dans la membrane externe des bactéries à Gram-positif et dans la paroi cellulaire des bactéries à Gram-négatif. Provoquant ainsi, une fuite du contenu cytoplasmique chez les bactéries à Gram-positif et condensation du cytoplasme chez les bactéries à Gram-négatif. Le peptide montre, ainsi, un mécanisme d'action comparable à celui de la lactoferrecine prise comme témoin (López-Expósito et coll., 2008). Cependant, la relation entre le mécanisme d'action de ces peptides et leurs structures reste à déterminer. En effet, plusieurs de ces peptides sont des précurseurs du peptide (181-207) avec différentes longueurs de la chaîne peptidique. Ces derniers montrent un pouvoir antimicrobien différent. Le peptide (175-207) possédant 6 résidus en plus du côté N-terminal que le peptide (181-207), montre une CMI 2,3 fois plus faible que ce dernier contre des bactéries à Gram positif. De même, le peptide (164-207) possédant 17 résidus supplémentaires montre une CMI 7 fois plus faible que celle du peptide (181-207) (Mc Cann et coll., 2005). Bien que, ce segment supplémentaire, correspondant au peptide (164-179), montre une CMI 3,1 fois plus élevée que le peptide (181-207) et 50 fois plus élevée que le peptide (164-207) sur le même groupe de bactéries (Resio et Visser, 1999 ; Mc Cann et coll., 2005).

Une étude réalisée sur l'obtention de peptides antimicrobiens par hydrolyse pepsique de la caséine  $\alpha_{s2}$  ovine montre que le peptide (184-208) d'origine ovine présente une activité antimicrobienne plus faible que son homologue bovin (fragment 183-207), alors que la structure des deux fragments se différencie par 4 résidus seulement. Il s'agit du remplacement des résidus valine, tyrosine, isoleucine, et lysine dans le peptide d'origine bovine par l'alanine, un acide aspartique, thréonine et asparagine, respectivement, dans son homologue ovin.

**Tableau 4.** Concentration minimale inhibitrice (CMI) du peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) et de l'extrait peptidique en comparaison à la tétracycline et la nisine

	Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)							
	Extrait peptidique		$\alpha_{s2}$ (164-207)		Tétracycline		Nisine	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
<b>Bactéries</b>								
<b>Gram-positif</b>								
<i>L. innocua</i> <b>LMG 1138</b>	30,14	NA	9,754	1,788	0,25	0,000520	31,25	8,928
<i>B. subtilis</i> <b>ATCC6633</b>	60,28	NA	19,50	3,577	0,50	0,001040	15,625	4,462
<i>L.monocytogène</i> <b>ATCC 3512</b>	60,28	NA	—		0,25	0,000520	62,5	17,857
<i>S. aureus</i> CIP4.83	>1929	NA	>624,2	>114,49	0,488	0,001015	15,625	4,464
<b>Bactéries</b>								
<b>Gram-négatif</b>								
<i>E. coli</i> <b>JM109</b>	241,12	NA	78,02	14,311	15,62	0,032481	—	
<i>E. coli</i> <b>DH5<math>\alpha</math></b>	964,50	NA	312,10	57,245	3,90	0,008110	—	
<i>E. coli</i> <b>CIP 54127</b>	482,25	NA	—		—		—	

NA : non attribuable

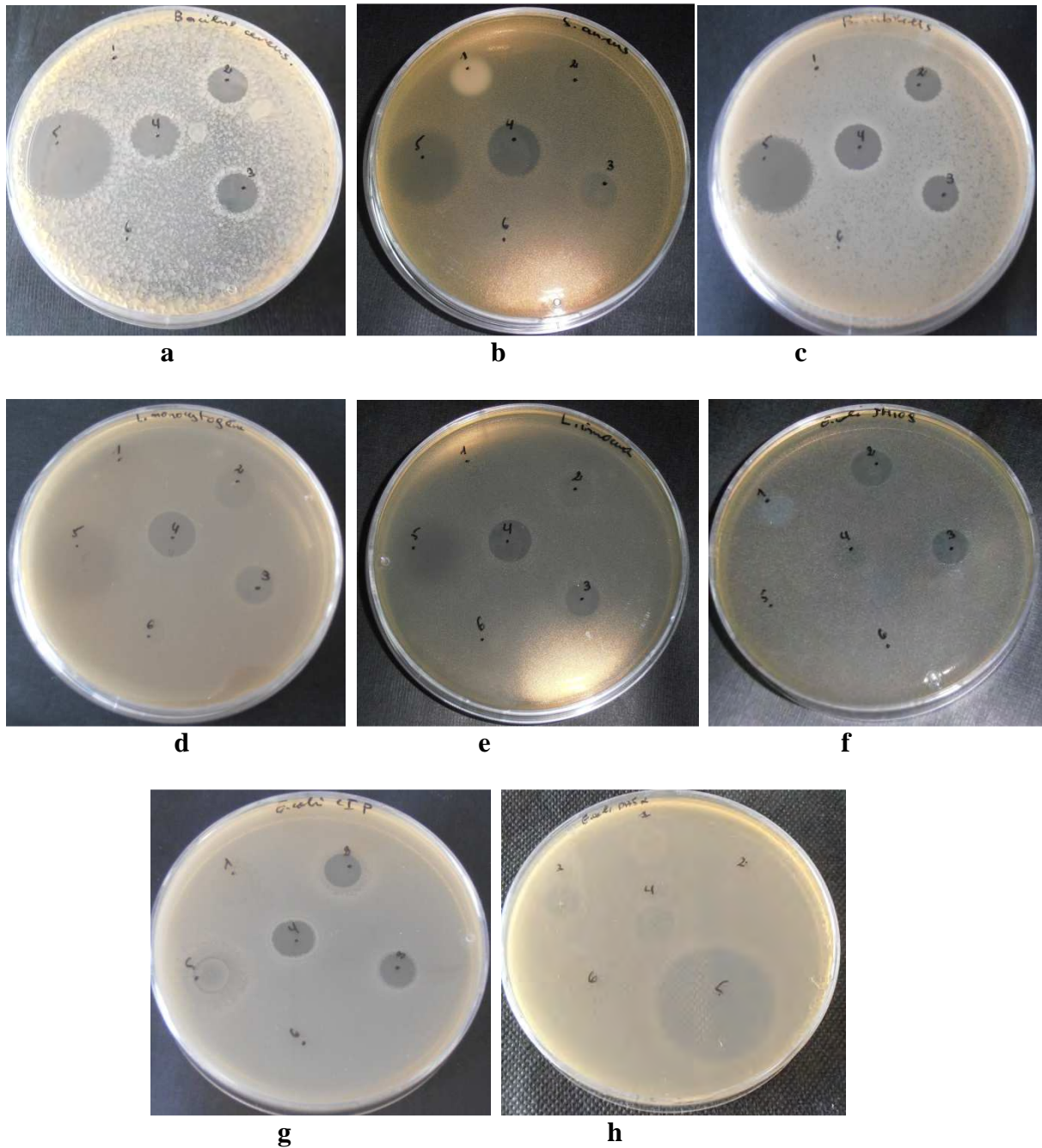
**Tableau 5.** Taux de mortalité cellulaire engendré par le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) et de l'extrait peptidique lorsqu'ils sont employés à une concentration égale à leurs CMI

	Taux de mortalité (%)	
	Extrait de peptide	$\alpha_{s2}$ -CN f(164-207)
<b>Bactéries Gram-positif</b>		
<i>L. innocua</i> LMG 1138	99,87	99,97
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	99,97	99,98
<b>Bactéries Gram-négatif</b>		
<i>E. coli</i> JM109	99,99	99,99
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	99,99	99,99
<i>E. coli</i> CIP 54127	99,99	—

En outre, des études plus récentes ont montré l'importance de certaines séquences en acides aminés dans l'activité antimicrobienne de peptides. En effet, Catiau et coll., (2011a et 2011b) ont pu déterminer une séquence minimale responsable de l'activité antimicrobienne du peptide  $\alpha$  (133-141) et celle du peptide  $\beta$ (114-145) issus de l'hydrolyse de l'hémoglobine bovine. En prenant des segments de plus en plus courts de ces peptides, ils ont pu démontrer que les tripeptides KYR et RYH seraient les séquences antimicrobiennes minimales des peptides  $\alpha$  (133-141) et  $\beta$  (114-145) respectivement. Ces tripeptides montrent des CMI 10 à 40 fois plus faibles que celles de leurs précurseurs sur les souches testées. En outre, le dipeptide de séquence YR est dépourvu d'activité antimicrobienne (Catiau et coll., 2011b). Cela indique que la présence de la tyrosine (Y), arginine (R) et d'un acide aminé basique tel que la lysine (K) ou l'histidine (H) est requise pour l'activité antimicrobienne de ces peptides.

Lopes et coll. (2005), en étudiant l'effet analgésique de la néokyotorphine ( $\alpha$  137-141 : TSKYR) ont montré que l'interaction de ce peptide avec la membrane des bactéries est due à la présence de la lysine et de l'arginine qui apportent les charges positives nécessaires à cet effet. Cette interaction induit un changement de conformation du groupement phénolique de la tyrosine, permettant au peptide de se fixer sur un récepteur membranaire provoquant un effet analgésique. La présence de cette séquence particulière doit être prise en considération dans l'étude du mécanisme d'action des peptides issus de protéolyse. Du fait que nous avons observé la présence dans plusieurs peptides identifiés dans ce présent travail. C'est le cas de groupe de peptide issus de la région C-terminal de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine et plus particulièrement le segment (164-207)

(LKKISQRYQKFALPQYLKTVYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL). Ou bien dans la région (70-126) de la caséine  $\alpha_1$  (EIVPNSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLLKRYKVPQL).



**Figure 22.** Photos montrant les zones d'inhibition des échantillons testés sur les souches cibles ; **a** : *B. cereus*, **b** : *S. aureus* CIP 4.83, **c** : *B. subtilis* ATCC 6633, **d** : *L. monocytogenes* ATCC 3512, **e** : *L. innocua* LMG 11387, **f** : *E. coli* JM109, **g** : *E. coli* CIP 54127, **h** : *E. coli* DH5 $\alpha$ . (les annotations faites sur chaque boîte correspondent aux échantillons ; 1 : caséines natives, 2 : hydrolysats totaux, 3 : extrait de peptique, 4 : peptide  $\alpha_2$ (164-207), 5 : témoin positif ; tétracycline, 6 : témoin négatif ; tampon phosphate).

## **II. Obtention et caractérisation de peptides antimicrobiens issus de la protéolyse de la caséine cameline**

Contrairement aux laits des autres espèces, le lait de dromadaire connaît des applications médicinales et thérapeutiques, notamment dans les pays producteurs. Il est utilisé, en particulier, dans le traitement de la tuberculose, de la gastro-entérite et des ulcères gastriques dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie (Konuspayeva et coll., 2004). Ces utilisations ont incité les chercheurs à étudier sa composition afin d'élucider ces applications particulières. Les facteurs santé attribués au lait de chamelle semblent être liés à certains de ses composants : lactoferrine, immunoglobuline, lysozyme, lactoperoxydase et vitamine C. Ces composants généralement présents dans les laits d'autres espèces, auraient la particularité chez la chamelle d'être thermorésistants et pour certains, comme c'est le cas pour la lactoferrine ou la vitamine C de s'y trouver en quantité plus importante (El-agamy et coll., 1992 ; Al Haj et Al Kanhal, 2010).

En outre, durant ces dernières années certaines équipes de recherche commencent à s'intéresser à l'étude de la possibilité d'obtention de peptides bioactifs par hydrolyse enzymatique des protéines du lait camelin. C'est ainsi que Salami et coll., (2010) ont pu démontrer une activité antimicrobienne et antioxydante dans les hydrolysats des protéines du lactosérum camelin. Les peptides ne sont pas encore identifiés. L'hydrolyse a été réalisée par différentes protéases (protéinase K, thermolysine, chymotrypsine et trypsine). Cependant c'est l'action de la protéinase K qui a libéré plus de peptides actifs. En outre, L'hydrolyse de la caséine  $\beta$  cameline par la chymotrypsine libère des peptides antioxydants (Salami et coll., 2011).

Les caséines camelines se sont avérées intéressantes comme étant une source en peptides antihypertensifs. En effet, l'action de la pepsine seule sur les caséines camelines, ou combinée à celle de la chymotrypsine et trypsine, permet de générer des peptides inhibant in vitro l'enzyme de conversion de l'angiotensine, intervenant dans la régulation physiologique de la tension artérielle (Salami et coll., 2011). En outre, d'autres travaux montrent que la consommation de lait camelin fermenté contribue à l'abaissement de la tension artérielle. Indiquant la possibilité de libération de peptides sous l'action de bactéries lactiques (al haj, et Al kanhal, (2010).

## II.1. Caractéristiques de la caséine cameline préparée à partir du lait cru

La caséine cameline utilisée dans ce travail a été préparée à partir d'un échantillon de lait cru de chamelle de la race sahraoui, d'un lot de 11 chammelles (Ghardaïa, Algérie). Les caractéristiques physico-chimiques du lait écrémé sont données dans le tableau 6.

**Tableau 6 :** Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle écrémé

Paramètres physico-chimiques	Moyenne $\pm$ Ecart-type
pH (à 20°C)	6,383 $\pm$ 0,005
Acidité Dornic (°D)	18,78 $\pm$ 1,511
Densité	1,0265 $\pm$ 0,0005
Extrait sec total (g/l)	109,85 $\pm$ 1,851
Protéines totales (g/l)	48,53 $\pm$ 1,021

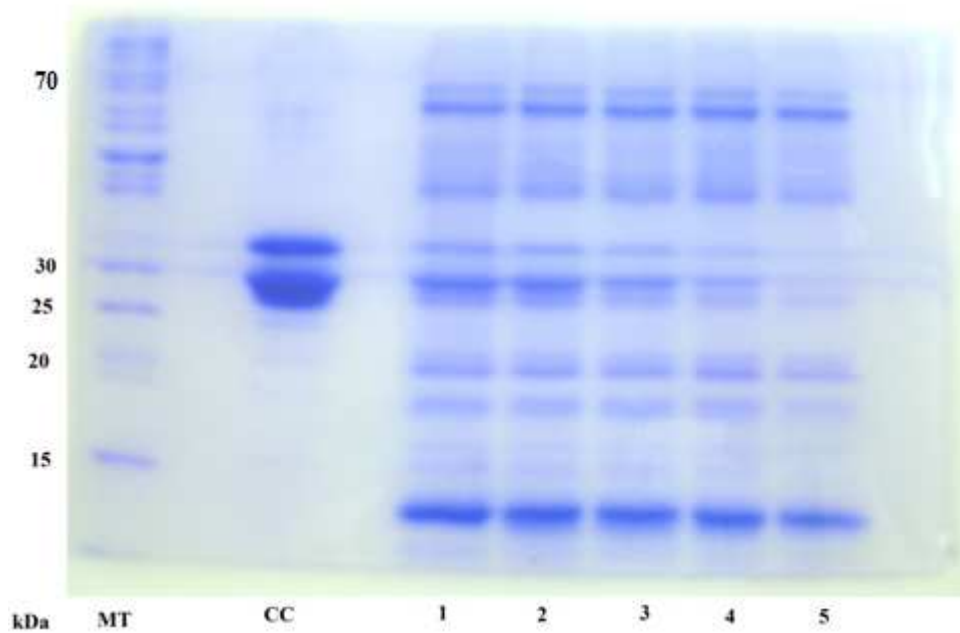
Les caséines camelines sont préparées par précipitation au pH isoélectrique. Le pH a été diminué jusqu'à pH 4,3 au lieu de 4,6 afin d'obtenir une meilleure précipitation des caséines (wangoh et coll., 1998 ; Siboukeur, 2006). En effet, la précipitation des caséines a été suivie durant l'abaissement du pH du lait jusqu'à pH 4,3 pour les valeurs de pH suivantes (4,6, 4,5, 4,4, 4,3). Le lactosérum obtenu pour chaque valeur a été analysé par électrophorèse sur SDS-PAGE (figure 23).

Comme indiqué dans la figure 23, les quantités résiduelles des caséines dans le lactosérum diminuent progressivement suite à l'abaissement du pH. Toutefois, nous avons obtenu une meilleure précipitation à pH 4,3 suivie par un chauffage de 10 min entre 30 à 35°C avant centrifugation.

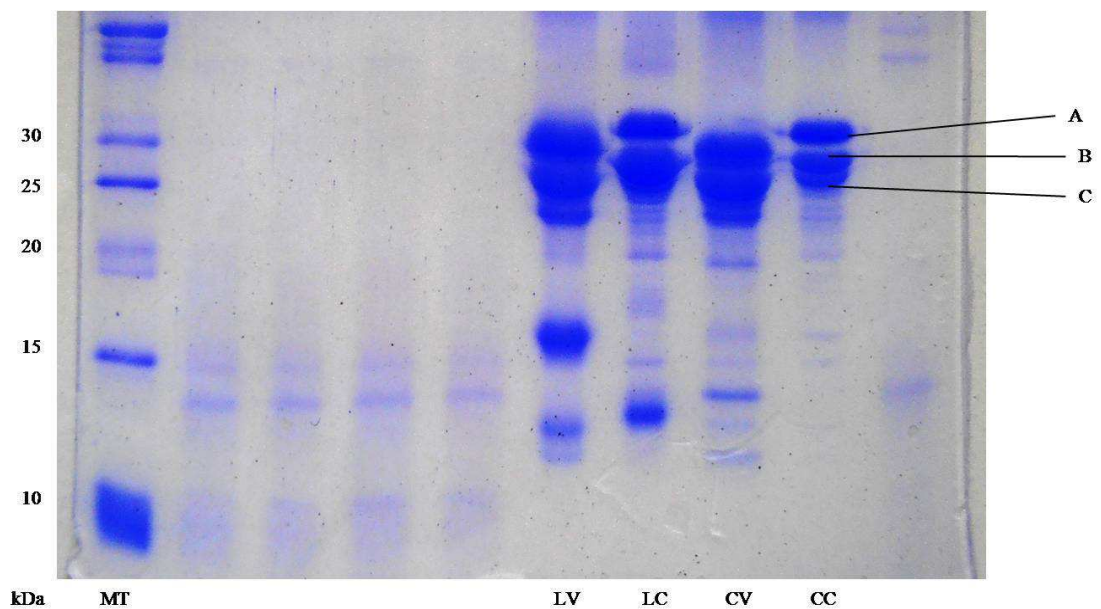
Le profil de caséines camelines en comparaison à celui des caséines bovines (figure 24), présente, 3 bandes protéiques (A, B, C): La bande (A), dont la vitesse de migration est la plus lente, présente un niveau de migration légèrement inférieur à celui de la caséine  $\alpha_s$  bovine avec un poids moléculaire compris entre 30000 et 40000 Da. Les bandes (B) et (C) présentent des poids moléculaires compris entre 30000 et 2 000 Da.

Alim et coll. (2005) en analysant les caséines camelines (particulièrement de la race Larbaa et Targui), par LC-MS, ont identifié trois fractions, de PM égale à 24760 Da, 22033 Da

et 24970 Da. Ces masses ont été attribuées à la caséine  $\alpha_1$ , la caséine  $\alpha_2$  et la caséine  $\beta$ , respectivement.

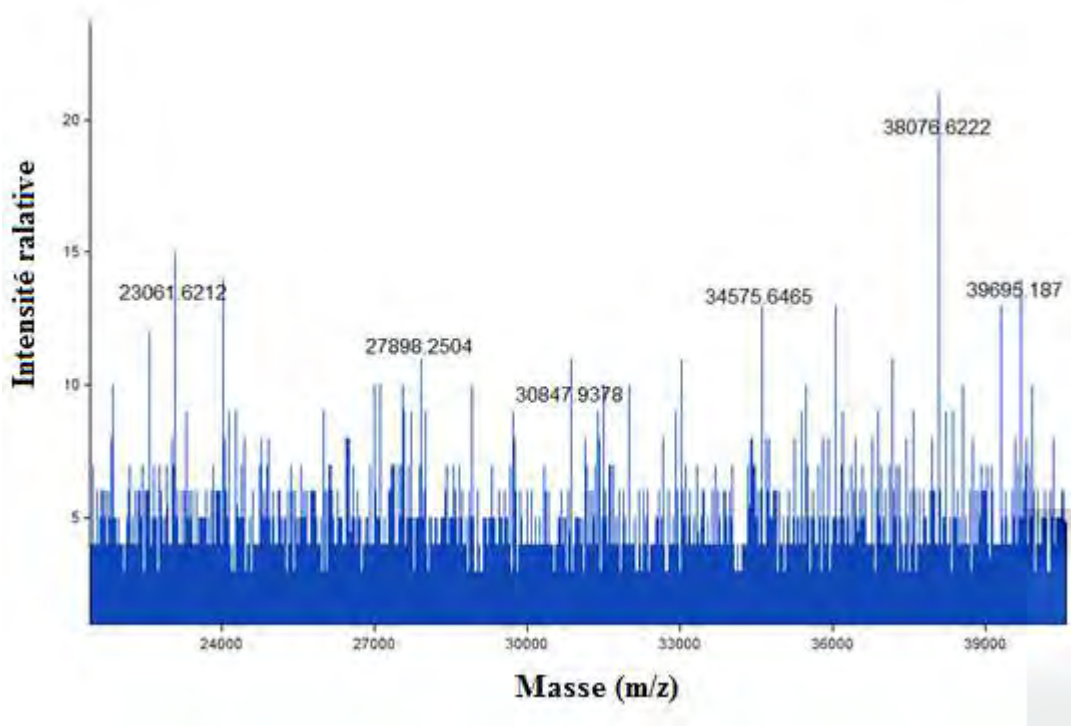


**Figure 23.** profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15 % d'acrylamide) du lactosérum camelin obtenu à différents valeurs de pH de précipitation des caséines (MT : marqueur de taille, CC : caséine cameline, de 1 à 5 : échantillons de lactosérum à pH 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, et 4,3 à 30-35°C respectivement).



**Figure 24.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE (à 15%) d'échantillons de lait bovin et camelin et de caséines bovines et camelines. (MT : marqueur de taille, LV : lait de vache, LC : lait de chamelle, CB : caséine bovine, CC : caséine cameline).

Siboukeur (2006) a donné, également, une estimation des PM des fractions caséiniques, analysées par électrophorèse sur SDS-PAGE. Selon cet auteur la caséine  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  présentent un PM de 37400 et 28700 Da., respectivement. Alors que la caséine  $\beta$  migre sous forme d'un doublet de poids moléculaire égale à 30700 et 31700 Da., correspondant aux deux variants génétiques de cette fraction. Les trois bandes de caséines, observées dans la présente étude, présentent des PM s'approchant à ceux obtenu par ce dernier auteur. En outre, le spectre de masse de la caséine cameline entière, obtenu par MALDI-TOF, indique la présence de fractions de masse égales à 38076,6 Da., 27898,25 Da., 30847,93 Da., et 23061,62 Da. (figure 25). En comparant ces masses au profil électrophorétique obtenu, ces dernières peuvent être attribuées aux fractions  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , respectivement.



**Figure 25.** Spectre de masse de la caséine cameline obtenue par MALDI-TOF.

Selon le profil électrophorétique obtenu des protéines sériques, six bandes protéiques bien distinctes, sont observées dont deux bandes majeures (figure 23). Par comparaison avec les protéines de références. Ces dernières pourraient correspondre à l' $\alpha$ -Lactalbumine (14000 Da) et à l'Albumine sérique bovine (67000 Da). Les quatre autres bandes ont des PM de l'ordre de 18000, 20000, 40000 Da et 70000 Da.



L'analyse des protéines du lait de dromadaire Algérien (de la race Sahraoui), par électrophorèse sur SDS-PAGE, révèle la présence, dans le lactosérum, de 5 bandes; deux bandes protéiques majeures; pourraient être identiques à l' $\alpha$ -Lactalbumine (14000 Da) et à l'Albumine sérique bovine (67000 Da) et trois autres bandes de PM évalué à 20000, 24000 et 43000 Da (Siboukeur, 2006).

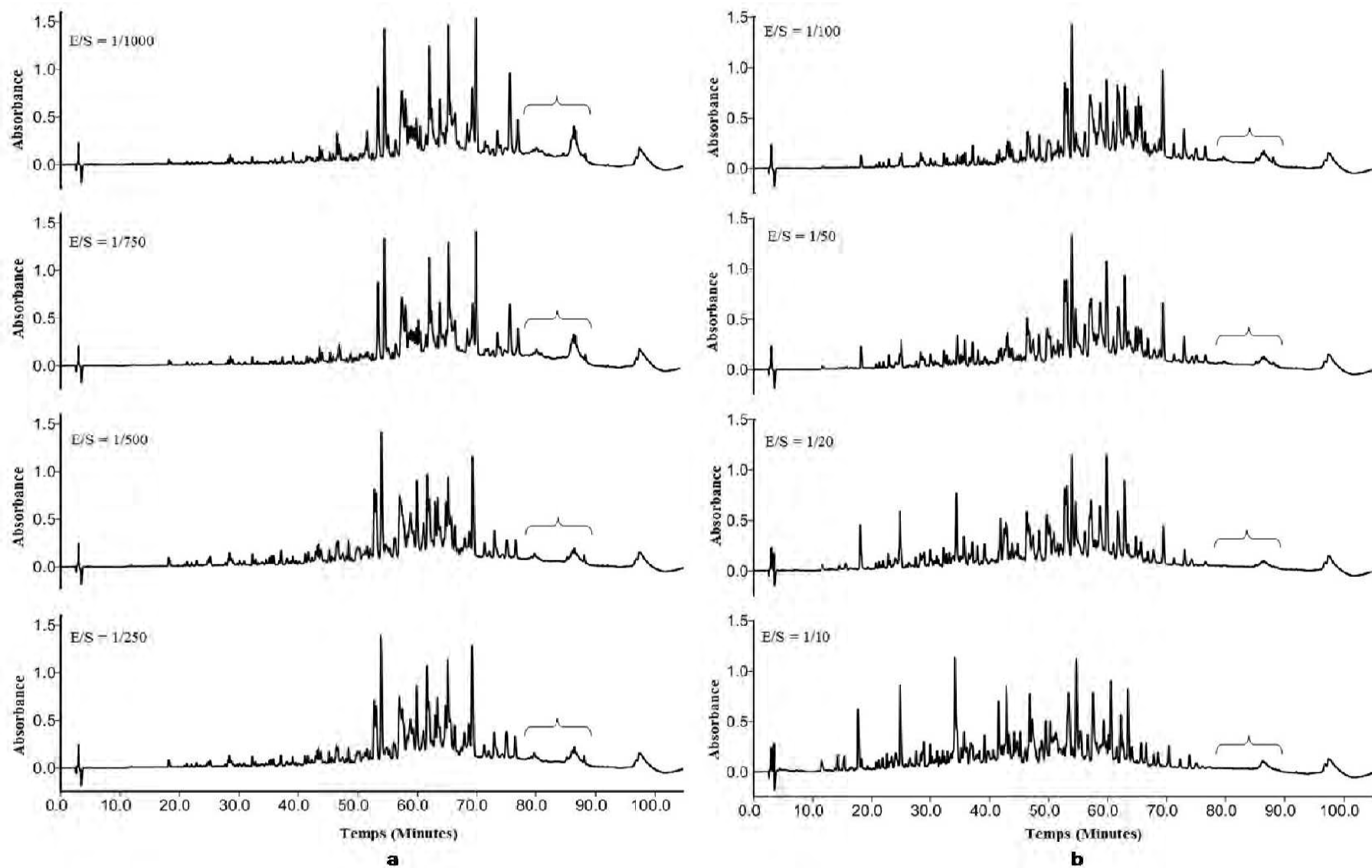
## **II.2. Comportement à la protéolyse de la caséine cameline**

### **II.2.1. Hydrolyse pepsique**

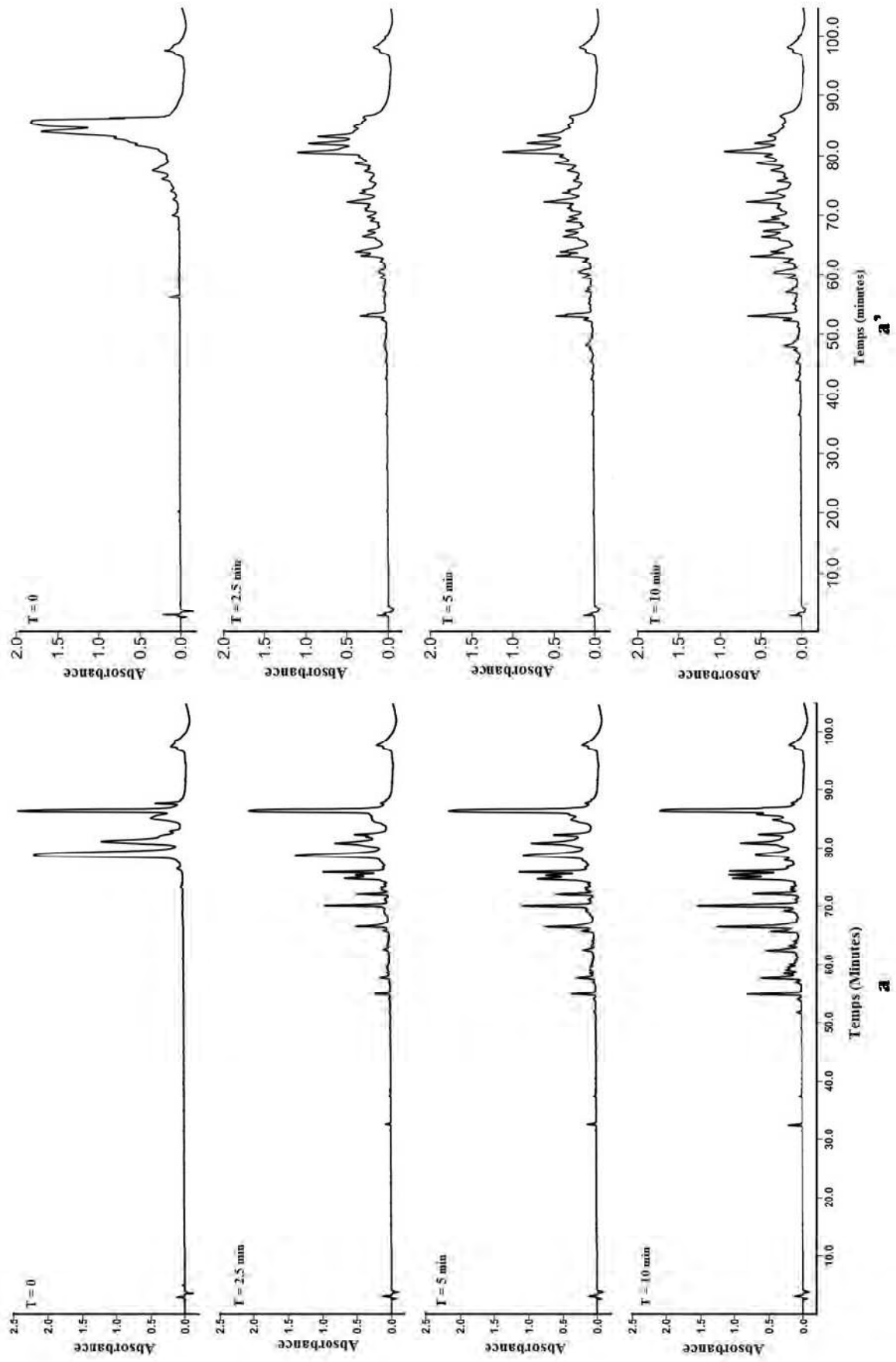
L'hydrolyse pepsique de la caséine cameline est réalisée dans les mêmes conditions indiquées pour la caséine bovine. Le rapport (E/S) appliqué est de 1/100, choisi suite à l'examen des profils HPLC des hydrolysats obtenus à 24 H d'hydrolyse pour les différents rapports (E/S) testés (figure 26).

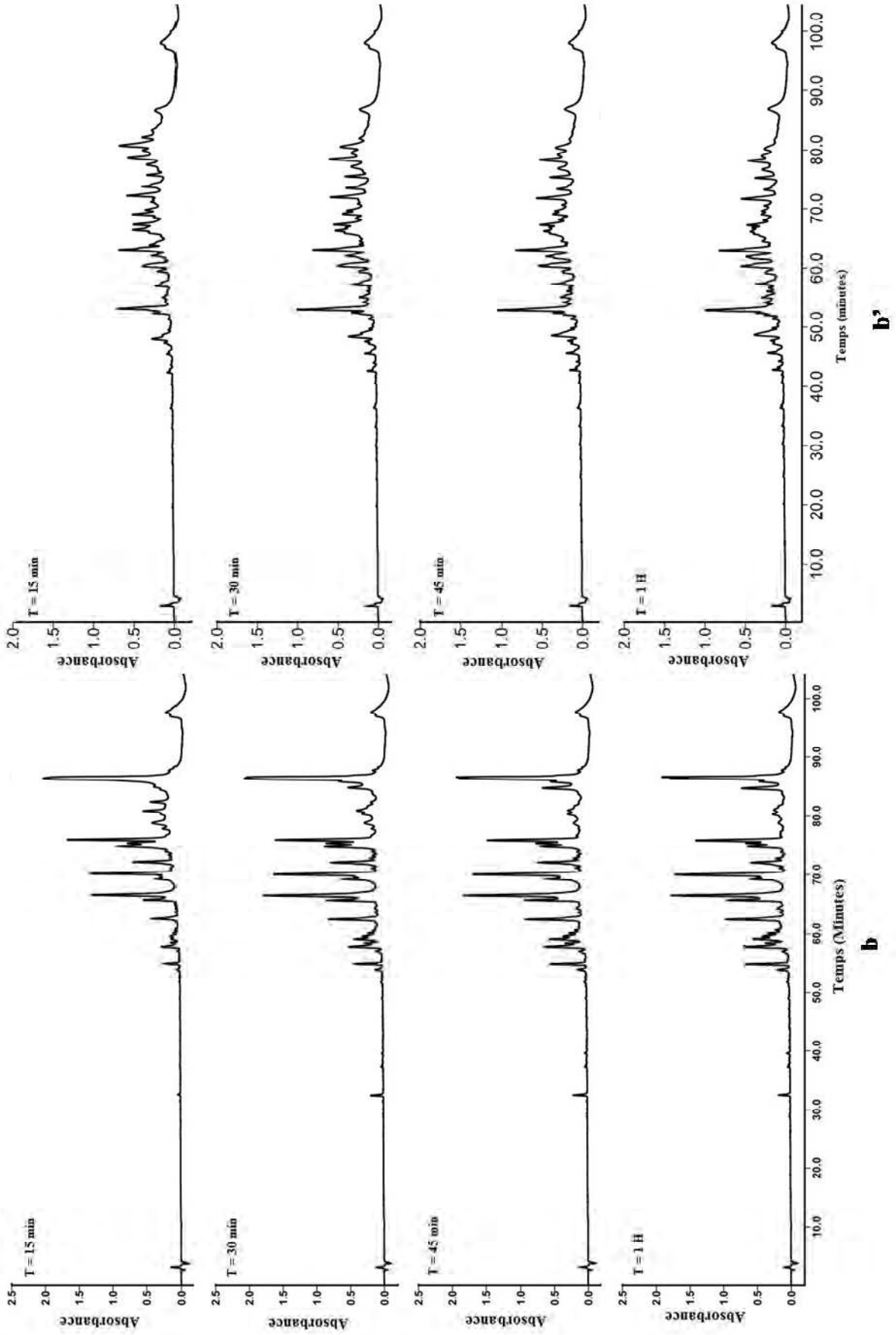
Afin de suivre l'hydrolyse pepsique de la caséine cameline, les hydrolysats prélevés à différents intervalles d'hydrolyse ont été analysés sur RP-HPLC comme indiqué précédemment. La figure 27 montre les chromatogrammes obtenus en comparaison à ceux obtenus pour la caséine bovine. Le profil électrophorétique sur SDS-PAGE de la même cinétique est donné par la figure 28. L'examen des profils HPLC indique une dégradation progressive de la caséine cameline, sous l'action de la pepsine, en peptides intermédiaires qui se dégradent à leur tour pour donner des produits finaux.

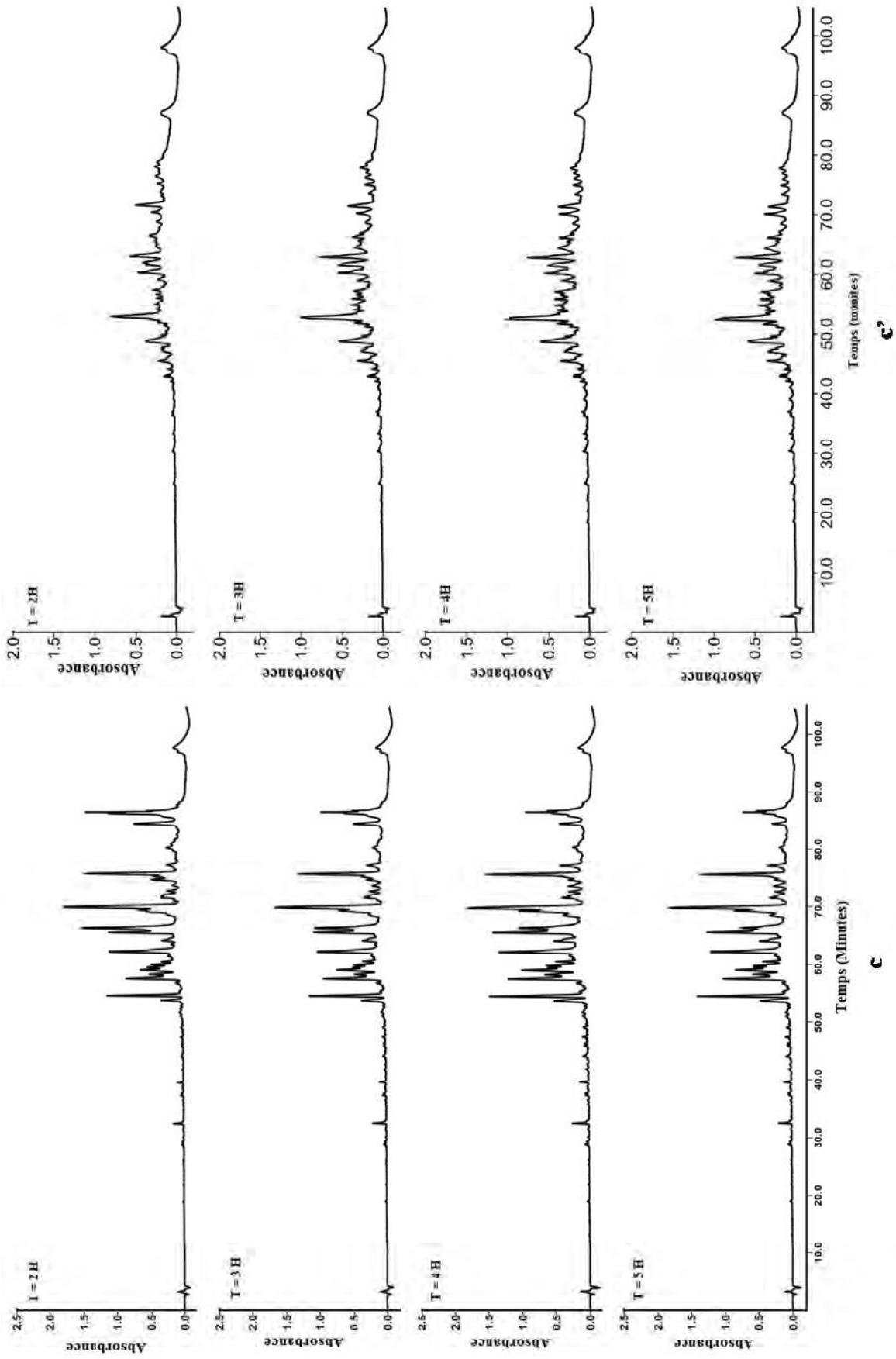
Sous ces conditions d'hydrolyse, le DH passe de 0,71% à 2,5 min d'hydrolyse à 5,08% après 6 H d'hydrolyse, avec une vitesse moyenne d'hydrolyse (exprimée par la variation du DH en fonction du temps) de 0,095% par minute durant la première heure d'hydrolyse. L'hydrolyse se poursuit mais avec une vitesse plus réduite de l'ordre de 0,010%/min entre 2H et 6H. Cependant, dans les mêmes conditions d'hydrolyse, l'action de la pepsine sur la caséine cameline se traduit par des taux de DH plus faibles comparés à ceux notés pour la caséine bovine durant toute la cinétique d'hydrolyse (figure 29) ainsi que pour le DH final mesuré à 24 H d'hydrolyse ( $5,41 \pm 0,057\%$  contre  $8,21 \pm 0,761\%$  pour la caséine cameline et bovine respectivement). En outre, le profil électrophorétique de la cinétique d'hydrolyse de la caséine cameline indique la présence de plusieurs fragments de PM compris entre 15 et 10 kDa après 24 H d'hydrolyse alors que la caséine bovine est complètement hydrolysée en peptides de masses inférieures à 10kDa à partir de 2 H d'hydrolyse (Figure 28).

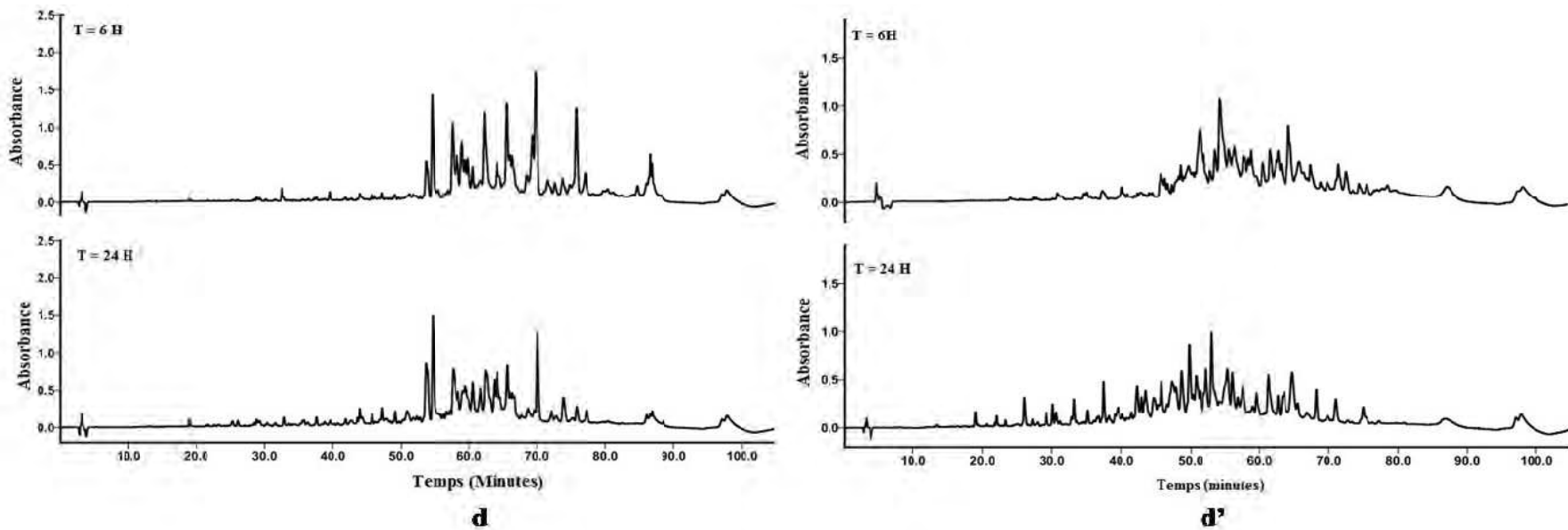


**Figure 26.** Profils HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine cameline obtenus à différents rapports (E/S) par la pepsine à pH 2,5 et à 37°C (L'intervalle de temps de l'éluion du substrat est délimité par une accolade).

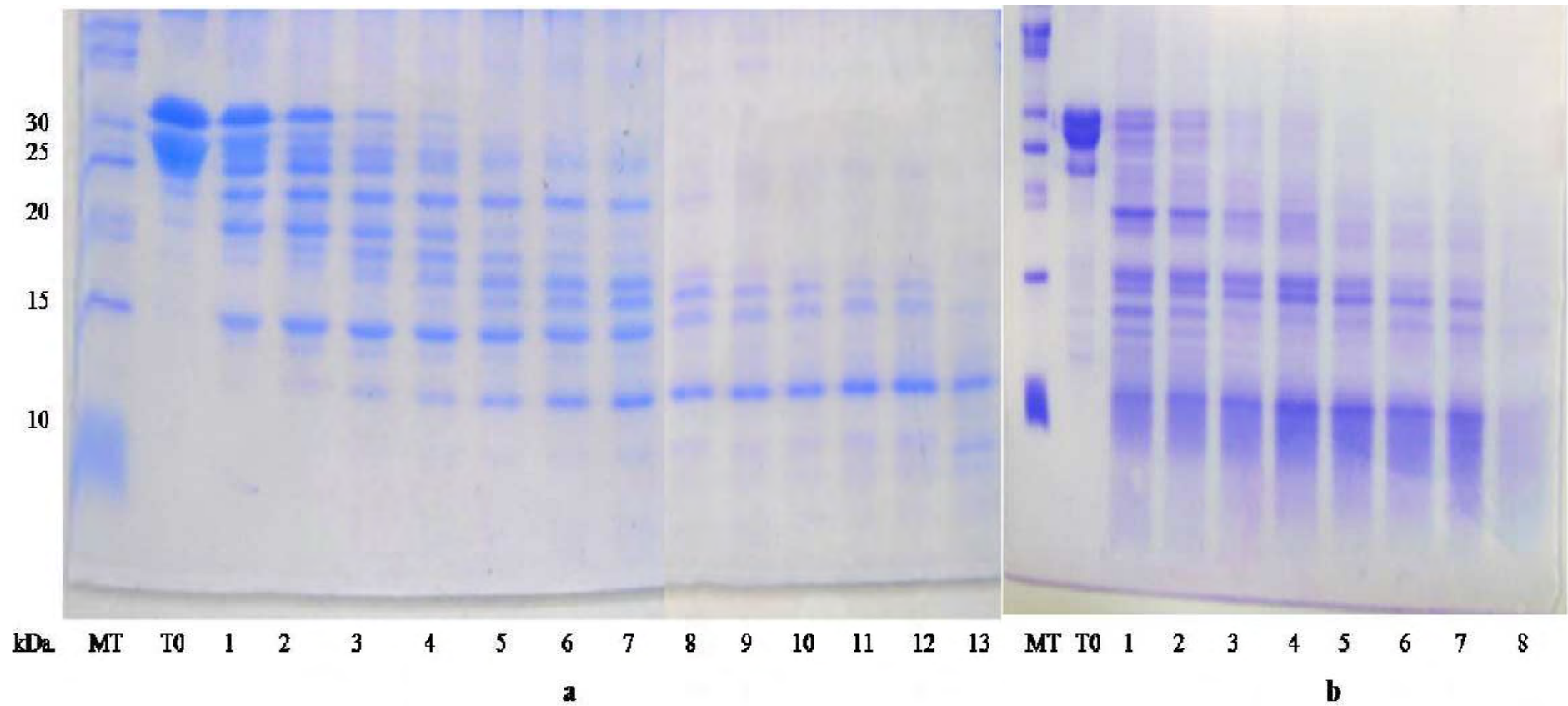




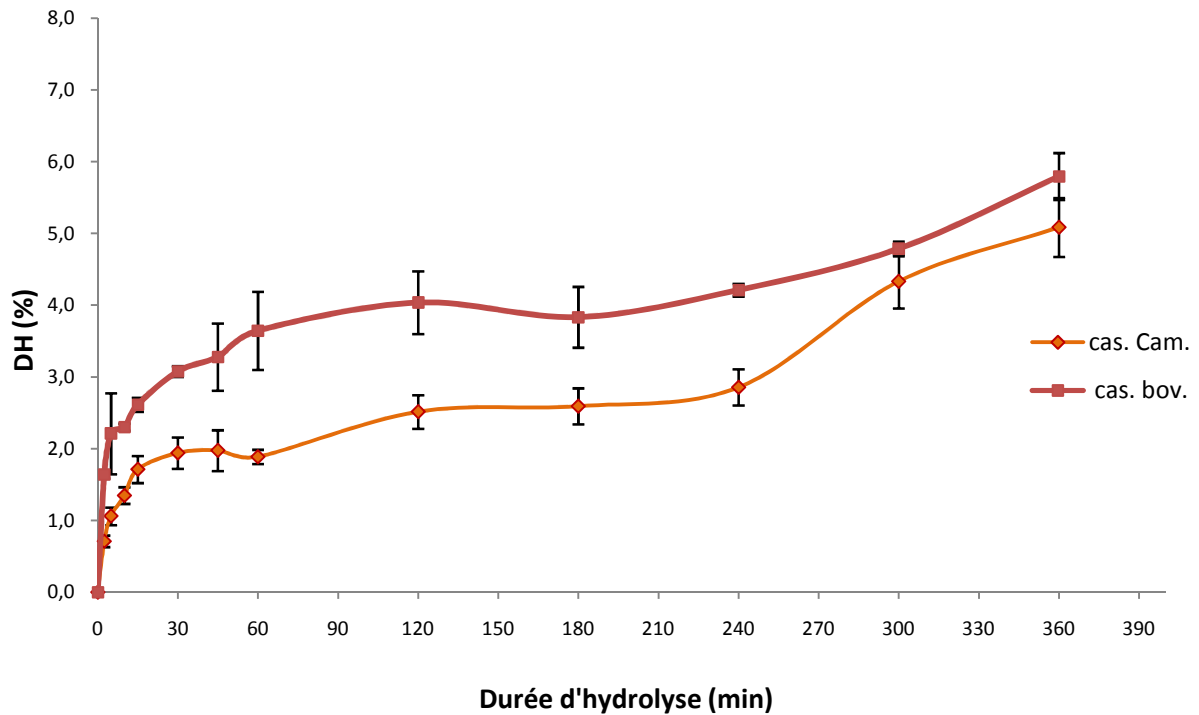




**Figure 27.** Profil HPLC à 215 nm (**a**, **b**, **c** et **d**) de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100 en comparaison à celui de la caséine bovine (**a'**, **b'**, **c'**, **d'**).



**Figure 28.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse pepsique de la caséine cameline (a) en comparaison à celui de la caséine bovine (b). (MT : marqueur de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 : 1 H, 8 : 2 H, 9 : 3 H, 10 : 4 H, 11 : 5 H, 12 : 6H, 13 : 24 H).



**Figure 29.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la pepsine en comparaison à la caséine bovine (E/S =1/100). (cas. cam. : caséine cameline, cas. bov. : caséine bovine).

## II.2.2. Hydrolyse trypsique

L'hydrolyse trypsique de la caséine cameline est réalisée dans les mêmes conditions décrites pour la caséine bovine. Pour le rapport (E/S) appliqué, l'examen des profils HPLC des hydrolysats de 24 heures, indique la disparition totale du substrat pour un rapport E/S de 1/10 (figure 30). Pour des quantités en enzyme plus faible, nous observons la présence de fraction dans le temps d'éluion du substrat (entre 75min et 88min, figure 30). Cependant, du fait que la vitesse d'hydrolyse pour un rapport E/S de 1/10 peut être élevée, nous avons suivie l'hydrolyse pour les rapports E/S de 1/10 et 1/100 (figure 31 et 32).

La dégradation de la caséine cameline par la trypsine semble être rapide. En effet, il ya apparition de produits finaux (temps d'éluion inférieur à 50 min) dès le début de l'hydrolyse (2,5 min). Toutefois, nous observons, la persistance d'une fraction présentant le même temps d'éluion que le substrat pour un rapport E/S de 1/100. Cette fraction est observée, également, sur les profils électrophorétiques sur SDS-PAGE de la même cinétique (figure 33). Cependant,



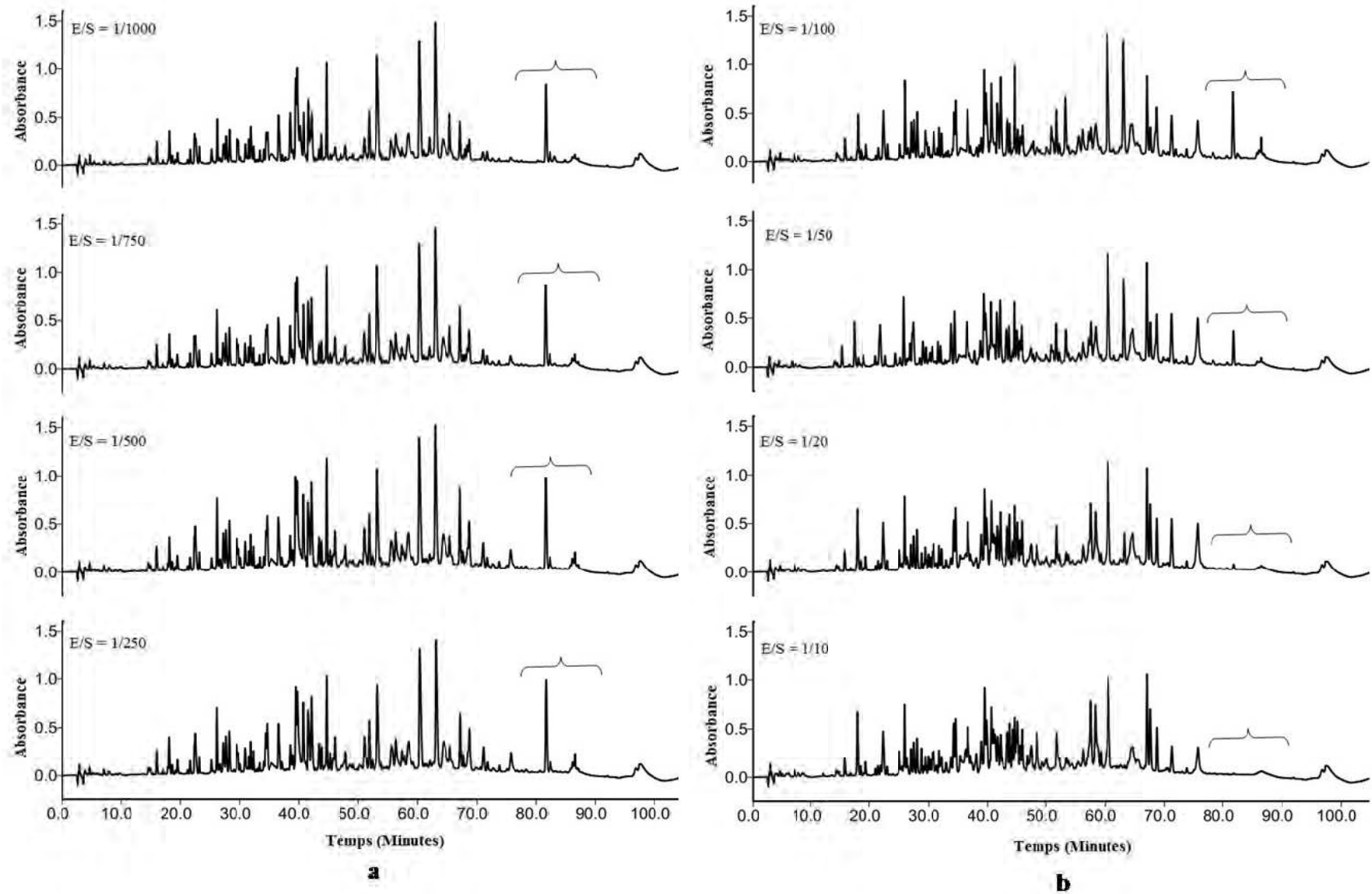
en présence d'une quantité d'enzyme plus importante ( $E/S = 1/10$ ), ce fragment est dégradé après 6 H d'hydrolyse (figure 32).

Salami et coll., (2008) ont étudié la cinétique d'hydrolyse des caséines bovines et camelines par les protéases pancréatiques. Ces derniers indiquent qu'une portion de la caséine  $\beta$  demeure intacte après 15 min d'action de la trypsine pour la caséine bovine et cameline. Alors qu'elle est dégradée sous l'action de la chymotrypsine. Par contre, ces auteurs indiquent la présence de fragments encore détectables sur SDS-PAGE (de l'ordre de 15kDa) sous l'action de la chymotrypsine alors qu'ils disparaissent dans le cas de la trypsine, indiquant l'action assez poussée de cette dernière sur les autres fractions de la caséine. Ces auteurs supposent que cette action limitée sur la caséine  $\beta$  peut être expliquée par le fait que la trypsine possède un nombre de site d'action plus faible sur la caséine  $\beta$  comparé à la caséine  $\alpha$ . Toutefois, l'accessibilité de ces sites est un autre facteur à prendre en considération.

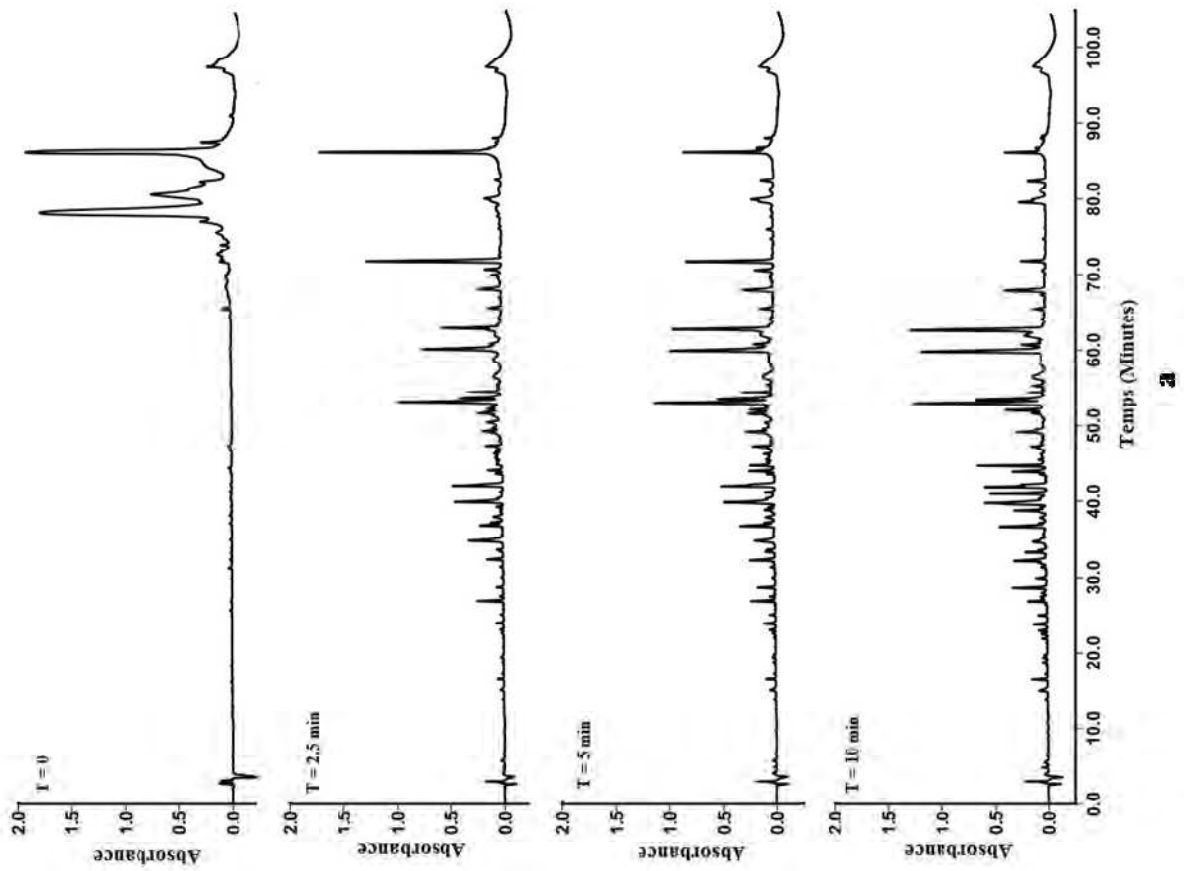
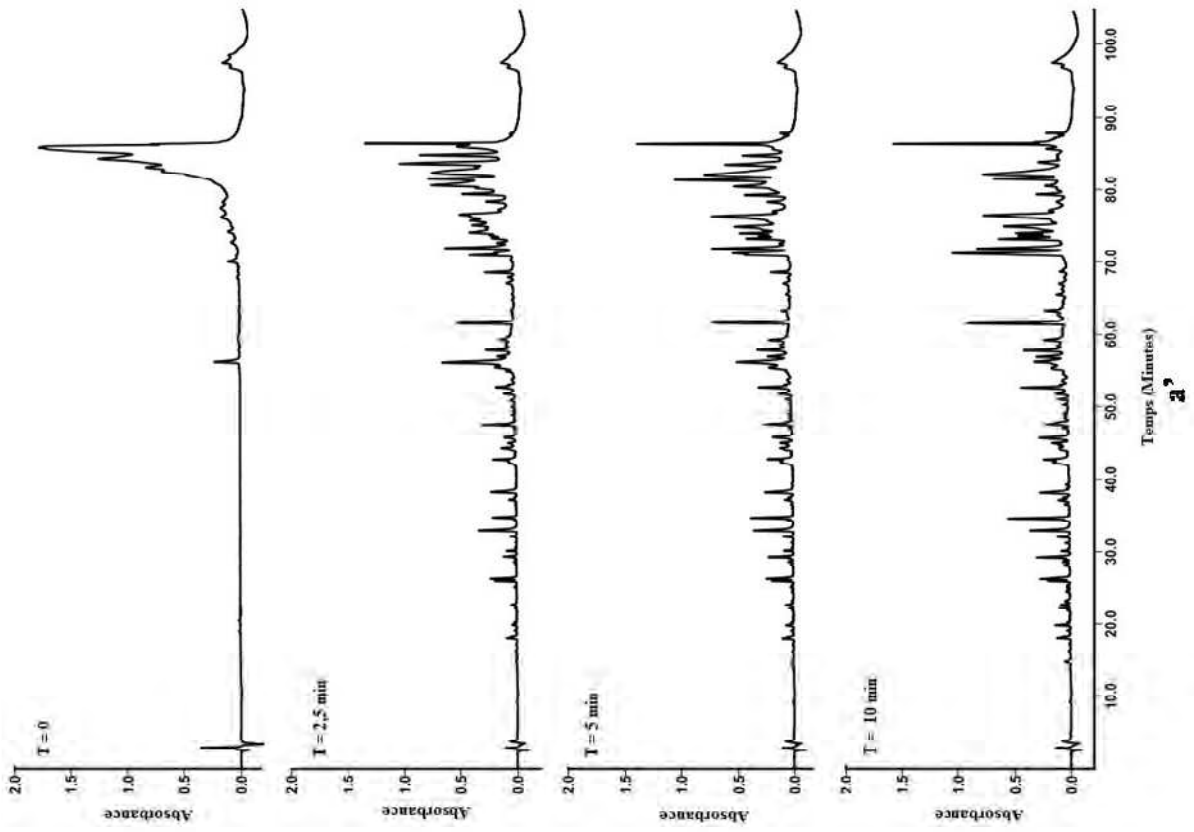
Il faut noter également que cette portion de la caséine  $\beta$  paraît plus résistante à l'action de la trypsine dans le cas du lait camelin comparé à celle du lait bovin. En effet, à 1/100 du rapport ( $E/S$ ) et dans les mêmes conditions d'hydrolyse, ce fragment est dégradé après 24 H d'hydrolyse pour la caséine bovine alors qu'il persiste dans le cas de la caséine cameline (figure 31).

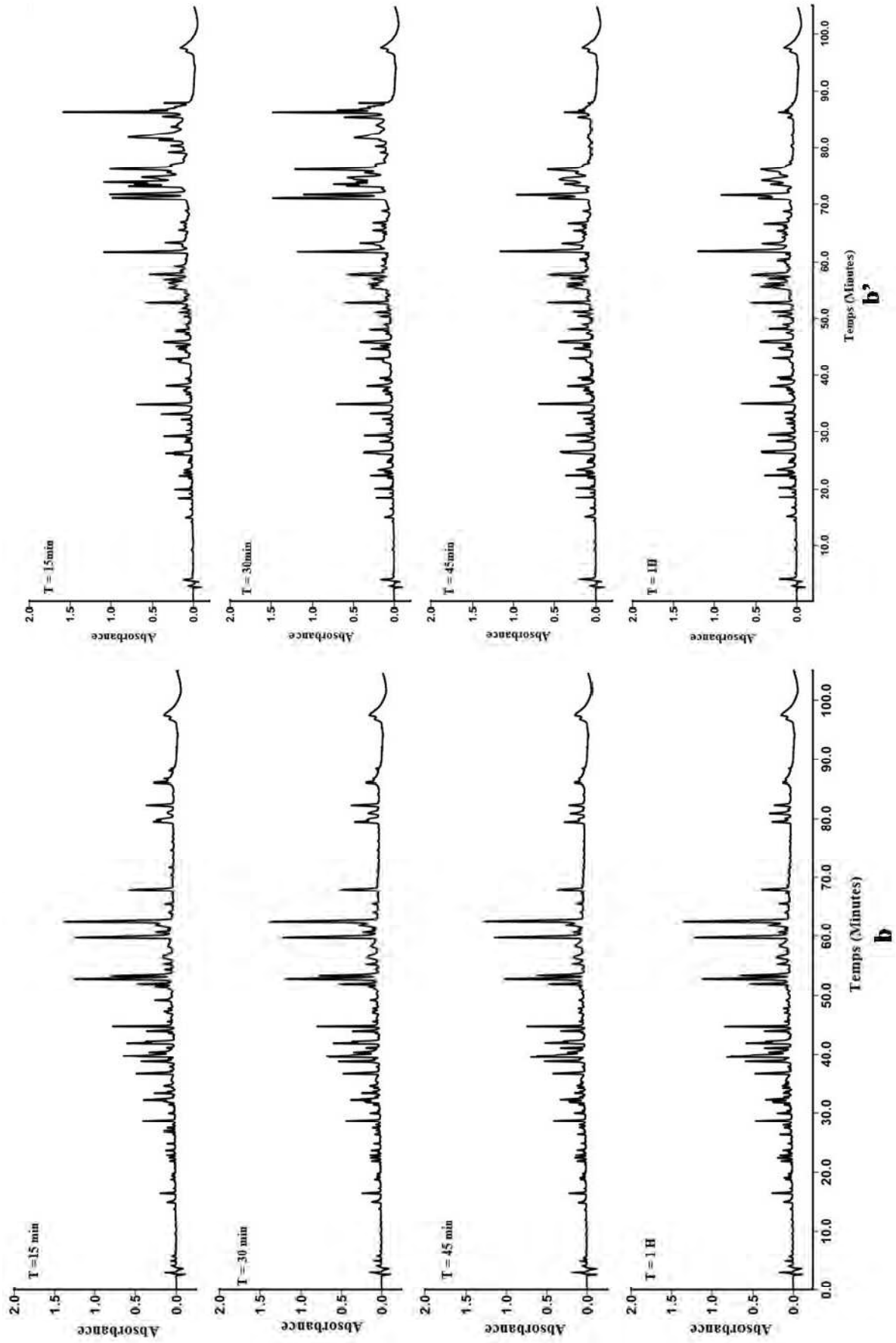
Sous l'action de la trypsine, Le DH de la caséine cameline passe de 1,33 % à 2,5 min d'hydrolyse à 7,55 % après 6 H d'hydrolyse (figure 34), à une vitesse moyenne de 0,18% /min durant les 30 premières minutes d'hydrolyse. Par la suite la vitesse moyenne diminue pour atteindre une valeur de 0,019% /min entre 30 min et 2 H d'hydrolyse. A partir de ce point, la vitesse d'hydrolyse tend à s'annuler (les valeurs du DH notées sont dans le même intervalle d'écart type).

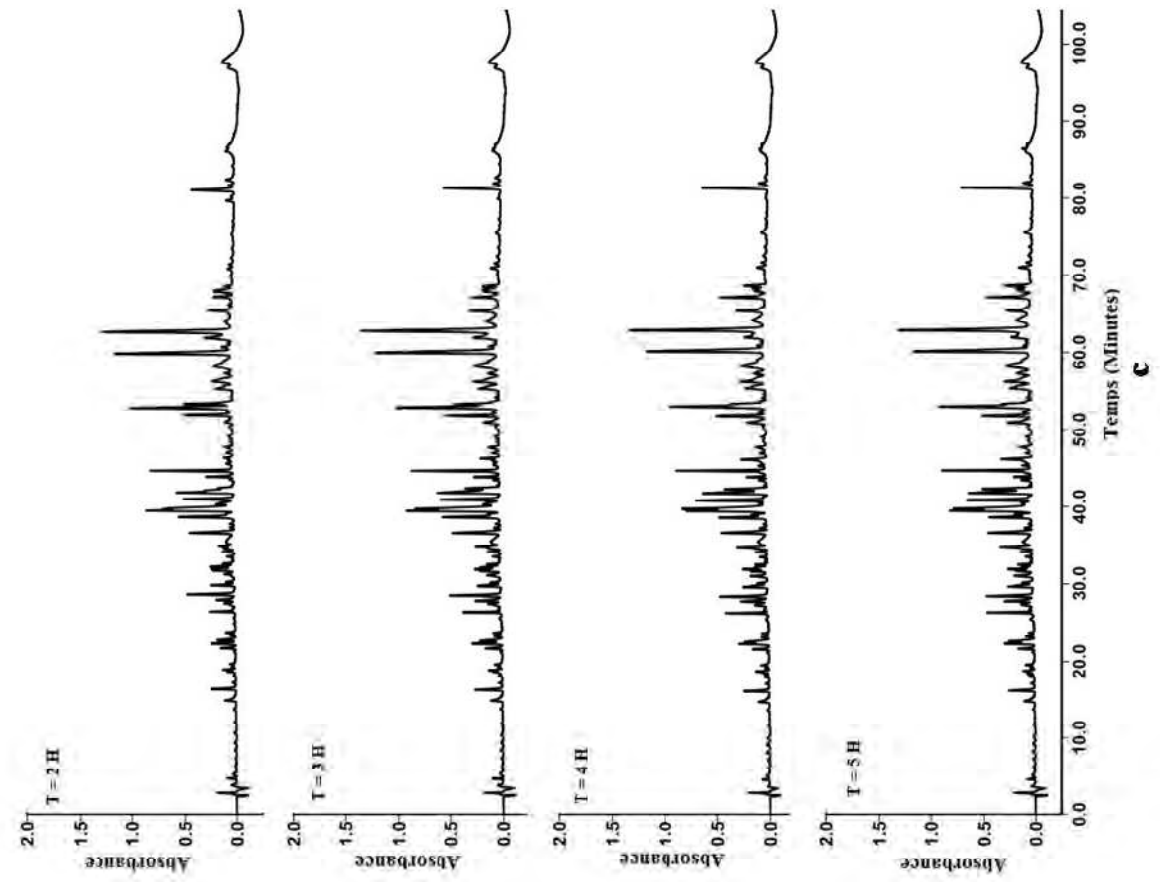
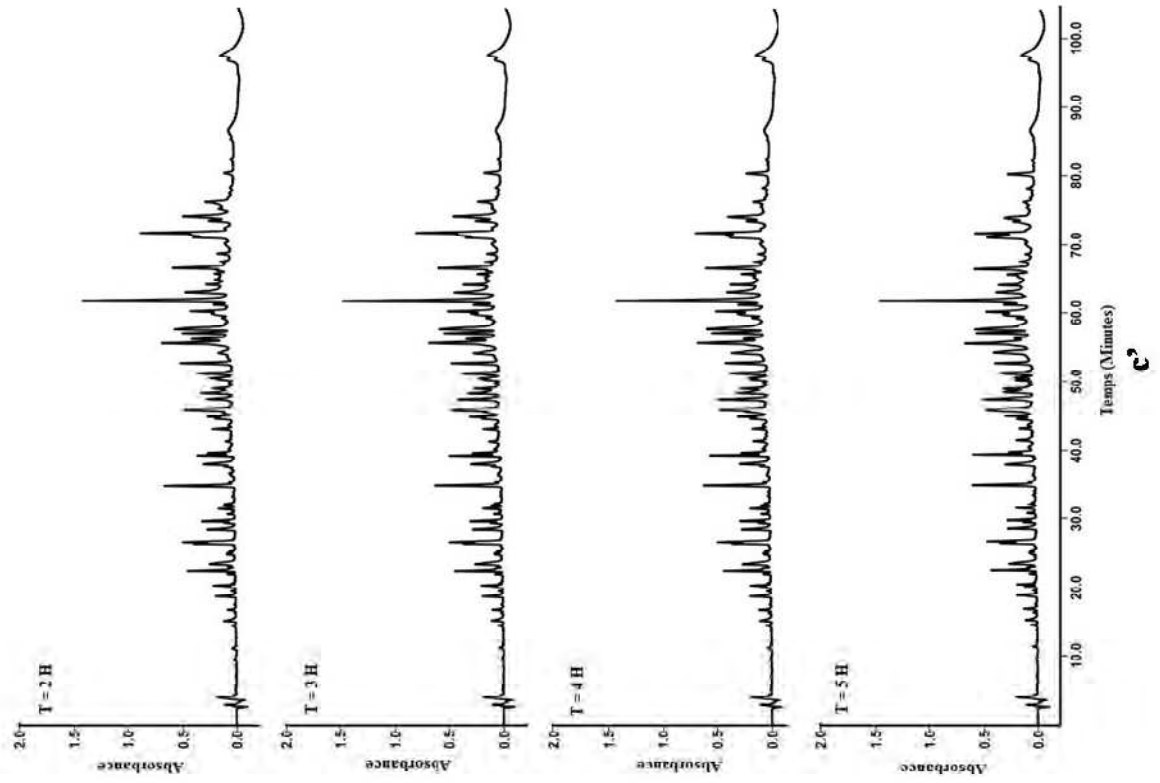
Les valeurs du DH notées durant 6 H l'hydrolyse ainsi que le DH final mesuré à 24 H d'hydrolyse indiquent une action moins poussée de la trypsine sur la caséine cameline comparé à la caséine bovine ( $8,94 \pm 0,106$  % contre  $9,91 \pm 0,409$  % pour la caséine cameline et bovine respectivement).

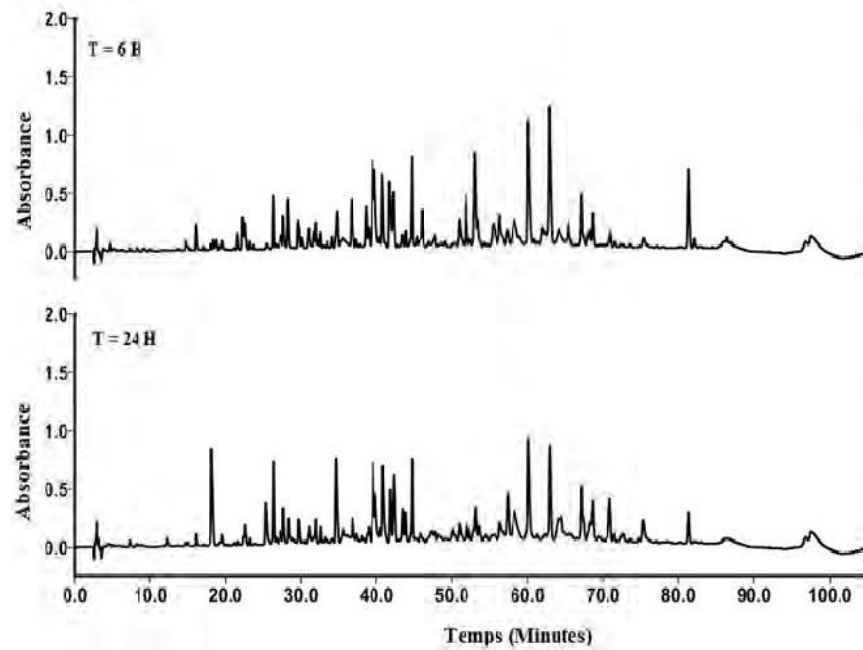
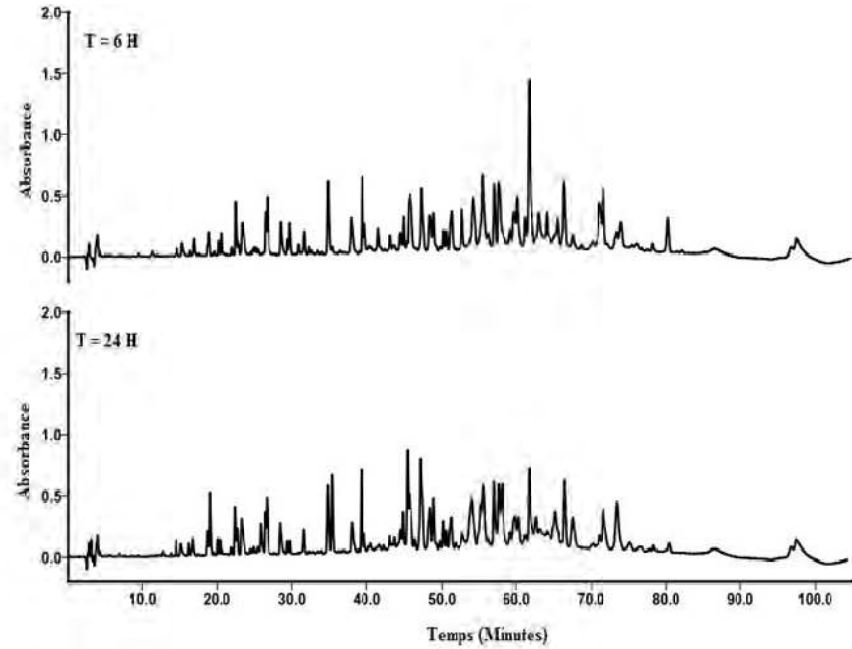


**Figure 30.** Profil HPLC (a et b) des hydrolysats de 24 H de la caséine cameline à différents rapports (E/S) par la trypsine à pH 7,8 et à 37°C (L'intervalle de temps de l'éluion du substrat est délimité par une accolade).

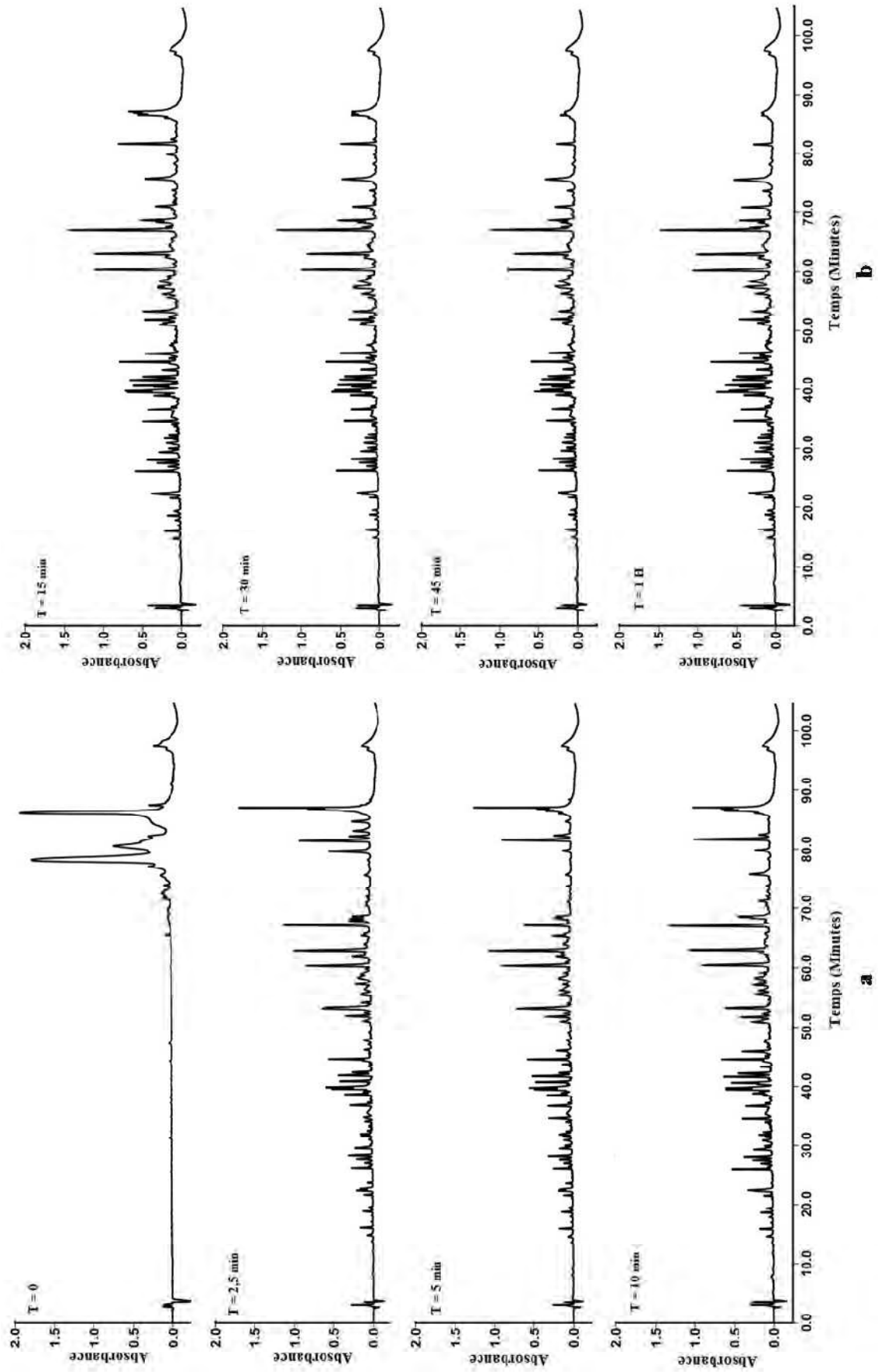


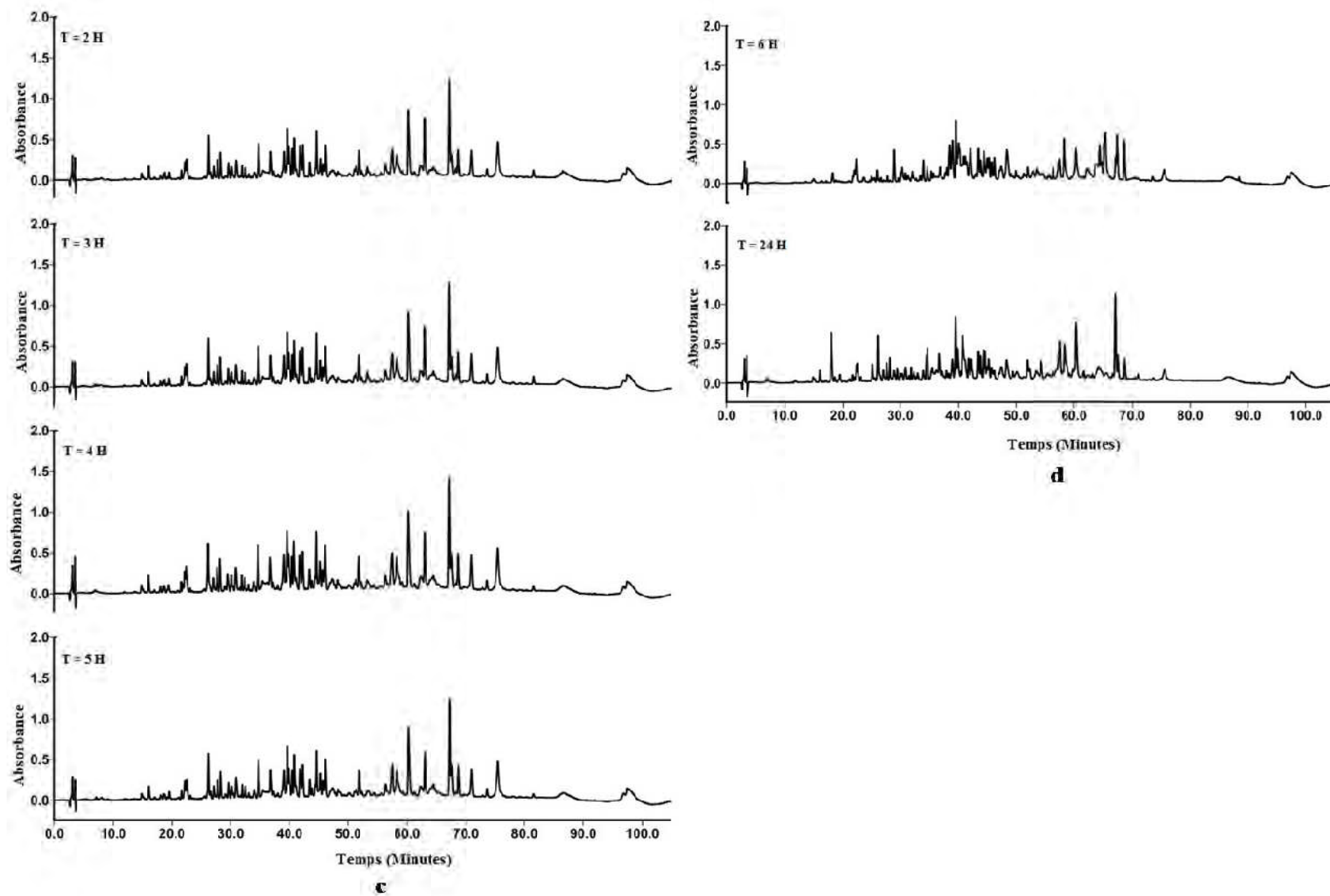




**d****d'**

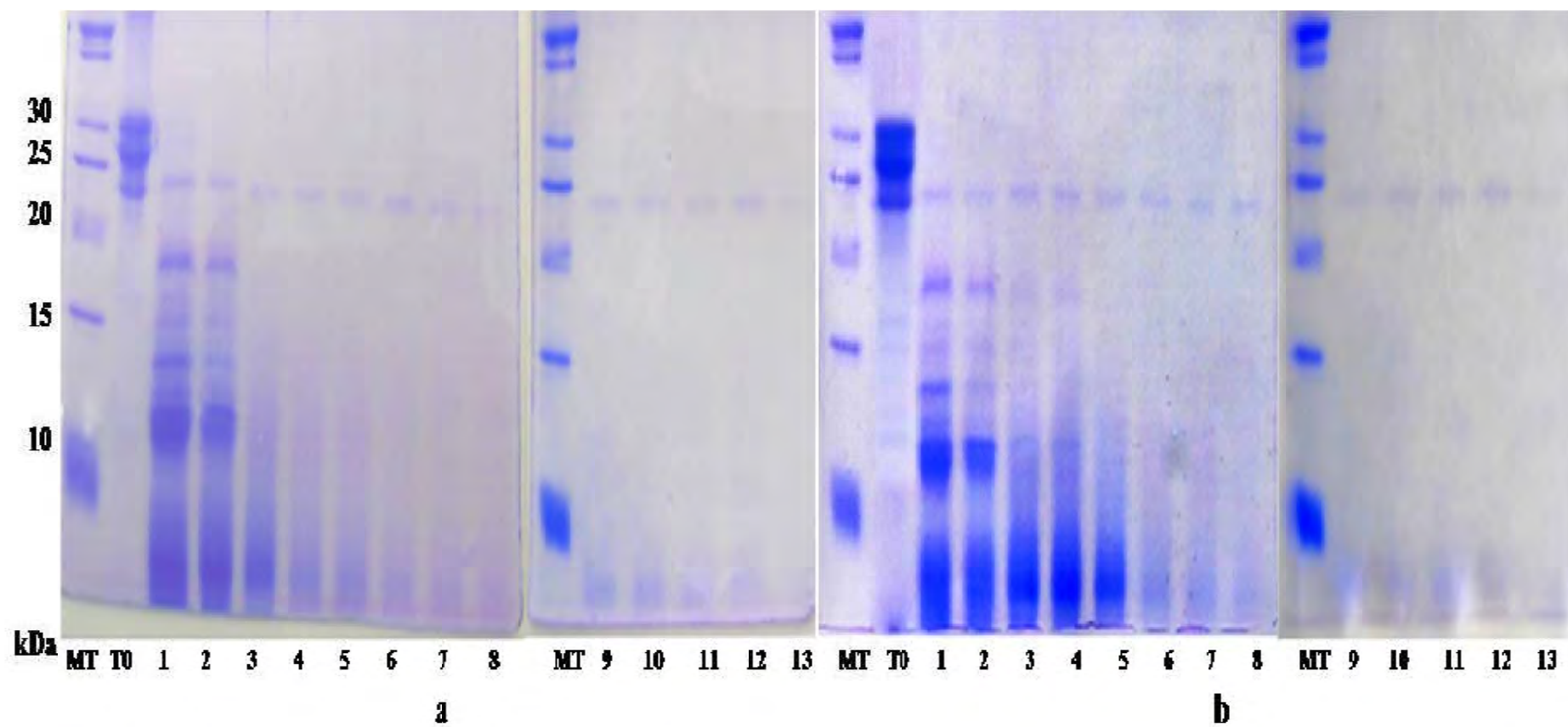
**Figure 31.** Profil HPLC à 215 nm (**a**, **b**, **c** et **d**) de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100 en comparaison à celui de la caséine bovine (**a'**, **b'**, **c'**, **d'**).



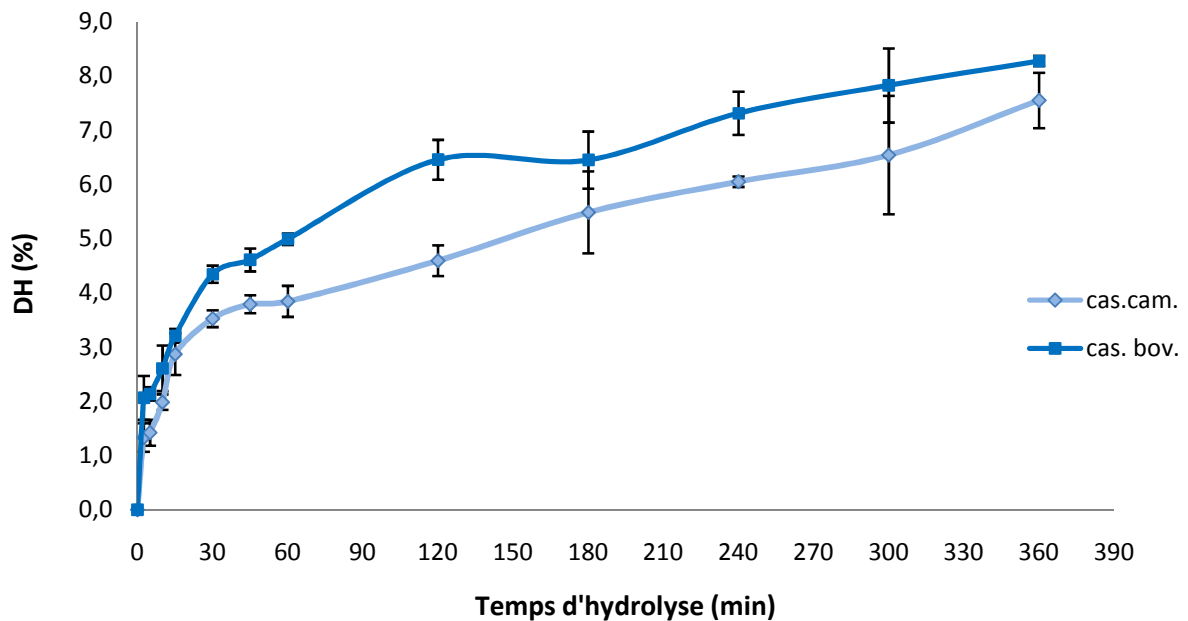


**Figure 32.** Profil HPLC à 215 nm de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/100.





**Figure 33.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse trypsique de la caséine cameline (a) en comparaison à celui de la caséine bovine (b). (MT : marquer de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 :1 H, 8 :2 H, 9 :3 H, 10 : 4 H, 11 : 5 H, 12 : 6H, 13 : 24 H).

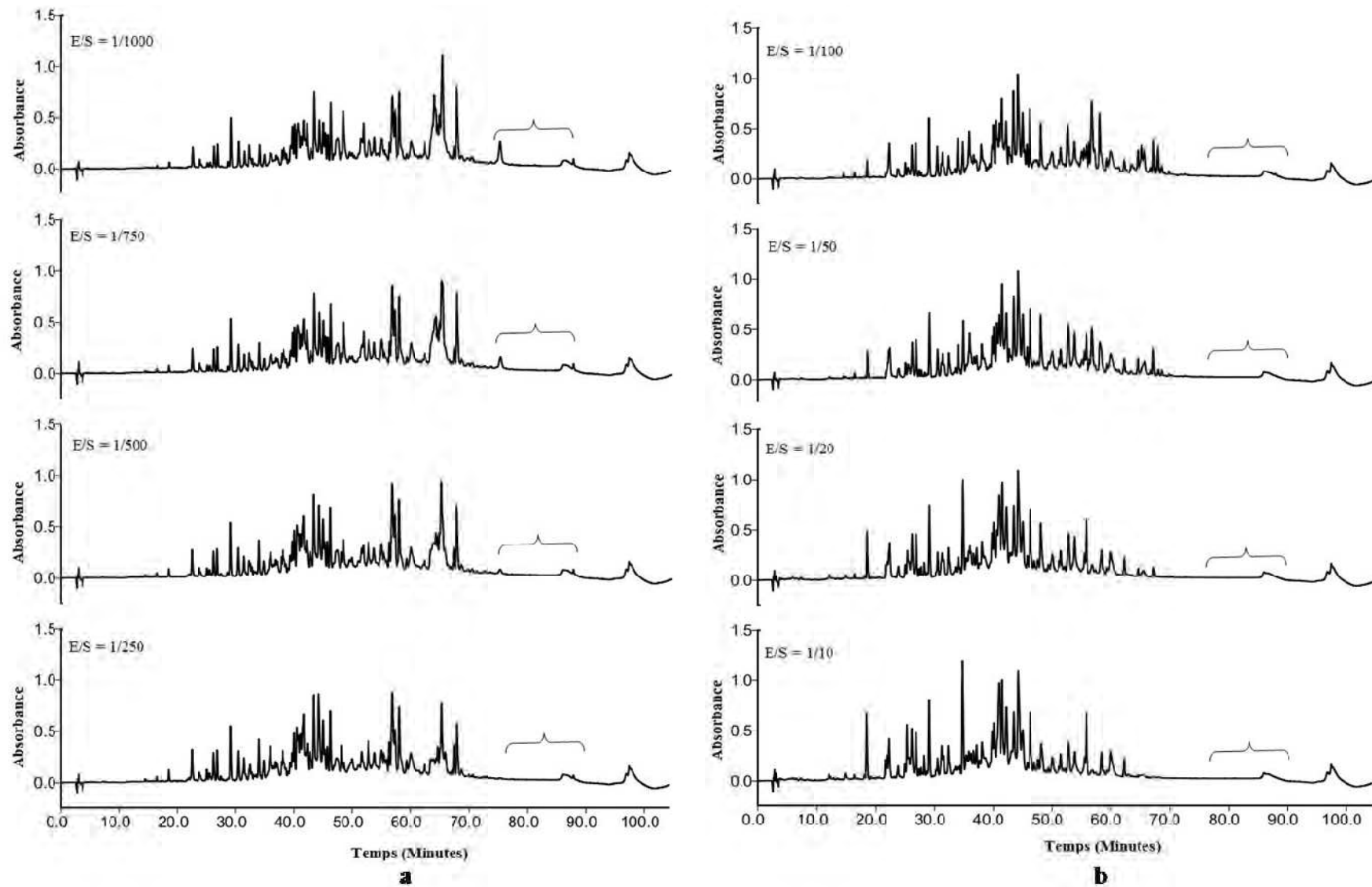


**Figure 34.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la trypsine en comparaison à la caséine bovine (E/S = 1/100). (cas. cam. : caséine cameline, cas. bov. : caséine bovine).

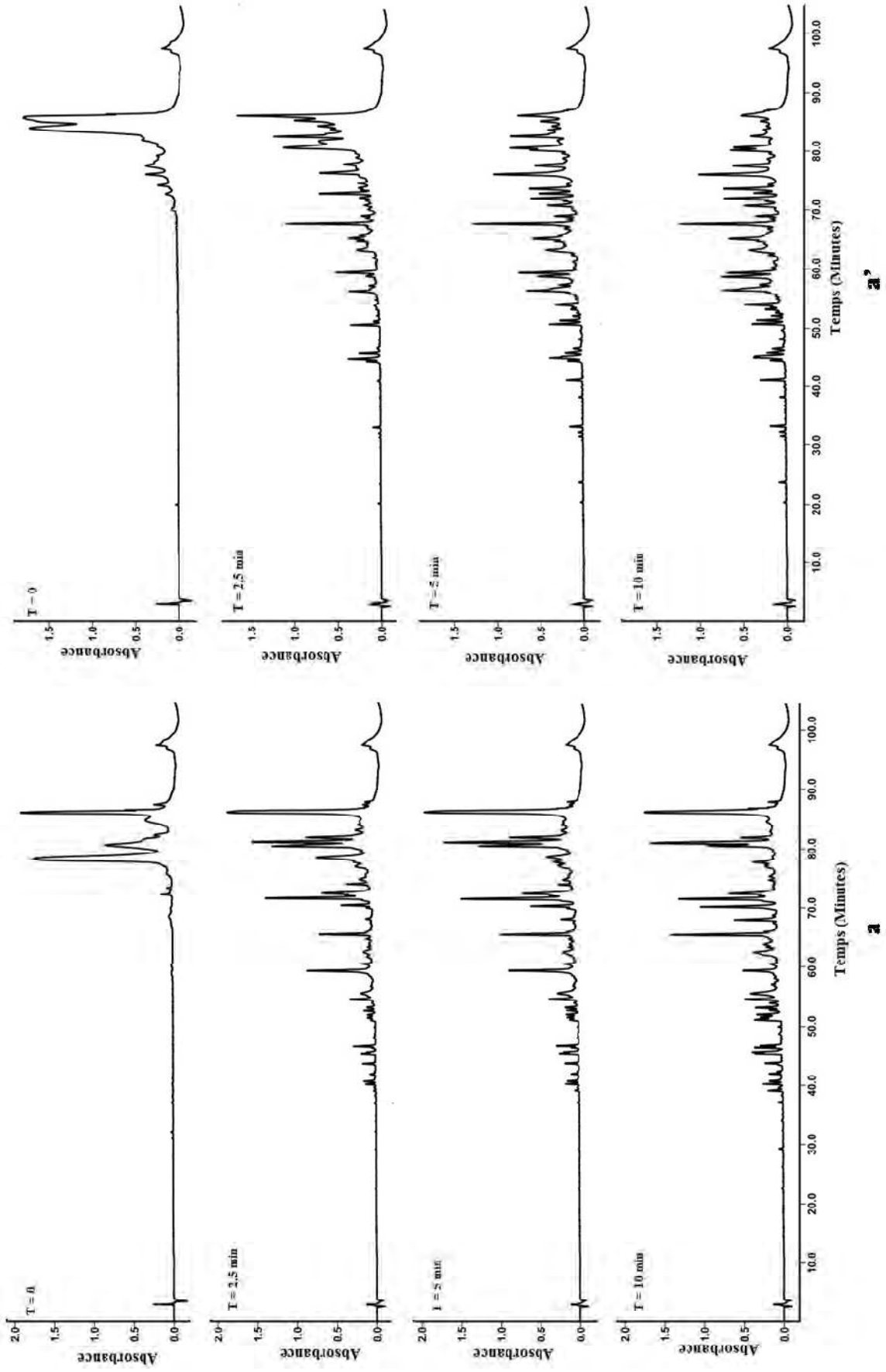
### II.2.3. Hydrolyse chymotrypsique

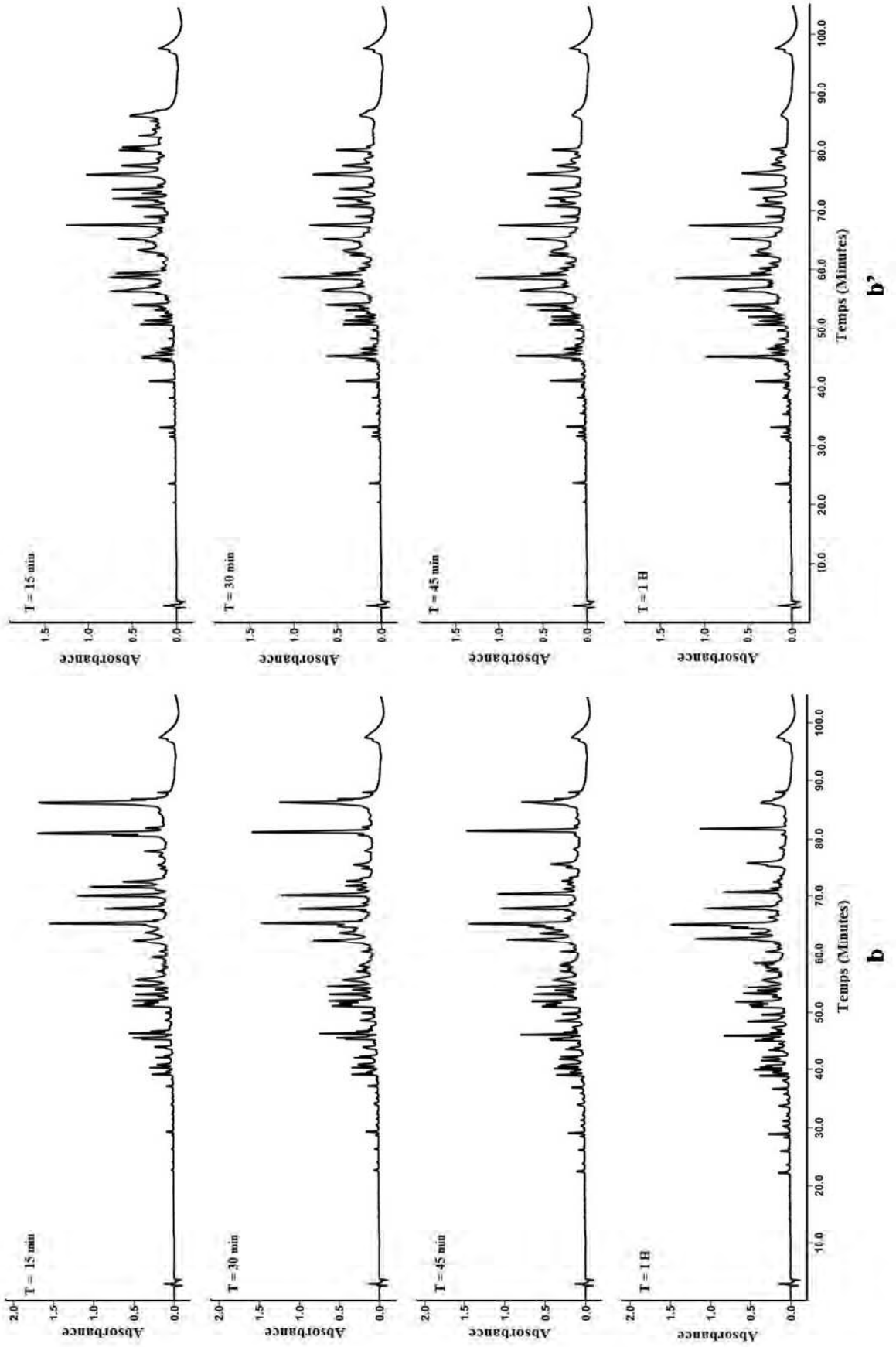
L'hydrolyse de la caséine cameline par la chymotrypsine est réalisée dans les mêmes conditions indiquées pour l'hydrolyse de la caséine bovine. Le rapport (E/S) appliqué est de 1/250 pour lequel nous avons observé une disparition totale du substrat (figure 35). Pour des quantités en enzyme plus faibles, nous observons la présence, d'une fraction résiduelle dans le temps d'éluion du substrat.

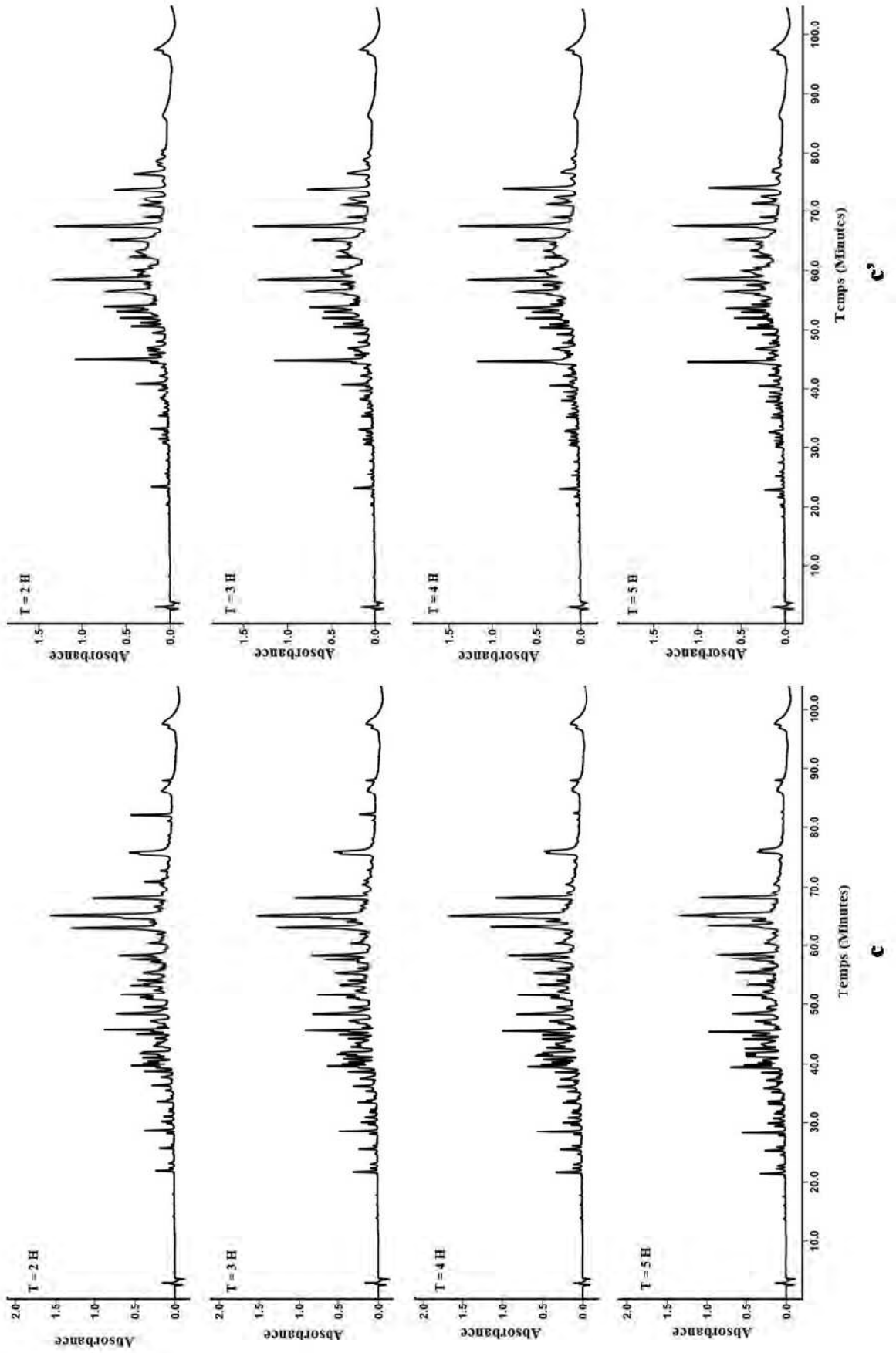
Les profils HPLC de la cinétique d'hydrolyse (à E/S = 1/250) sont donnés dans la figure 36. L'action de la chymotrypsine sur la caséine cameline se caractérise par une dégradation progressive du substrat en peptides intermédiaires qui sont hydrolysés à leur tour en peptides finaux (temps inférieur à 40 min). La concentration de ces peptides augmente au fur et à mesure de l'évolution de l'hydrolyse, qui se traduit par l'augmentation du l'air des fractions correspondantes. La dégradation progressive de la caséine cameline par la chymotrypsine est observée également sur le profil électrophorétique sur SDS-PAGE (figure 37). Il semble que l'action de la chymotrypsine et de la trypsine sur la caséine cameline, suit également un mécanisme intermédiaire entre le mécanisme « one by one » et zipper, (Choisnard et coll., 2002 ; Srividhya et Schnell, 2006).

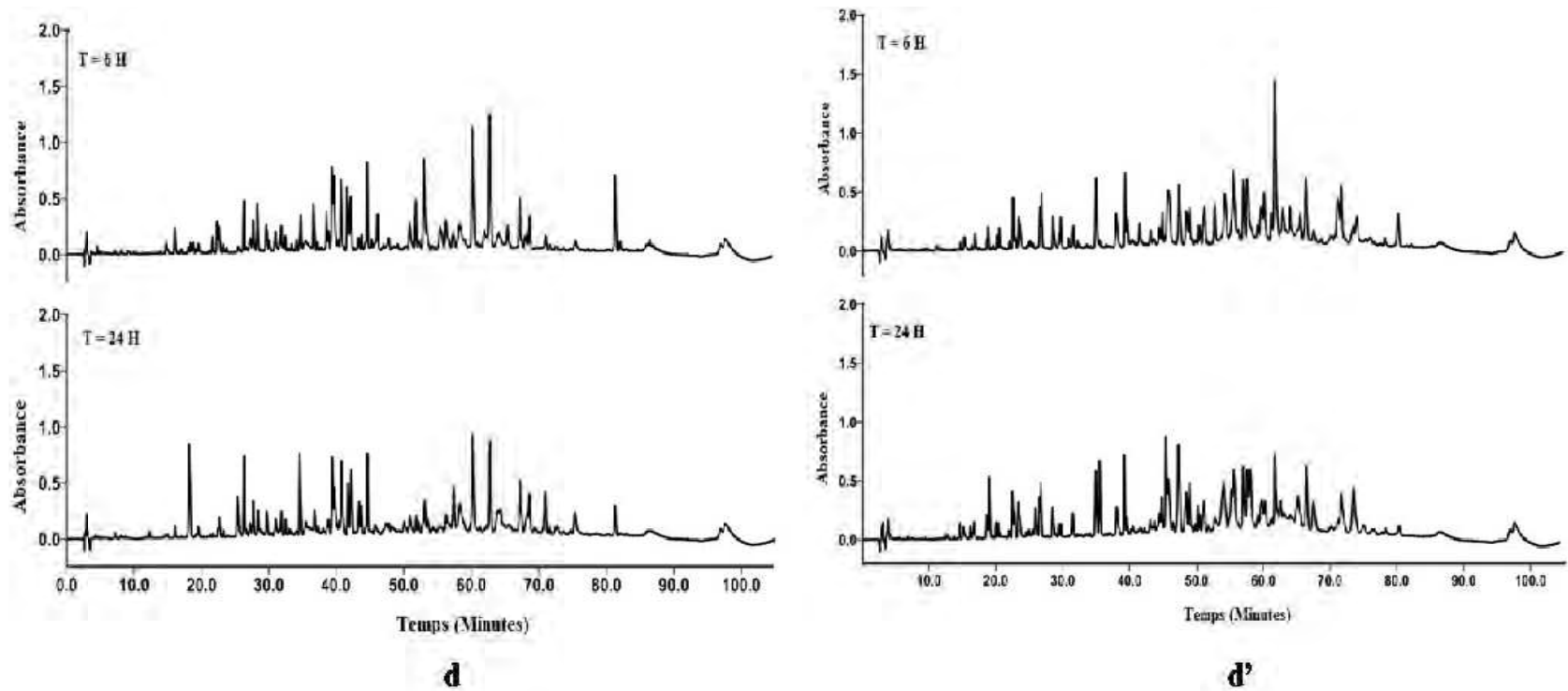


**Figure 35.** Profil HPLC (**a** et **b**) des hydrolysats chymotrypsique de 24 H de la caséine cameline à différents rapports (E/S) à pH 7,8 et à 37°C. (L'intervalle de temps de l'éluion du substrat est délimité par une accolade).

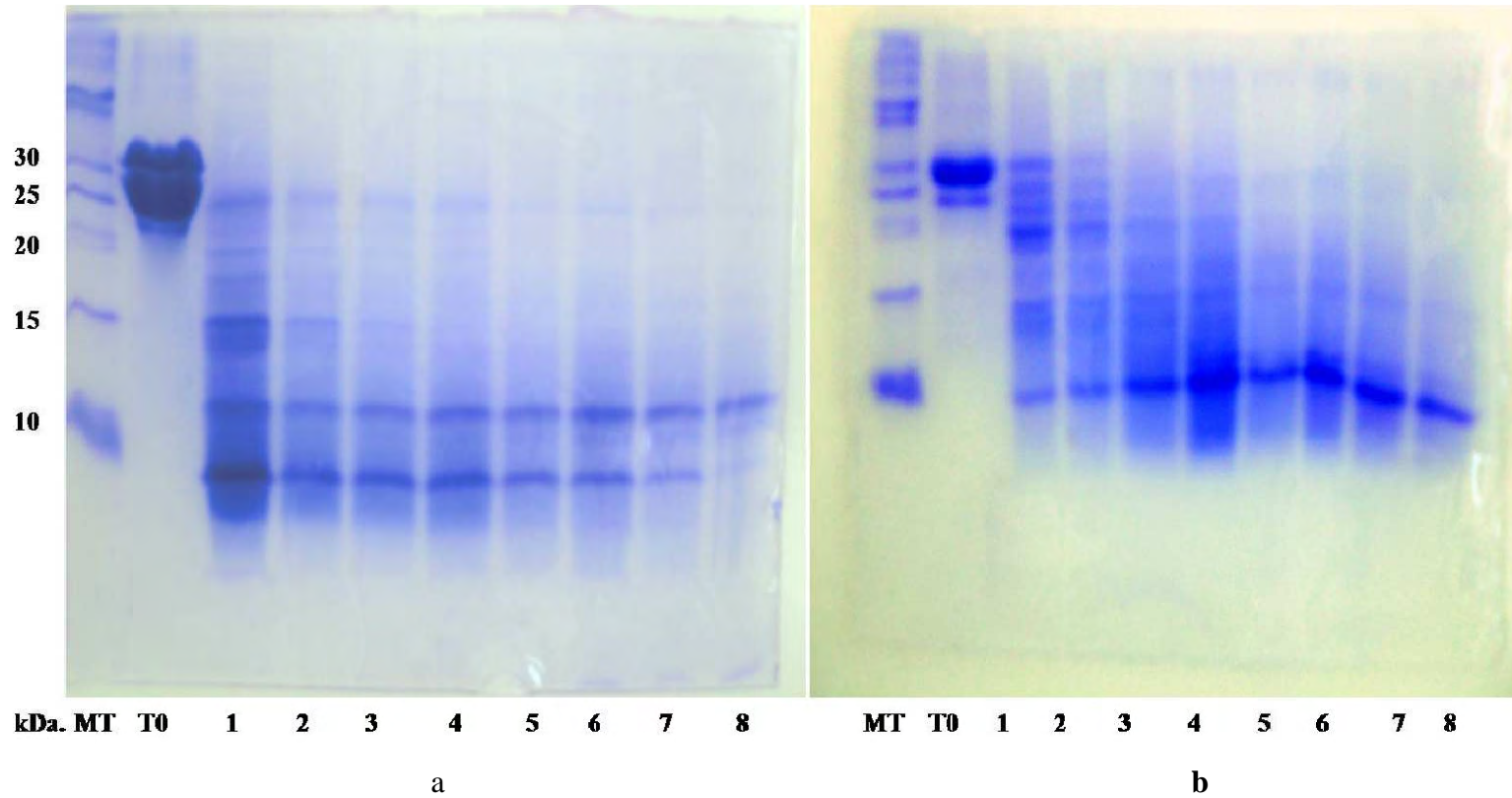








**Figure 36.** Profil HPLC à 215 nm (**a**, **b**, **c** et **d**) de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine cameline à pH 2,5 et à 37°C, E/S = 1/250 en comparaison à celui de la caséine bovine (**a'**, **b'**, **c'**, **d'**).

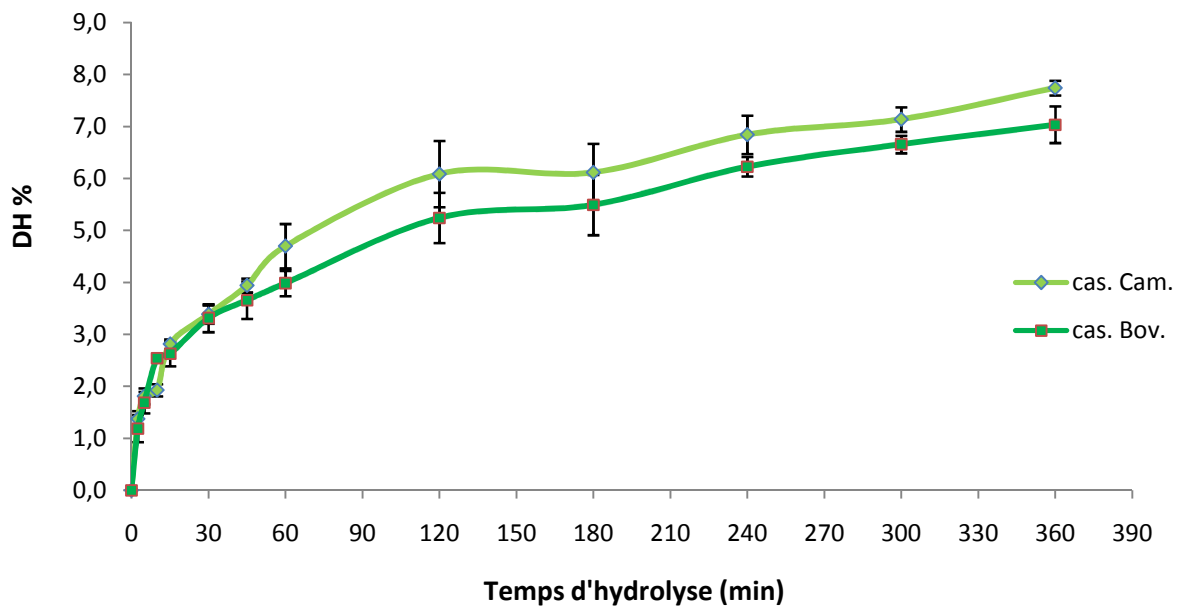


**Figure 37.** Profil électrophorétique sur SDS-PAGE à 15% de la cinétique d'hydrolyse chymotrypsique de la caséine cameline (**a**) en comparaison à celui de la caséine bovine (**b**) (MT : marqueur de taille, T0 : 0 min, 1 : 2,5min, 2 : 5 min, 3 : 10 min, 4 : 15 min, 5 : 30 min, 6 : 45 min, 7 :1 H, 8 :2 H).



Sous l'action de la chymotrypsine, le DH de la caséine cameline passe de 1,37% à 2,5 min d'hydrolyse à 7,74% après 6H d'hydrolyse (figure 38). Toutefois nous avons noté une vitesse moyenne de 0,19% par minute durant les 30 premières minutes d'hydrolyse. Par la suite la vitesse moyenne diminue pour atteindre une valeur de 0,037% /min entre 30 min et 2 H d'hydrolyse. Jusqu'à 6 H, l'hydrolyse se poursuit à une vitesse qui tend à s'annuler vue que les valeurs du DH notées sont très rapprochées avec des différences non significatives (comprises dans le même intervalle d'écart type).

La chymotrypsine montre une action sur la caséine cameline comparable à celle notée sur la caséine bovine. En effet, les valeurs du DH obtenues pour les deux cinétiques sont comparables (figure 39) pour les deux types de protéines ainsi que pour le DH final noté à 24 H d'hydrolyse ( $8,80 \pm 0,205$  % contre  $8,70 \pm 0,413$  % pour la caséine cameline et bovine, respectivement).



**Figure 38.** Evolution, en fonction du temps, du degré d'hydrolyse (DH) de la caséine cameline sous l'action de la chymotrypsine en comparaison à la caséine bovine (E/S =1/250) (cas. Cam. : caséine cameline, cas. Bov. : caséine bovine).

### II.3. Mise en évidence de peptides à activité antimicrobienne dans les 'hydrolysats de la caséine cameline

L'activité antimicrobienne est recherchée dans les différents hydrolysats de caséine cameline préparés sous l'action des trois protéases utilisées. L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé comme indiqué précédemment. Les hydrolysats sont testés contre 4 souches à Gram-positif ; *Bacillus subtilis* **ATCC 6633**, *Listeria innocua* **LMG 11387**, *Listeria. monocytogenes* **ATCC 3512**, *Staphylococcus aureus* **CIP 4.83** et 3 souches à Gram-négatif : *Escherichia coli* **JM 109**, *Escherichia coli* **DH5a** et *E. coli* **CIP 54127**.

Sous les conditions d'hydrolyses imposées, seule l'action de la pepsine à pu générer des peptides antimicrobiens (tableau 7). Bien que, l'activité a été recherchée dans les hydrolysats obtenus à différents intervalles de temps d'hydrolyse et à différents rapports E/S pour les trois protéases employées. Comme observé pour la caséine bovine l'hydrolyse de la caséine cameline par la trypsine et/ou la chymotrypsine (dans les conditions d'hydrolyse appliquées à ces protéases) ne donne pas de peptides antimicrobiens actifs sur les différentes souches testées.

Quant à l'action de la pepsine sur la caséine cameline, des zones d'inhibition nettes sont observées sur la souche *E. coli* **CIP 54127** pour les hydrolysats obtenus à partir de 10 min d'hydrolyse (figure 39). Ainsi, afin de séparer les peptides actifs, l'hydrolysat correspondant à 3 heures d'hydrolyse a été fractionné sur HPLC en phase inverse en colonne C18 préparative.

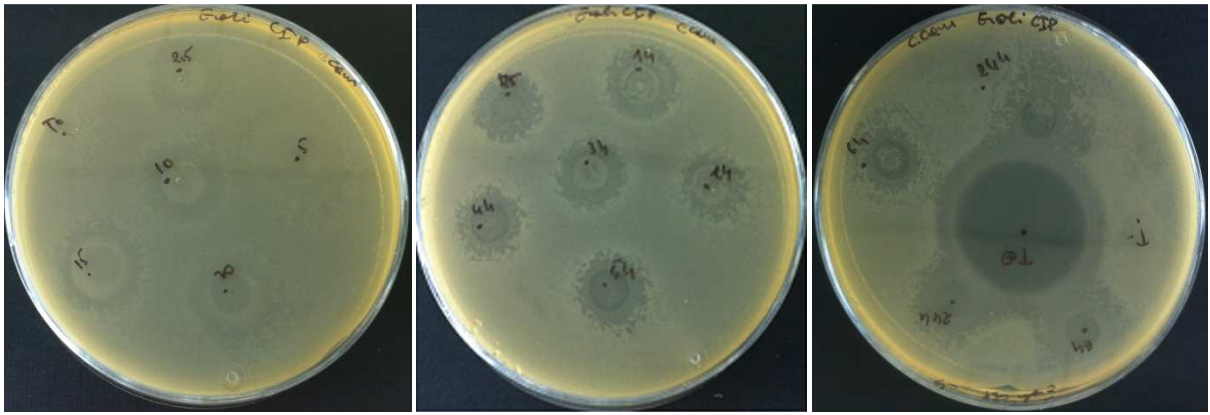
Contrairement à l'hydrolysat de 30 min de la caséine bovine, celui obtenu pour la caséine cameline, pour le même temps d'hydrolyse, présente un taux résiduel en substrat natif plus grand (figure 27). Ainsi nous avons choisi de travailler sur un hydrolysat d'une durée plus longue montrant, toutefois, une activité antimicrobienne.

Les fractions de 1 min d'intervalle ont été collectées et séchées afin de rechercher l'activité antimicrobienne. Diverses fractions ont montré une activité contre. *E. coli* **CIP 54127**, *E. coli* **JM 109** et *L. innocua* (figure 40) et correspondent à des temps d'éluion de 53, 56, 57, 64, 67, 68, 69 min (figure 41). Notamment la fraction de 64 min de temps de l'éluion qui montre une zone d'inhibition nette pour les trois souches testées.

**Tableau 7.** Activité antibactérienne des hydrolysats pepsiques de la caséine cameline, test d'activité antibactérienne réalisé selon la méthode de diffusion sur milieu solide

Hydrolysats	Souches cibles						
	<i>L. innocua</i> LMG 11387	<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	<i>L.monocytogène</i> ATCC 3512	<i>S.aureus</i> CIP 4.83	<i>E.coli</i> CIP54127	<i>E.coli</i> JM109	<i>E.coli</i> DH5 $\alpha$
<b>T0</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>2.5 min</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>5 min</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>10 min</b>	-	-	-	-	+	-	-
<b>15 min</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>30 min</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>45 min</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>1 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>2 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>3 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>4 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>5 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>6 H</b>	+	-	-	-	+	-	-
<b>24 H</b>	+	-	-	-	+	-	-

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



**Figure 39.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues sur la souche *E.coli* CIP 54127 des hydrolysats peptiques de la caséine cameline.



a



b

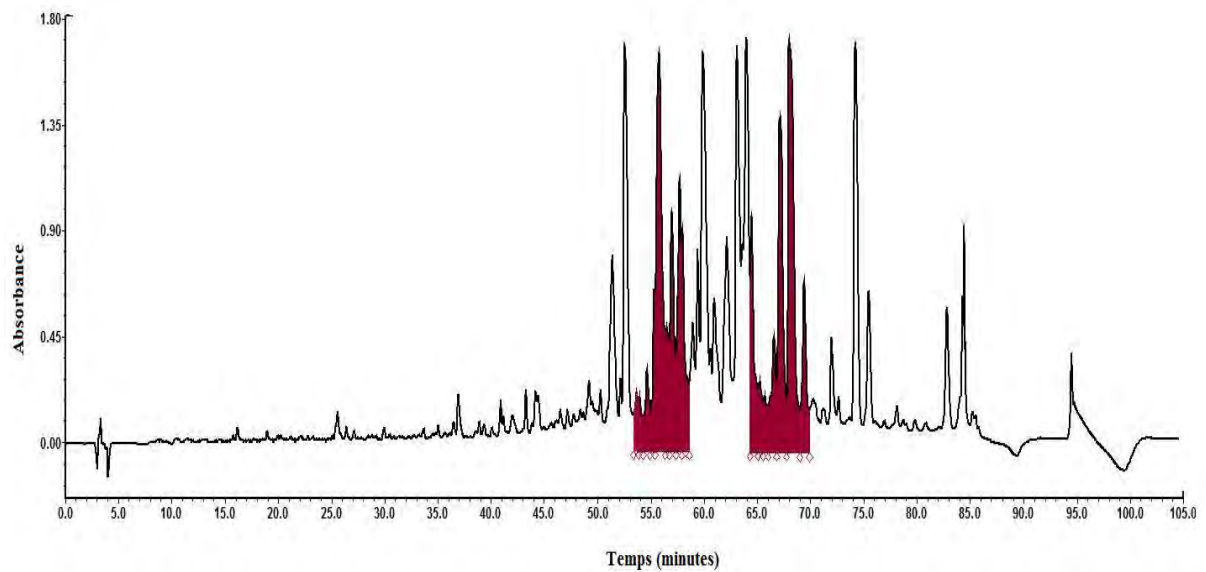


c



d

**Figure 40.** Photos montrant les zones d'inhibition obtenues pour les fractions actives d'hydrolysat de caséine cameline. (a et b : *E coli* CIP 54127, c : *L innocua* LMG 11387 et d : *E.coli* JM109).



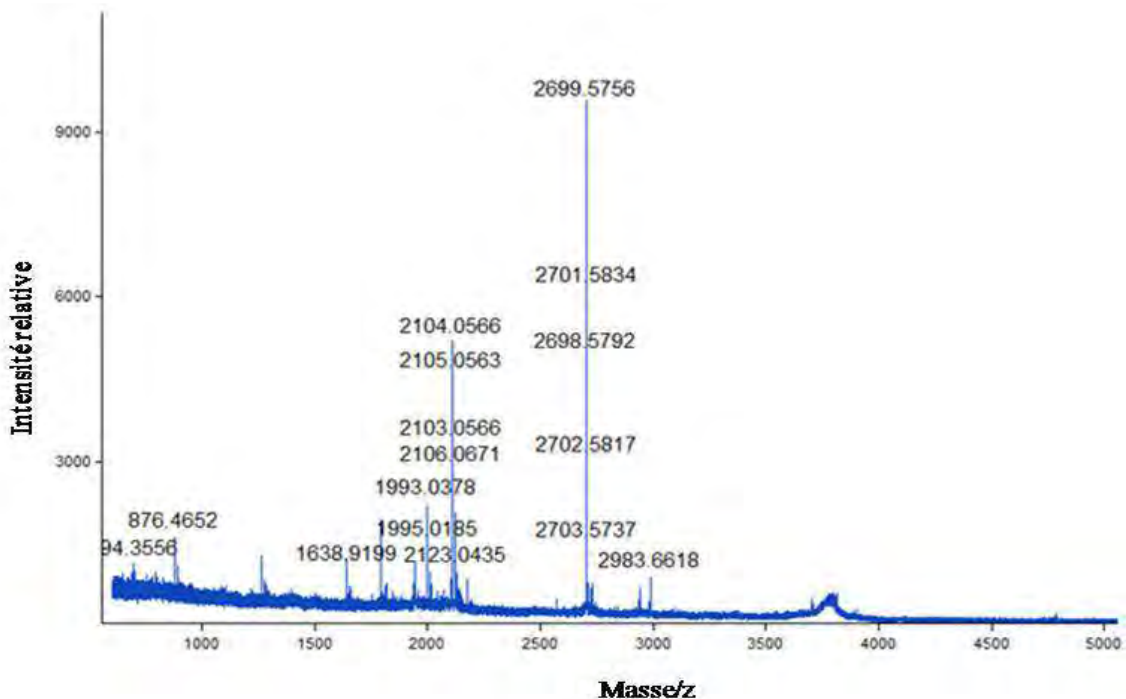
**Figure 41.** Profil HPLC à 215 nm de l'hydrolysate de caséine cameline obtenu à 3 H d'hydrolyse pepsique, les fractions actives sont indiquées en rouge.

#### **II.4. Identification et caractérisation des peptides actifs issus de la caséine cameline par spectrométrie de masse**

Les fractions peptidiques collectées à partir de l'hydrolysate de 3 heures ont été analysées par spectrométrie en MALDI-TOF. Les résultats obtenus indiquent la présence de plusieurs peptides dans chaque fraction. Les séquences peptidiques correspondant aux masses obtenues ont été déterminées en employant le serveur **ExpASY** comme indiqué ci-dessus. Les peptides identifiés correspondent à des fragments issus des différentes fractions des caséines camelines ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ). Ces peptides n'ont pas été reportés dans des études précédentes, en outre, l'obtention de peptides antimicrobiens à partir de caséine cameline n'a pas fait d'objet d'étude, selon la littérature disponible. Cependant, vue l'hétérogénéité des fractions actives, des étapes de purification supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer, parmi les peptides identifiés, ceux responsables de l'activité antimicrobienne. Les séquences des peptides contenus dans les différentes fractions sont données dans le tableau 8. Les spectres de masse correspondant sont donnés en annexe 3. La figure 42 donne le spectre de masse de la fraction à 64 min de temps d'éluion et dont les peptides identifiés correspondent aux fragments (66-90), (83-98), (109-126) de la cas  $\alpha_{s1}$  ; (106-129), (1-19) et (126-142) de la cas  $\alpha_{s2}$  , (22-43), (52-69), (50-67) et (77-95) de la cas  $\beta$  , (121-141), (116-136), (83-100), (106-124), (12-27) et (61-79) de la caséine  $\kappa$ .

Ces peptides ne correspondent pas à ceux identifiés pour la caséine bovine comme étant des peptides antimicrobiens, générés dans les mêmes conditions d'hydrolyse. Toutefois, il est nécessaire d'indiquer que la séquence en acides aminés des fractions des caséines n'est pas similaire pour les deux espèces traitées. En effet, elles présentent un taux de similitude de 39%, 56%, 64% et 56% pour la caséine  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  respectivement (Jardali et Ramet ,1991 ; Ochirkhuyag et coll.,1997 ; Kappeler et coll., 1998).

En outre, la chaîne peptidique de la caséine  $\alpha_{s2}$  cameline est formée de 178 AA contre 207 pour son homologue bovin. Cela se traduit par l'absence du segment 179-207 dans la caséine  $\alpha_{s2}$  cameline. Selon les résultats obtenus dans notre travail ou bien dans des études précédentes, ce dernier, est un précurseur de plusieurs peptides actifs ou fait partie de fragments actifs issus de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine (161-195, 164-207, 165-203,172-207, 175-207, 176-207, 180-207, 181-207, et 183-207) (Zucht et coll., 1995 ; Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann et coll., 2005). En outre, selon les résultats obtenus, les hydrolysats pepsiques de la caséine cameline ont montré un spectre d'action plus restreint qui peut être dû à l'absence de ce segment.



**Figure 42.** Spectre de masse de la fraction de 64 min de temps d'élution sur RP-HPLC, issue de l'hydrolysats pepsique de la caséine cameline et analysée par MALDI-TOF.

**Tableau 8.** Masse moléculaire et séquence en acides aminés des peptides, libérés de l'hydrolyse pepsique de la caséine bovine, contenus dans les fractions actives

Fraction <sup>a</sup>	masse (Da)	Position de la Séquence <sup>b</sup>	Séquence
<b>Fraction 53</b>	2308,9297	$\alpha_{s1}$ 14-33	NEPDSIEEVLNKRKILELAV
	2330,2583	$\alpha_{s2}$ 53-71	SAEVPDENKISQFYQKWK
	2345,8736	$\alpha_{s1}$ 188-210	IAHPSSYDTPEGIASEDGGKTDV
	2292,7939	$\alpha_{s1}$ 190-211	HPSSYDTPEGIASEDGGKTDVM
		$\beta$ 142-161	QSLMYQIQPVPQTPMIPPQ
		$\kappa$ 22-40	TVKYFPIQFVQSRYPYGI
	2351,7635	$\alpha_{s1}$ 72-92	SSEEVVSSSTEQKDILKEDMP
		$\alpha_{s1}$ 81-99	TEQKDILKEDMPSQRYLEE
		$\beta$ 128-147	LTDLENLHPLPLLQSLMYQ
		$\kappa$ 14-32	VERLLNEKTVKYFPIQFVQ
		$\kappa$ 13-31	KVERLLNEKTVKYFPIQFV
		$\kappa$ 45-64	HRLAVPINNQFIPYPNYAKP
	2602,3473	$\alpha_{s1}$ 163-184	PFQFFQLGASPYVAWYPPQV
		$\alpha_{s1}$ 81-101	TEQKDILKEDMPSQRYLEELH
	$\kappa$ 115-140	NTVATVEPPVIPTAEPVNT VVIAEA	
<b>Fraction 54</b>	2057,8883	$\beta$ 119-136	PFTEQSLSLTDLENLHL
		$\beta$ 165-182	SLSQFKVLPVPQQMVPYP
		$\beta$ 187-205	PVQAVLFPQEPVDPVGRGL
	2074,2782	$\alpha_{s1}$ 92-107	PSQRYLEE LHRLNKYK
		$\alpha_{s2}$ 12-29	ESINVSQQKFKQVKKVAI
		$\beta$ 164-181	LALSQFKVLPVPQQMVPY
	2018,3616	$\alpha_{s1}$ 163-179	PFQFFQLGASPYVAWY
		$\alpha_{s1}$ 196-214	TPEGIASEDGGKTDVMPQW
	2041,5664	$\alpha_{s2}$ 113-130	STEVPTTEESTEVFTKKE
		$\beta$ 46-62	QQDKIYTFPQPQLVYS
		$\kappa$ 139-157	EASSEFITTSTPETTTVQI
	2352,4243	$\alpha_{s1}$ 72-92	SSEEVVSSSTEQKDILKEDMP
		$\alpha_{s1}$ 81-99	TEQKDILKEDMPSQRYLEE
		$\beta$ 38-56	EQQTEDEQQDKIYTFPQP
		$\kappa$ 45-64	HRLAVPINNQFIPYPNYAKP
	2735,4365	$\alpha_{s2}$ 100-124	PTVNTEQLSISEESTEVPTTEESTEV
		$\alpha_{s2}$ 117-139	PTEESTEVFTKKTETEEKDHQ
		$\alpha_{s2}$ 39-62	PTEESTEVFTKKTETEEKDHQ
		$\beta$ 5-29	EFKTAGEALESISSEESITHINKQ
	988,5457	$\kappa$ 79-102	LPNIDPPTVERRRPRPSFIAIPP
	$\alpha_{s1}$ 83-90	QKDILKED	
	$\alpha_{s2}$ 100-108	PTVNTEQLS	
1959,756	$\alpha_{s1}$ 123-138	VKLSSHPLYEQLYRIN	
	$\alpha_{s1}$ 96-110	YLEELHRLNKYKLLQ	
<b>Fraction 56</b>	2058,3065	$\beta$ 120-137	FTESQSLTLTDLENLHLP
		$\beta$ 165-182	SLSQFKVLPVPQQMVPYP
		$\beta$ 187-205	PVQAVLFPQEPVDPVGRGL
	2736,9620	$\alpha_{s1}$ 187-212	YIAHPSSYDTPEGIASEDGGKTDVMP
		$\alpha_{s2}$ 21-44	FKQVKKVAIHPKEDICSTFCEEA
		$\alpha_{s2}$ 46-68	RNIKEVESAEVPTENKISQFYQK
		$\beta$ 169-192	FKVLPVPQQMVPYPQRAMPVQAVL
		$\kappa$ 40-61	INYYQHRLAVPINNQFIPYPNY
	1566,2186	$\alpha_{s1}$ 112-124	EAIIRDQKLIPRVK
		$\alpha_{s2}$ 78-90	LHQGQIVMNPWDQ
		$\alpha_{s2}$ 67-78	QKWKFLQYLQAL
		$\kappa$ 52-64	NNQFIPYPNYAKP
	2074,2972	$\alpha_{s1}$ 92-107	PSQRYLEELHRLNKYK
		$\alpha_{s2}$ 12-29	ESINVSQQKFKQVKKVAI
		$\beta$ 164-181	LALSQFKVLPVPQQMVPY
	2720,5684	$\alpha_{s1}$ 13-36	QNEPDSIEEVLNKRKILELAVVSP
	716,5853	$\alpha_{s1}$ 111-116	LEAIRD
	$\alpha_{s2}$ 173-177	HIKRY	
	$\beta$ 193-198	PFQEPV	

		$\kappa$ 43-47	YQHRL
<b>Fraction 57</b>	2455,6365	$\alpha_{s1}$ 120-139	IPRVKLSHPYLEQLYRINE
		$\alpha_{s1}$ 123-142	VKLSSHPYLEQLYRINEDNH
		$\alpha_{s2}$ 115-135	EVPTEESTEVFTKKTELTEEE
		$\alpha_{s2}$ 130-148	ELTEEEKDHQKFLNKIYQY
		$\beta$ 114-135	QSPVVPFTESQSLTLTDLENLH
		$\beta$ 164-184	LSLSQFKVLPVPQQMVPYPQR
		$\kappa$ 123-146	PVIPTAEPVNTTVIAEASSEFIT
	2057,3326	//	
	2815,8699	$\alpha_{s2}$ 49-71	KEVESAEVPTENKISQFYQKWKF
		$\beta$ 51-74	YTFPQPQSLVYSHTEPIYPILPQ
	2670,7783	$\alpha_{s1}$ 92-112	PSQRYLEELHRLNKYKLLQLE
		$\alpha_{s1}$ 94-114	QRYLEELHRLNKYKLLQLEAI(
	2073,2936	$\alpha_{s1}$ 96-111	YLEELHRLNKYKLLQL
	2978,9725	$\alpha_{s1}$ 145-169	LGEVPKVVVTQEQAYFHLEFPQFFQ
		$\alpha_{s1}$ 147-171	EPVKVVVTQEQAYFHLEFPQFFQLG
<b>Fraction 64</b>	2699,5756	$\alpha_{s1}$ 66-90	KESGSSSSEEVVSSSTTEQKDILKED
		$\alpha_{s2}$ 106-129	QLSISEESTEVPTTEESTEVFTKKT
		$\beta$ 22-43	SITHINKQKIEFKIEEQQTE
	2104,0566	$\alpha_{s2}$ 126-142	TKKTELTEEEKDHQKFL
		$\beta$ 52-69	TFPQPQSLVYSHTEPIPY
		$\kappa$ 121-141	EPPVIPTAEPVNTTVIAEAS
		$\kappa$ 116-136	TVATVEPPVIPTAEPVNTTVV
		$\kappa$ 82-99	IDPPTVERRRPRRPSFIA
		$\kappa$ 83-100	DPPTVERRRPRRPSFIAI
		$\kappa$ 90-107	RPRRPSFIAIPPKKTQD
	1993,0378	$\alpha_{s1}$ 83-98	QKDILKEDMPSQRYLE
		$\kappa$ 106-124	QDKTVNPAINTVATVEPPV
		$\kappa$ 12-27	EKVERLLNEKTVKYFP
	2120,0406	$\alpha_{s1}$ 109-126	LQLEAIRDQKLIPRVKL
		$\alpha_{s2}$ 1-19	KHEMDQGSSEESINVSQQ
		$\beta$ 50-67	IYTFPQPQSLVYSHTEPI
		$\beta$ 77-95	LPPLQPAVMVPFLQPKVMD
		$\kappa$ 61-79	YAKPVAIRLHAQIPQCQAL
	1790,1660	$\alpha_{s1}$ 140-155	DNHPQLGEPVKVVVTQE
		$\alpha_{s1}$ 114-128	IRDQKLIPRVKLSSH
	1637,9225	$\alpha_{s1}$ 88-100	KEDMPSQRYLEEL
		$\alpha_{s2}$ 79-92	HQGQIVMNPWDQGK
		$\alpha_{s2}$ 20-33	KFKQVKKVAIHPSK
		$\beta$ 65-78	EPIYPILPQNFLP
	1939,0735	$\alpha_{s1}$ 131-146	LEQLYRINEDNHPQLG
	876,4652	$\alpha_{s1}$ 208-214	TDVMPQW
		$\alpha_{s1}$ 142-149	HPQLGEPV
		$\alpha_{s1}$ 157-163	AYFHLEP
	2983,6618	$\alpha_{s1}$ 176-201	VAWYYPQVMQYIAHPSSYDTPEGIA
		$\alpha_{s2}$ 100-126	PTVNTEQLSISEESTEVPTTEESTEVFT
		$\alpha_{s2}$ 12-37	ESINVSQQKFKQVKKVAIHPSKEDIC
		$\beta$ 147-173	QIPQVPQTPMIPPQSLLSLSQFKVLP
		$\kappa$ 89-114	RRRPRRPSFIAIPPKKTQDKTVNPAI
<b>Fraction 65</b>	2983,9056	$\alpha_{s1}$ 57-83	DHIMEDTERKESGSSSSEEVVSSSTTEQ
		$\alpha_{s2}$ 12-37	ESINVSQQKFKQVKKVAIHPSKEDIC
		$\beta$ 147-173	QIPQVPQTPMIPPQSLLSLSQFKVLP
		$\kappa$ 89-114	RRRPRRPSFIAIPPKKTQDKTVNPAI
	3794,4856	$\alpha_{s1}$ 24-55	NKRKILELAVVSPIQFRQENIDELKDTRNEPT
		$\alpha_{s2}$ 131-159	LTEEEKDHQKFLNKIYQYYQTFLWPEYLK
		$\beta$ 172-205	LPVPQQMVPYPQRAMPVQAVLQEPVPDPVGRGL
		$\beta$ 92-124	KVMDVPKTKETIIPKRKEMPLLQSPVVPFTESQ
		$\kappa$ 40-71	INYYQHRLAVPINNQFIPYYPNYAKPVAIRLHA
	2943,5784	//	
	2699,7212	$\alpha_{s1}$ 66-90	KESGSSSSEEVVSSSTTEQKDILKED
		$\alpha_{s1}$ 177-199	AWYYPQVMQYIAHPSSYDTPEG
		$\alpha_{s2}$ 106-129	QLSISEESTEVPTTEESTEVFTKKT
		$\beta$ 22-43	SITHINKQKIEFKIEEQQTE
	2603,6515	$\alpha_{s1}$ 59-82	IMEDTERKESGSSSSEEVVSSSTTE
		$\kappa$ 28-48	IQFVQSRYPYGINYYQHRLA



<b>Fraction 67</b>	4896,5552	$\alpha_{s1}$ 42-84	ENIDELKDTRNEPTEDHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSTTEQK	
	3056,1944	//		
	1328,1530	$\alpha_{s1}$ 166-177	QFFQLGASPYVA/ LSLSQFKVLPVP	
		$\beta$ 164-175	KTVNPAINTVATV	
	4856,7476	$\alpha_{s1}$ 132-172	EQLYRINEDNHPQLGEPVKVVTQEQA YFHLEPFPQFFQLGA	
		$\kappa$ 44-86	QHRLAVPINNQFIPYPNYAKPVAIRLHAQIPQCQALPNIDPPT	
		$\kappa$ 81-124	NIDPPTVERRRPRRPSFIAIPP KKTQDKTVNPAINTVATVEPPV	
	4924,1788	$\alpha_{s1}$ 40-82	RQENIDELKDTRNEPTEDHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSTTE	
		$\alpha_{s2}$ 25-67	KKVAIHPSKEDICSTFCEEAVRNIKEVESAEVPTENKISQFYQ	
		$\beta$ 73-115	PQNFLPPLQPAVMVPFLQPKVMDVPKTKETIIPKRKEMPLLQS	
3643,3386	$\kappa$ 67-109	IRLHAQIPQCQALPNIDPPTVERRRPRRPSFIAIPP KKTQDKT		
	$\alpha_{s1}$ 84-112	KDILKEDMPSQRYLEELHRLNKYKLLQLE		
	$\beta$ 48-78	DKIYTFPQPQSLVYSHTPIPIYPILPQNFLP		
	$\beta$ 60-91	VYSHTPIPIYPILPQNFLPPLQPAVMVPFLQP		
	<b>Fraction 68</b>	2984,0874	$\alpha_{s1}$ 57-83	DHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSTTEQ
			$\alpha_{s2}$ 12-37	ESINVSQQKFKQVKKVAIHPSKEDIC
		$\beta$ 147-173	QIPQVPQTPMIPPQSLLSLSQFKVLP	
		$\kappa$ 89-114	RRRPRRPSFIAIPP KKTQDKTVNPAI	
3012,1632		$\alpha_{s1}$ 82-105	EQKDILKEDMPSQRYLEELHRLNK	
		$\alpha_{s2}$ 41-66	CEEAVRNIKEVESAEVPTENKISQFY	
2016,2419		//		
4894,5760		$\alpha_{s1}$ 107-147	KLLQLEAIRDQKLIPRVKLSHPYLEQLYRINEDNHPQLGE	
		$\alpha_{s2}$ 108-148	SISEESTEVPTEESTEVFTKKTTELTEEEKDHQKFLNKIYQY	
		$\beta$ 151-194	PVPQTPMIPPQSLLSLSQFKVLPVQPMVPYPQRAMPVQAVLPF	
1790,3106	$\kappa$ 112-159	PAINTVATVEPPVIPTAEPVNTVVIAEASSEFITSTPETTTVQITS		
	$\alpha_{s1}$ 140-155	DNHPQLGEPVKVVTQE		
	$\alpha_{s1}$ 114-128	IRDQKLIPRVKLSH		
<b>Fraction 69</b>	2983,9587	$\alpha_{s1}$ 57-83	DHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSTTEQ	
		$\alpha_{s2}$ 12-37	ESINVSQQKFKQVKKVAIHPSKEDIC	
		$\beta$ 147-173	QIPQVPQTPMIPPQSLLSLSQFKVLP	
		$\kappa$ 89-114	RRRPRRPSFIAIPP KKTQDKTVNPAI	
	3012,0514	$\alpha_{s1}$ 82-105	DHIMEDTERKESGSSSSSEEVVSSTTEQ/	
		$\alpha_{s2}$ 41-66	CEEAVRNIKEVESAEVPTENKISQFY	
		$\kappa$ 82-107	IDPPTVERRRPRRPSFIAIPP KKTQD	
	2016,0138	//		
	1790,2502	$\alpha_{s1}$ 140-155	DNHPQLGEPVKVVTQE	
		$\alpha_{s1}$ 189-206	AHPSSYDTPEGIASEDGG	
	$\alpha_{s1}$ 139-154	EDNHPQLGEPVKVVTQ		
	$\alpha_{s1}$ 114-128	IRDQKLIPRVKLSH		

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

L'objectif de la présente étude est l'obtention de peptides antimicrobiens à partir de protéines de lait par hydrolyse enzymatique. Le choix s'est porté sur les caséines bovines et camelines ; protéines majeures dans le lait des deux espèces. L'hydrolyse est réalisée sous l'action de trois protéases gastro-intestinales : pepsine, trypsine et chymotrypsine.

Sous les conditions d'hydrolyse envisagées dans cette étude, seule l'action de la pepsine a pu générer des peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines et camelines.

Un extrait peptidique enrichi en peptides antimicrobiens a pu être obtenu à partir d'hydrolysats peptidiques de caséine bovine par précipitation, sous l'effet de la force ionique et du pH. L'extrait préparé a été fractionné sur RP-HPLC afin d'identifier les peptides actifs par analyses en LC/MS et en MALDI-TOF. L'ensemble des peptides actifs identifiés est, principalement, issu de la caséine  $\alpha_{s2}$  et de la caséine  $\alpha_{s1}$ . Il comprend les fragments (164-179), (148-166), (180-207) (183-207) et (176-207) de la caséine  $\alpha_{s2}$  bovine dont l'activité est déjà signalée dans des études précédentes (Recio et Visser, 1999 ; Mc Cann et coll., 2005) et de nouveaux éléments actifs, non reportés dans la littérature, correspondant aux peptides (131-174), (153-196), (99-137) (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90), (138-184) de la caséine  $\alpha_{s2}$  et (9-68/70-126) de la caséine  $\alpha_{s1}$ . L'extrait peptidique renferme un taux considérable du fragment  $\alpha_{s2}$  (164-207) qui représente le peptide le plus actif parmi le groupe de peptides antimicrobiens issus des fractions  $\alpha_s$  de la caséine bovine.

L'extrait peptidique ainsi que le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207) séparé à l'état pur, ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif que sur les souches à Gram-négatif testées. L'extrait peptidique, a montré une activité comparable à celle de la nisine contre *L. innocua* et *L. monocytogène* (CMI = 30,14  $\mu\text{g/ml}$  et 60,28  $\mu\text{g/ml}$  contre 31,25  $\mu\text{g/ml}$  et 62,5  $\mu\text{g/ml}$  respectivement). Cela nous incite à envisager l'étude de l'emploi de cet extrait dans le milieu alimentaire.

L'extrait peptidique ainsi que le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207), employés à leurs CMI respectives, présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif. L'effet positif observé, de ces peptides, sur les souches à Gram-négatif constitue un résultat très encourageant du fait que la majeure partie des peptides identifiés, de différentes origines, tels que les bactériocines, ne sont actifs que sur les souches à Gram-positif.

L'action de la pepsine a montré aussi la possibilité de libérer des peptides antimicrobiens à partir des caséines camelines. Les peptides actifs identifiés correspondent aux fragments (66-90), (83-98), (109-126) de la caséine  $\alpha_1$  ; (106-129), (1-19) et (126-142) de la caséine  $\alpha_2$  ; (22-43), (52-69), (50-67) et (77-95) de la caséine  $\beta$  et (121-141), (116-136), (83-100), (106-124), (12-27) et (61-79) de la caséine  $\kappa$ . Alors que des protéines bovines, les fragments actifs ne semblent provenir que de la caséine  $\alpha_1$  et de la caséine  $\alpha_2$ , dans le cas des protéines camelines, aussi bien la caséine  $\alpha_1$  et caséine  $\alpha_2$  que la caséine  $\beta$  et caséine  $\kappa$  s'avèrent aptes à libérer des peptides actifs.

Cependant, les fractions, séparées par RP-HPLC et jugées actives, semblent nécessiter des étapes de purification supplémentaires afin de permettre l'identification des peptides responsables de l'activité antimicrobienne et leur confirmation.

Dans les conditions de protéolyse de la présente étude et pour les caséines des deux espèces animales, ni la trypsine, ni la chymotrypsine, n'ont permis la libération de peptides à activité antimicrobienne. L'étude de l'action de ces protéases dans des conditions d'hydrolyse différentes (pH, températures, rapport E/S....) serait à envisager.

Toutefois, le suivi des cinétiques d'hydrolyse pour les trois protéases a permis d'étudier leur mécanisme d'action sur les protéines traitées. L'action de ces protéases sur les caséines suit un mécanisme intermédiaire entre le mécanisme « one by one » qui donne directement des peptides finaux et le mécanisme « zipper », favorable à l'obtention de peptides intermédiaires. D'après les résultats obtenus, les peptides antimicrobiens sont des produits d'hydrolyse intermédiaires. Ainsi, l'application des conditions d'hydrolyse favorisant le mécanisme « zipper » mérite d'être étudié afin d'optimiser la libération de peptides d'intérêt, notamment le peptide  $\alpha_2$  (164-207), (effet du pH, température et emploi des agents dissociants...).

La pepsine et la trypsine montrent une action plus poussée sur la caséine bovine comparée à leur action sur la caséine cameline. Exprimée en degré d'hydrolyse (DH), cette action a été évaluée au bout de 24 H à  $8,21 \pm 0,761\%$  contre  $5,41 \pm 0,057\%$  pour la pepsine et à  $9,91 \pm 0,409\%$  contre  $8,94 \pm 0,106\%$  pour la trypsine sur la caséine bovine et cameline respectivement. Cependant, la chymotrypsine montre un DH final comparable sur les protéines des deux espèces ( $8,80 \pm 0,205\%$  contre  $8,70 \pm 0,413\%$  pour la caséine cameline et bovine, respectivement).

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

- Optimiser l'application de techniques de séparation et de fractionnement sur les hydrolysats actifs obtenus afin de préparer des extraits enrichis en peptides antimicrobiens permettant leur emploi dans le milieu alimentaire.
- Poursuivre la purification des peptides issus des caséines camelines en vue d'une meilleure identification et caractérisation.
- Réorienter et optimiser les conditions de protéolyse visant l'obtention plus diversifiée de peptides actifs.
- Diversifier les protéases en fonction des réponses des protéines ciblées afin d'augmenter les chances d'apparition de peptides d'intérêt.
- Etudier l'activité antimicrobienne des peptides obtenus sur des germes connus pathogènes et/ou d'altération des aliments.
- Etudier et optimiser la possibilité d'emploi de ces peptides actifs dans la conservation des aliments selon le milieu alimentaire.
- Elargir l'étude à d'autres protéines, comme source de peptides antimicrobiens, telles les protéines végétales, moins onéreuses et plus disponibles.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Abita J. P., Delaage M., Lazdunski M. et Savrida J. (1969)**

The Mechanism of Activation of Trypsinogen. The Role of the Four N-Terminal Aspartyl Residues.

European J. Biochem., 8, 314-324.

**Alais C. et Jolles P. (1961)**

Etude comparée des caséino-glycopeptides formés par l'action de la présure sur les caséines des laits de vaches, de brebis et de chèvre. Etude de la partie non protidique.

Biochim. Biophys. Acta, 51, 315-322.

**Al Haj O. A. et Al Kanhal H. A. (2010)**

Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk.

International dairy journal, 20, 811-821.

**Andreeva N. S. et Rumsh L. D. (2001)**

Analysis of crystal structures of aspartic proteinases : on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes

Protein Sci. 10:2431-2450.

**Andres E. et Dimarcq J-L. (2007)**

Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments : mise à jour.

Revue générale : Médecine et maladies infectieuses, 37, 194-199.

**Aoki T., Yamada N. et Kako Y. (1990)**

Relation between colloidal calcium phosphate cross-linkage and release of  $\beta$ -casein from bovine casein micelles on cooling.

Agric. Biol. Chem. 54 : 2287-2292.

**Attia H., Kherouatou N., Nasri M., et Khorchani T. (2000)**

Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification.

Lait, 80, 503-515.

**Baranyi M., Thomas U. et Pellegrini A. (2003)**

Antibacterial activity of casein-derived peptides isolated from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) milk.

Journal of Dairy Research, 70, 189-197.

**Barbier Du Vimont H. (2011)**

Additifs alimentaires, ce que cachent les étiquettes.

Ed. Guy Trédaniel. 128p.

**Bechinger B. (2009)**

Rationalizing the membrane interactions of cationic amphipathic antimicrobial peptides by their molecular shape.

Current Opinion in Colloid & Interface Science, 14, 349-355.

**Bellamy W., Takase M., Yamauchi K., Wakabayashi H., Kawase K. et Tomita M. (1992)**

Identification of the bactericidal domain of lactoferrin.

Biochimica et Biophysica Acta.; 121: 130-136.

**Benkerroum N. (2008)**

Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk.

African Journal of Biotechnology, Vol. 7. 25. 4856-4867.

**Bradshaw J.P. (2003)**

Cationic Antimicrobiol Peptides.

Biodrugs, 17(4):233-240.

**Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Mercier J.C., Pelissier J. P. et Das B. C. (1977)**

Complete amino acid sequence of bovine  $\alpha_{S2}$  casein.

F.E.B.S. Lett., 76, 274-279.

**Brogden K. A., Ackermann M., Mc Cray P. B., Tack Jr., B. F. (2003)**

Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences.

International Journal of Antimicrobial Agents, 22, 465-478.

**Brown J. R. et Hartley B. S. (1966)**

Location of Disulphide Bridges by Diagonal Paper Electrophoresis. The disulphide bridges of bovine chymotrypsinogen A.

Biochem. J. 101- 214.

**Bulet P., Stöcklin R. et Menin L. (2004)**

Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates.

Immunol Rev.198:169-84.

**Carles C., Huet J.C., et Ribadeau-Dumas B. (1988)**

A new strategy for primary structure determination of proteins: Application to  $\beta$ -casein.

FEBS Lett. 229: 265-272.

**Catiau L., Traisnel J., Chihib N.E., Le Flem G., Blanpain A., Melnyk O., Guillochon D. et Nedjar-Arroume N. (2011a)**

RYH: A minimal peptidic sequence obtained from beta-chain hemoglobin exhibiting an antimicrobial activity.

Peptides, 32 : 1463–1468.



**Catiau L., Traisnel J., Delval-Dubois V., Chihib N.E, Guillochon D. et Nedjar-Arroume N. (2011b)**

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

**Cayot P. et Lorient D. (1998)**

Structures et technofonctions des protéines du lait.  
Technique et documentation Lavoisier, 363p.

**Chantaysakorn P. et Richter R.L. (2000)**

Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice.  
Journal of Food Protection; 63:376–380.

**Choisnard L., Froidevaux R., Nedjar-Arroume1 N., Lignot B. Vercaigne-Marko D., Krier F., Dhulster P. et Guillochon D. (2002)**

Kinetic study of the appearance of an anti-bacterial peptide in the course of bovine haemoglobin peptic hydrolysis.  
Biotechnol. Appl. Biochem. 36, 187-194.

**Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. et Catignani G.L. (1983)**

Spectrophotometric assay using O-PhthaldiAldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins.  
Journal of Dairy Science, 66: 1219-1227.

**Clare D. A. et Swaisgood H. E. (2000)**

Bioactive Milk Peptides: A Prospectus.  
J Dairy Sci 83:1187–119.

**Clare D.A., Catignani G.L. et Swaisgood H.E. (2003)**

Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides.  
Current Pharmaceutical Design, 9, 1239-1255.

**Corvec S. (2009)**

Anatomie fonctionnelle bactérienne. La paroi bactérienne.  
Laboratoire de bactériologie, UFR de médecine, Nantes. 32p.

**Cowland J. B., Johnsen A. H., Borregaard N. (1995)**

hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules.  
FEBS Lett., 368 : 173-176.

**Craik C.S., Rocznik S., Largman C. et Rutter W.J. (1987)**

The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases.  
Science, 237, 909-913.

**Csordas A., et Michl H. (1970)**

Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species.

Monatsh. Chem., vol. 101, 182-189.

**Daoud R., Delval-Dubois V., Bors-Dodita L., Nedjar-Arroume N., Krier F, Chihib N.E., Marya P., Kouach M. , Briand G. et Guillochon D. (2005)**

New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin.

Peptides, 26, 713-719.

**Delfour A., Jolles J., Alais C., et Jolles P. (1965)**

Caseino-glycopeptides : Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 19:452-455.

**Dennison S. R., Wallace J., Harris F. et Phoenix D. A. (2005)**

Amphiphilic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. Protein and Peptide Letters, 12, 31-39.

**Dunn B. M. (2002)**

Structure and Mechanism of the Pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases.

Chem. Rev., vol., 102, 4431-4458.

**Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H. M., Harwalkar J. V. R., Jenness R. et Whitney R. M. (1984)**

Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision.

J. Dairy Sci., 67:1599-1631.

**El-agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P. et Assaf R. (1992)**

Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective protein.

J. Dairy Res., 59, 169-175.

**Epand R.M. et Vogel H. J. (1999)**

Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action.

Biochimica et Biophysica Acta. 1462, 11-28.

**Erskine P.T., Coates L., Mall S., Gill R.S, Wood S.P., Myles D.A. et Cooper J.B. (2003)**

Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides.

Prot. Sci., 12:1741-1749.

**Farah Z.et Farah-Riesen M. (1985)**

Separation and characterization of major components of camel milk casein.

Milchwissenschaft, 40, 669-671.

**Farah Z. et Rüegg M.W. (1989)**

The size distribution of casein micelles in camel milk.  
Food Microstructure, 8, 211-216.

**Farrell J. 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. et Swaisgood H. E. (2004)**

Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision.  
J. Dairy Sci. 87:1641-1674.

**Fázio Oliveira V. J., Bulet P., Miranda M.T., Daffre S. et Miranda A. (2006)**

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

**Fernandez de Caleyra R., Gonzalez-Pascual B., Garcia-Olmedo F., et Carbonero P. (1972)**

Susceptibility of phytopathogenic bacteria to Wheat Purothionins In vitro.  
Appl. Microbiol., vol., 23, p. 998-1000.

**Fiat, A.-M., Alais C., et Jolles P. (1972)**

The amino-acid and carbohydrate sequences of a short glycopeptide isolated from bovine  $\kappa$ -casein.  
Eur. J. Biochem., 27: 408-412.

**Fleming A. (1922)**

On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions.  
Proc. Roy. Soc. Ser. 93B: 306-317.

**Froidevaux R, Krier F., Nedjar-Arroume N., Vercaigne-Marko D., Kosciarza E., Ruckebusch C., Dhulster P. et Guillochon D. (2001)**

Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment.  
FEBS Lett.; 49:1159-163.

**Gifford J. L., Hunter H. N. et Vogel H. J. (2005)**

Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties.  
Cell. Mol. Life Sci. 62. 2588-2598.

**Gobbetti M, Smacchi E, Corsetti A, Bellucci M., (1997)**

Inhibition of Proteolytic Enzymes from *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and Angiotensin I-Converting Enzyme by Peptides from Zein, Hordein, and Gluten Hydrolysates.  
J. Food Protection; 60: 499-504.

**Guo M.R., Fox P.F. et Flynn A. (1994)**

Susceptibility of B- Lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by Pepsin and Trypsin.  
J. Dairy Sci. 78 : 2336-2344.

**Habermann E. (1972)**

Bee and wasp venoms.  
Science, vol. 177, p. 314-322.

**Hancock R. E. W. et Chapple D. S. (1999)**

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

**Haque E. et Chand R. (2008)**

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

**Hayes M., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Hill C. et Stanton C. (2006)**

Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026.  
APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 2260-2264.

**Hill R.J. et Wake R.G. (1969)**

Amphiphile nature of  $\kappa$ -casein as the basis for its micelle stabilizing property.  
Nature, 221, 635-639.

**Hill R. D., Lahov E. et Givol D., (1974)**

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

**Huber R., Kukla D., Bode W., Schwager P., Bartels K., Deisenhofer J. et Steigemann W. (1974)**

Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II.  
Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution.  
J. Mol. Biol. 89, 73-101.

**Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T. et Boman H. G. (1980)**

"Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*."  
Eur. J. Biochem., 106 (1): 7-16.

**Hynes E.R., Meinard C.A., Sabbag N., Cattario T., Candiotti M.C., et Zalazar C.A, (2001)**

Influence of milk clotting enzymes concentration on the  $\alpha_{s1}$ -casein hydrolysis during soft cheeses ripening.  
J. Dairy sci. 84: 1335-1440.

**Ibrahim H.R., Iwamori E., Sugimoto Y., Aoki T., (1998)**

Identification of a distinct antibacterial domain within the n-lobe of ovotransferrin.  
 Biochim. Biophys. Acta, 1401: 289-303.

**Ibrahim H. R., Thomas U., Pellegrini A. et Helix-Loop-Helix A. (2001)**

Peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers Potent antimicrobial activity with membrane permeabilization Action.  
 J. Biol. chem., 276:43767-43774.

**Jenness R, Larson B. L., Mc Meekin T.L., Swanson A.M., Whitnah C.H. et Whitney R.M. (1956)**

Nomenclature of the proteins of bovine milk.  
 J. Dairy Sci.; 39: 536-541.

**Jenssen H., Hamill P. et Hancock R. E. W. (2006)**

Peptide Antimicrobial Agents,  
 CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS. Vol. 19, No. 3, p. 491-511.

**Jollés J., Alais C. et Jollés P. (1968)**

The tryptic peptide with the rennin-sensitive linkage of cow's  $\kappa$ -casein.  
 Biochim. Biophys. Acta, 168:591-593.

**Jollés J., Fiat A. M., Alais C., et Jollés P. (1973)**

Comparative study of cow and sheep  $\kappa$ -caseino-glycopeptides: Determination of the N-terminal sequences with a sequencer and the location of the sugars.  
 FEBS Lett., 30:173-176.

**Jolles P., Levy-Toledano S., Fiat A. M., Soria C., Gillesen D., Thomaidis A., Dunn F. W., et Caen. J. (1986)**

Analogy between fibrinogen and casein: effect of an undecapeptide isolated from  $\kappa$ -casein on platelet function.  
 Eur. J. Biochem. 158:379-384.

**Kanamori M., Kawaguchi N., Ibuki F. et Doi H. (1980)**

Attachment sites of carbohydrate. moieties to peptide chain of bovine  $\kappa$ -casein from normal milk.  
 Agric. Biol. Chem. 44:1855-1861.

**Kappeler S., Farah Z. et Puhan Z. (1998)**

Sequence analysis of camelus dromedarius milk caseins.  
 J. Dairy Res. 65, 209-222.

**Kauffman D. L. (1965)**

The Disulphide Bridges of Trypsin.  
 J. Mol. Biol., 12, 929-932.

**Keil B., Prusík Z. et Šorm F. (1963)**

Disulphide bridges and a suggested structure of chymotrypsinogen.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 78, 559-561.

**Keil B. (1987)**

Proteolysis Data Bank : Specificity of alpha-chymotrypsin from computation of protein cleavages.  
*Protein Seq. data Anal.*, vol. 1, 13-20.

**Kitts D. D. et Wieler K. (2003)**

Bioactive proteins and peptides from food Sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery.  
*Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.

**Kohmura M., Nio N., Kubo K., Minoshima Y., Munekata E. et Ariyoshi Y. (1989)**

Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\beta$ -casein.  
*Agric. Biol. Chem.*, 53: 2107-2114.

**Kohmura M., Nio N. et Ariyoshi Y. (1990)**

Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by synthetic peptides of human  $\kappa$ -casein.  
*Agric. Biol. Chem.*, 54:835-836.

**Konuspayeva G., Loiseau G. et Faye B. (2004)**

La plus-value "santé" du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan.  
*Renc. Rech. Ruminants*, 11 : 47-50.

**Korhonen H. et Pihlanto A. (2003)**

Food-derived bioactive peptides – Opportunities for designing future foods.  
*Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.

**Kossiakoff A.A. et Spencer S.A. (1981)**

Direct determination of the protonation states of aspartic acid-102 and histidine-57 in the tetrahedral intermediate of the serine proteases: neutron structure of trypsin.  
*Biochemistry*, 20, 6462-6474.

**Laemmli.U.K. (1970)**

Clivage of structural protéins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.  
*Nature* ; 227, 680-686.

**Lahov E., Edelstein D., Sode-Mogensen M.T. et Sofer E. (1971)**

Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat.  
*Milchwissenschaft*, 26:489-495.

**Lai Y. et Gallo R. L. (2009)**

AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense.  
*Trends in Immunology*, Vol.30 No.3 : 131-141.

**Larsson-Raznikiewicz M. et Mohammed M.A. (1986)**

Analysis of the casein content in camel (*camelus dromedarius*) milks.  
Swed. J. Agric. Res., 16, 13-18.

**Lehrer R.I, Ganz T, Szklarek D et Selsted M.E. (1988)**

Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations.  
J. Clin. Invest., 81(6) :1829-1835.

**Liepke C., Zucht H.D., Forssman W.G. et Ständker L. (2001)**

Purification of novel peptide antibiotics from human milk.  
Journal of Chromatography B, 752 : 369-377.

**Linderstrom-lang K. (1952)**

Proteins and Enzymes III.  
Lane Medical Lectures, vol. VI, Stanford University Press, Stanford, CA. p. 53-72.

**Lopes S.C., Fedorov A. et Castanho M.A. (2005)**

Lipidic membranes are potential “catalysts” in the ligand activity of multifunctional penapeptide neokyotorphin.  
Chem-biochem. 6(4):697-702.

**Lopez-Exposito I., Gomez-Ruiz J. A., Amigo L. et Recio I., (2006)**

Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha_2$ -casein.  
International Dairy Journal, 16, 1072-1080.

**Lopez- Exposito I. et Recio I. (2006)**

Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins.  
International Dairy Journal, 16, 1294-1305.

**Lopez-Exposito I., Amigo L. et Recio I., (2008)**

Identification of the initial binding sites of  $\alpha_2$ -casein f(183–207) and effect on bacterial membranes and cell morphology.  
Biochimica et Biophysica Acta., 1778, 2444-2449.

**Malkoski M., Dashper S.G., O’Brien-Simpson N.M., Talbo G.H, Marcis M., Cross K.J et Reynolds E.C., (2001)**

Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk.  
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 2309-2315.

**Manwaring W. H. (1942)**

"Fleming's "Lysozyme".  
Cal. West. Med. 56 (1): 5-10.

**Marshall S. H. et Arenas G., (2003)**

Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology.

Electronic Journal of Biotechnology. Vol.6, No.2, 271-284.

**Masson P. L. et Heremans J. F., (1968)**

Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein). 1. The involvement of bicarbonate in the reaction.

European Journal of Biochemistry, vol. 6, No. 4, 579-584.

**Matin M. A., Monnai M. et Otani H. (2000)**

Isolation and characterization of a cytotoxic pentapeptide k-caseidin, from bovine k-casein digested with bovine trypsin.

Animal Science Journal 71, 197-207.

**Mc Cann K.B., Shiell B.J., Michalski W.P., Lee A., Wan J., Roginski H. et Coventry M.J. (2005)**

Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the f(164–207) region of bovine  $\alpha_{S2}$ -casein.

International Dairy Journal, 15, 133-143.

**Mc Cann K.B., Shiell B.J., Michalski W.P., Lee A., Wan J., Roginski H. et Coventry M.J. (2006)**

Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha_{S1}$ -casein.

International Dairy Journal, 16, 316-323.

**Mehaia, M. A. Hablas, M.A., Abdel-Rahim, K.m et El mougy, S.A. (1995)**

Milk composition, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia.

Food chem., 52, 115-122.

**Meisel H. (2005)**

Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk Proteins.

Current Medicinal Chemistry, 12, 1905-1919.

**Meloun B., Kluch I., Kostka V., Morvek L., Prusik Z., Vangeek J., Keil B. et Sorm F. (1966)**

Covalent structure of bovine chymotrypsinogen A.

Biochim. Biophys. Acta, 130, 543-546.

**Mercier J.C., Brignon G. et Ribadeau-Dumas B. (1973)**

Structure primaire de la caséine  $\kappa$  bovine, Séquence complète.

Eur. J. Biochem. 35, 222-235.



**Mikeš O., Tomášek V., Holeyšovský V. et Šorm F. (1966)**

Covalent structure of bovine trypsinogen.

Biochim. Biophys. Acta, 117, 281-284.

**Minervini F., Algaron F., Rizzello C.G., Fox P.F., Monnet V. et Gobetti M. (2003)**

Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinasehydrolyzed caseins of milk from six species.

Applied and Environmental Microbiology, 69:297-5305.

**Multon J. L. (2002)**

Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires.

3<sup>ème</sup> ed. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 746p.

**Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Miloudi K, Daoud R, Krier, F, Kouach M, Briand G et Guillochon D. (2006)**

Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin.

Peptides, 27 : 2082-2089.

**Nedjar-Arroume N, Dubois-Delval V, Adje E.Y., Krier F., Mary P., Kouach M., et Guillochon D. (2008)**

Bovine hemoglobin ; an attractive source of antibacterial peptides.

Peptides, 29:969-977.

**Nielsen P.M., Petersen D. et Dambmann C.D. (2001)**

Improved method for determining food protein degree of hydrolysis.

Journal of food science, 66 : 642-646.

**Ochirkhuyag B., Chobert J.M., Dagalarrondo M., Choiset Y. et Haertle T. (1997).**

Characterization of caseins from Mongolian yak , Khainak and Bactrian camel.

Lait, 77, 601-613.

**Pellegrini A., Thomas U., Bramaz N., Hunziker P. et Von Fellenberg R. (1999)**

Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule.

Biochimica, Biophysica Acta, 1426 : 439-448.

**Pellegrini A., Dettling C., Thomas U. et Hunziker P. (2001)**

Isolation and characterization of four bactericidal domains in the  $\beta$ -lactoglobulin.

Biochimica et Biophysica Acta, 1526 : 131-140.

**Pellegrini A. (2003)**

Antimicrobial peptides from food proteins.

Current Pharmaceutical Design, 9, 1225-1238.

**Powers J.-P. S. et Hancock R. E. W. (2003)**

The relationship between structure and antibacterial activity.  
Peptides, 24, p. 1681-1691.

**Qi W., Su R. X., He Z. M., Zhang Y. B. et Jin F. M. (2007)**

Pepsin-Induced Changes in the Size and Molecular Weight Distribution of Bovine Casein During Enzymatic Hydrolysis.  
J. Dairy Sci., 90 : 5004-5011.

**Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S. et Deshpande V. V. (1998)**

Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases k.  
Microbiology and Molecular Biology Reviews Vol. 62, N°. 3: 597-635.

**Recio I. et Visser S. (1999)**

Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha$ <sub>2</sub>-casein.  
Biochimica, Biophysica Acta, 1428, 314-326.

**Ribadeau-Dumas B., Brignon G., Grosclaude F. et Mercier J.C. (1972)**

Structure primaire de le caséine  $\beta$ - bovine. Séquence complète.  
Eur. J. Biochem., 25, 505-514.

**Richter C., Tanaka T. et Yada R.Y. (1998)**

Mecanism of activation of the gastric aspartic proteinases : pepsinogen, progastricsin and prochymosin.  
Biochem. J. 335:481-490.

**Rob C. G. (1990)**

"Use of penicillin for venereal disease in World War II."  
Sex. Transm. Dis. 17(3) : 156-7.

**Salami M., Yousefi R., Ehsani M., Dalgalarrrondo M., Chobert J-M., Haertle T., Razavi S. H., Saboury A. A., Niasari-Naslaji A. et Moosavi-Movahedi A.A. (2008)**

Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes.  
International Dairy Journal, 18, 1097-1102.

**Salami M., Moosavi-Movahedi A. A., Moosavi-Movahedi F., Ehsani M. R., Yousefi R., Farhadi M., niasari-Naslaji A., Aboury A. A., Chobert J.M. et Haertlé T. (2011)**

Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion.  
Journal of Dairy Research, 78, 471 - 478.

**Sanny C.G., Hartsuck J.A. et Tang G. (1975)**

Conversion of pepsinogen to pepsin.  
The Journal of Biological Chemistry, Vol. 250, No. 7: 2635-2639.

**Schmidt D.G. (1982)**

Association of caseins and casein micelle structure.

In: Developments of dairy chemistry1-proteins. Ed., P. F. Fox, Applied science publishers LTD, p. 61-86.

**Schröder J.-M.I. et Harder J. (2006)**

Peptides antimicrobiens naturels cutanés.

MEDECINE/SCIENCES; 22 : 153-7.

**Sepulvida P., Marciniszun J., Iane Liu J.R. et Tang D J. (1975)**

Primary structure of porcine pepsin III-Amino acid sequence of a cyanogen bromide fragment, CB2A and the complete structure of porcine pepsine.

The journal of biological Chemistry, Vol. 250, N° 13: 5082-5088.

**Severin S. et Wenshui X. (2005)**

Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45:645-656.

**Siboukeur O. (2006)**

Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques Option : Sciences Alimentaires. Institut national agronomique, El-Harrach Alger. 135 p.

**Sila A., Nedjar-Arroume N., Hedhili K., Chataigné G., R.Balti, Nasri M., Dhulster P. et Bougatef A. (2013)**

Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates : Activity against some pathogenic bacteria.

LWT - Food Science and Technology, 55, 183-188.

**Sindayikengera S. et Wenshui X. (2005)**

Milk biologically active components as nutraceuticals : Review.

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45:645-656.

**Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S. et Singh T. P, (2013)**

Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein.

International Journal of Peptides, V. 2013 : 1-12.

**Skarnes' R. C. et Watson D. W. (1957)**

Antimicrobial factors of normal tissues and fluids.

Bacteriol. Rev., 21 (4): 273.

**Song R., Wei R.-B., Luo H.-Y. et Wang D.F. (2011)**

Isolation and Characterization of an Antibacterial Peptide Fraction from the Pepsin Hydrolysate of Half-Fin Anchovy (*Setipinna taty*).  
Molecules, 17, 2980-2991.

**Srividhya J. et Schnell S. (2006)**

Why substrate depletion has apparent first-order kinetics in enzymatic digestion.  
Computational Biology and Chemistry; 30, 209-214.

**Stroud R.M. (1974)**

A family of protein-cutting proteins.  
Scientific American, 231, 74-88.

**Swaisgood H. E. (1992)**

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

**Tasseau O. (2005)**

Magainines: pionniers pour de nouveaux agents anti-infectieux.  
Le MiDiFABs, 4 , 77-87.

**Tauzin J., Miclo L., Roth S., Molle D. et Gaillard L. (2003)**

Trypsin hydrolysis of bovine  $\alpha_{S2}$  : identification and release kinetics of peptides.  
International Dairy Journal 13. 15-27.

**Theolier J., Hammami R., Labelle P., Fliss I. et Jean J. (2013)**

Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate.  
Journal of functional foods, 5, 706-714.

**Upadhyay V.K., Mc Sweeney P.L.H., Magboul A.A. et Fox P.F. (2004)**

Proteolysis in Cheese during Ripening.  
In: Cheese: Chemistry, physics and Microbiology, Ed. FOX, P F.; Mc Sweeney P L H et Timothy P.C. 3ème edition – Vol.1: General aspect ed. Elsevier p 1226-3651.

**Vaintraub I.A. et Lapteva N.A. (1994)**

Kinetics of one-by-one Proteolysis. Ovalbumin Proteolysis.  
Biochemistry (Moscow), Vol. 59, No. 9, 1043-1048.

**Van der Kraan M.I.A., Nazmi K., Teeken A., Groenink J., Vant Hof W., Veerman E. C.I., Bolscher G.M. J. et Amerongen A.V.N. (2005)**

Lactoferrampin, an antimicrobial peptide of bovine lactoferrin, exerts its candidacidal activity by a cluster of positively charged residues at the C-terminus in combination with a helix-facilitating N-terminal part.

Biological Chemistry, V. 386, Issue 2, 137-142.

**Vogel H.J., Schibli D.J., Jing W., Lohmeier-Vogel E.M., Epand R.F., et Epand R.M., (2002)**

Towards a structure–function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine-containing peptides.

Biochem. Cell. Biol. 80: 49-63.

**Vogel H. J. (2012)**

Lactoferrin, a bird’s eye view.

Biochem. Cell. Biol. 90: 233-244.

**Vorland L.H., Ulvatne H., Rekdal O. et Sigurd Svendsen J., (1999)**

Initial Binding Sites of Antimicrobial Peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Scand. J. Infect. Dis., 31: 467-473.

**Vorob'ev M. M. (2009)**

kinetics of peptide bond demasking in enzymatic hydrolysis of casein substrates.

Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 58, 146-152.

**Vorob'ev M. M., Vogel V, Guler G. et Mantele W. (2011)**

Monotoring of Demasking of Peptide Bonds During Proteolysis by Analysis of the Apparent Spectral Shift of Intrinsic Protein Fluorescence.

Food Biophysics 6:519-526.

**Wakayabashi H., Takase M. et Tomita M. (2003)**

Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin.

Current Pharmaceutical Design, 9, 1277-1287.

**Wakabayashi H., Yamauchi K. et Takase M. (2006)**

Lactoferrin research, technology and applications.

International Dairy Journal, 16, 1241-1251.

**Walsh K.A. et Neurath H. (1964)**

Trypsinogen and chymotrypsinogen as homologous proteins.

Proc. Natl. Acad. Sci., U S A., 52(4): 884-889.

**Walstra P. (1999)**

Casein sub-micelles: do they exist?

International Dairy Journal, 9: 189-192.

**Wang G.,(2013)**

Database-Guided Discovery of Potent Peptides to Combat HIV-1 or Superbugs.

Pharmaceuticals, 6, 728-758.

**Wiesner J et Vilcinskas A. (2010)**

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

**Yamamoto N., Ejiri M. et Mizuno S. (2003)**

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

**Yang L., Harroun T. A., Weiss T.M., Ding L., et Huang H.W. (2001)**

Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores.  
Biophysical Journal, Vol. 81, 1475-1485.

**Yeaman, M. R. et Yount N. Y. (2003)**

Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance.  
Pharmacol. Rev., 55 (1): 27-55.

**Zanetti M., Gennaro R. et Romeo D. (1995)**

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

**Zasloff, M. (1987)**

"Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor."  
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 84(15): 5449-53.

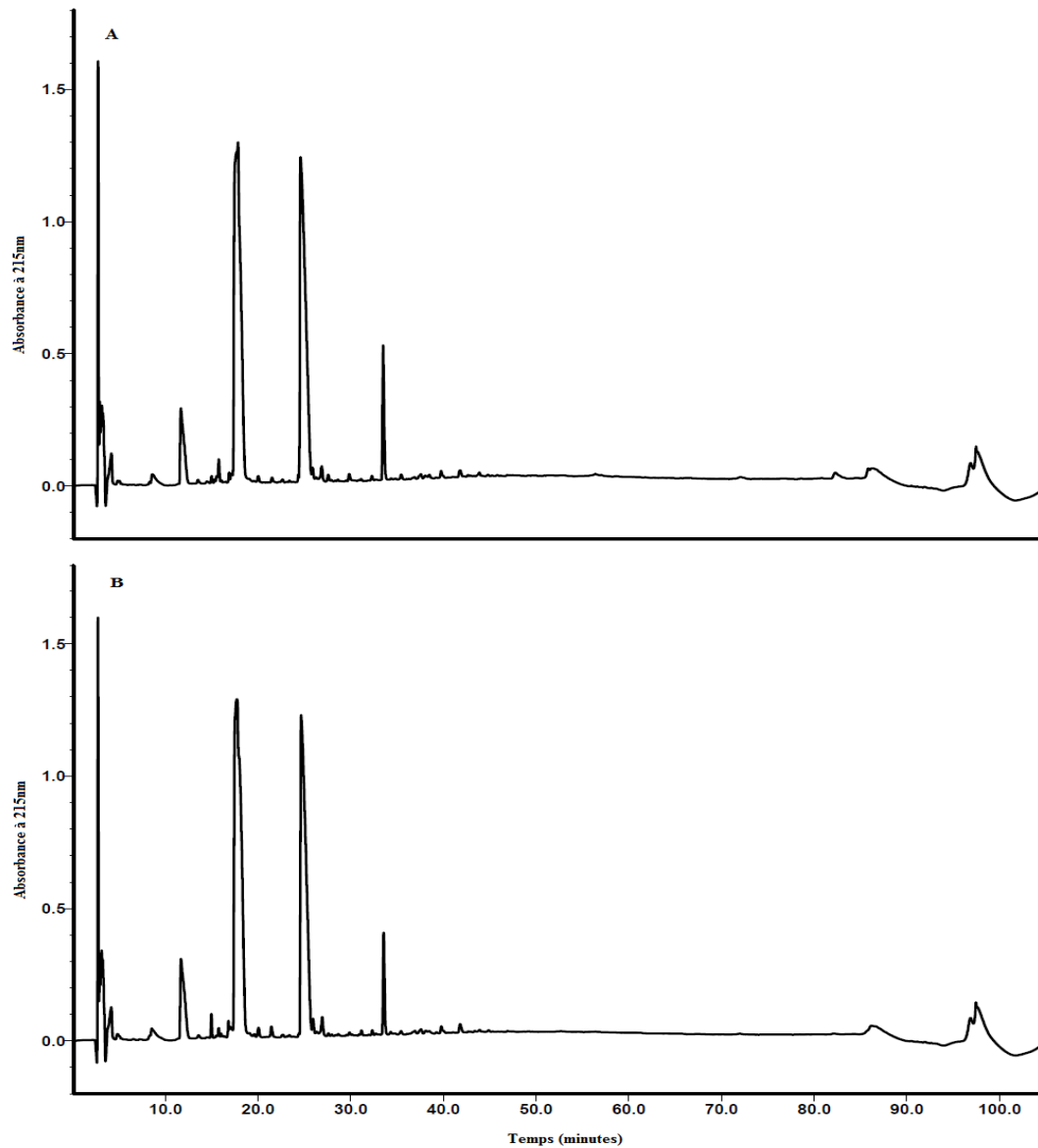
**Zucht H.D., Raida M., Adermann K., Magert H.J. et Forssmann W.G, (1995)**

Casocidin-I : A casein- $\alpha$ s<sub>2</sub> derived peptide exhibits antibacterial activity.  
FEBS Letters, 372:185-188.

## REFERENCES WEB

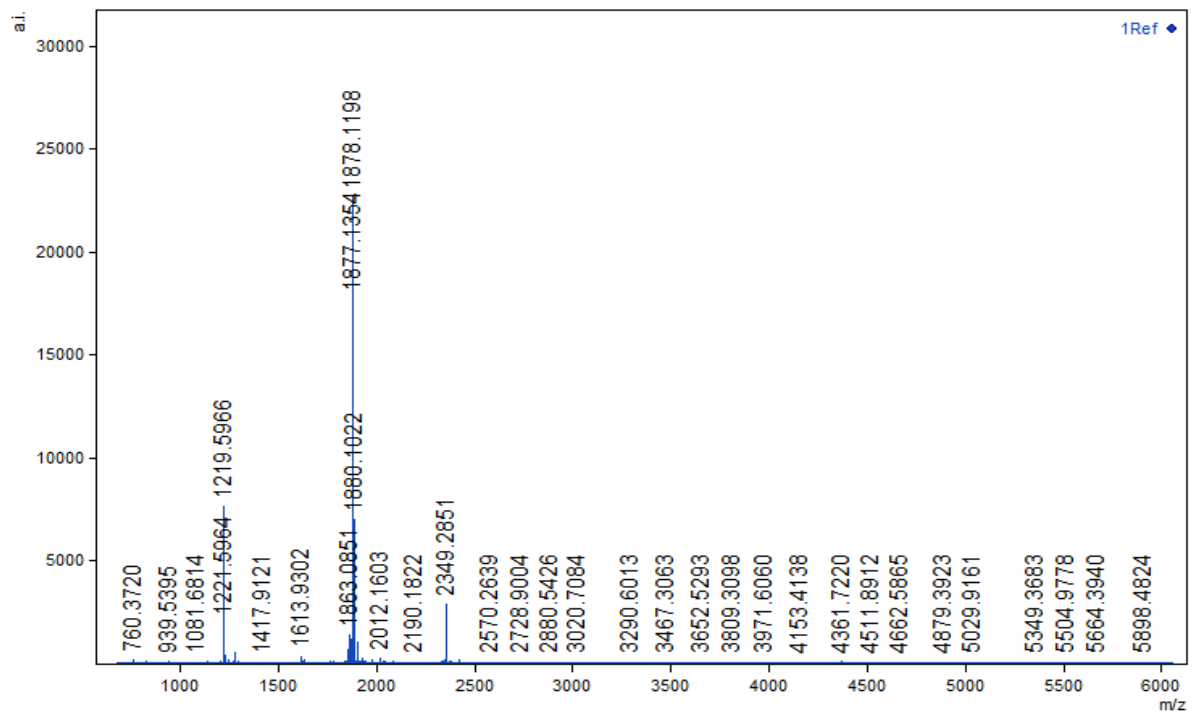
**The Antimicrobial Peptide Data Base** : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, dernière consultation le 10/03/2014.

## Annexe 1.

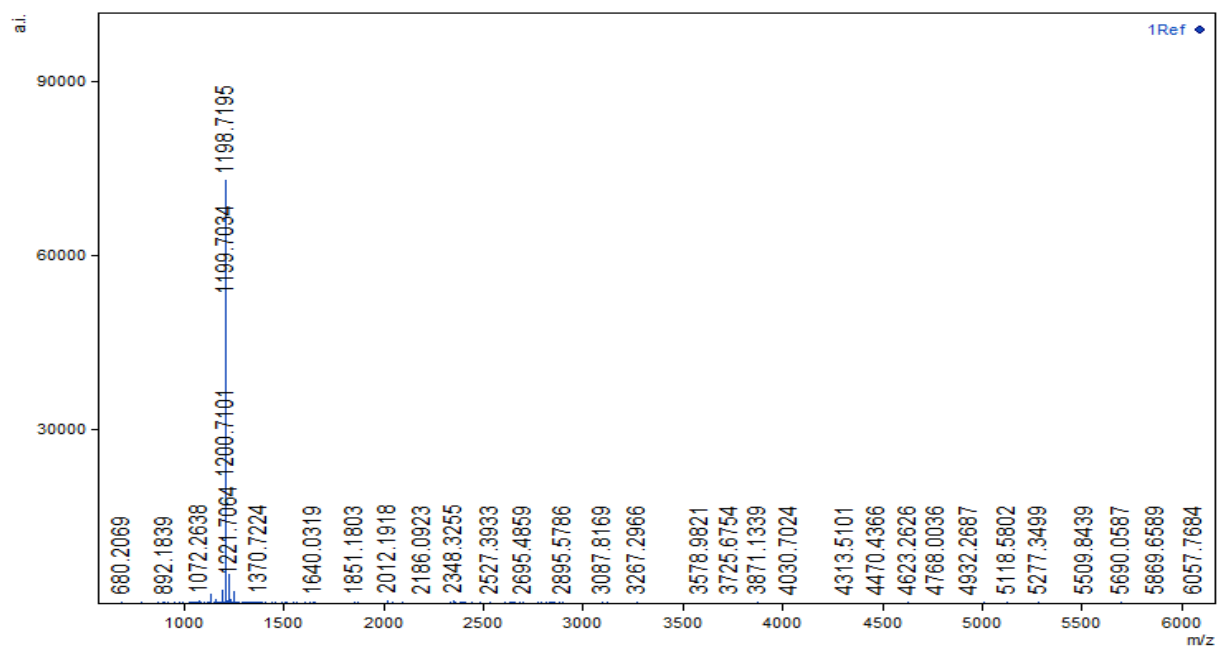


**Figure 1** : Profils HPLC de l'hydrolyse total obtenu par digestion à l'acide chlorhydrique (6N) pendant 24H (A : caséine bovine, B : caséine cameline).

**Annexe 2.** Spectres de masses obtenus par MALDI-TOF des fractions séparées de l'extrait peptidique de la caséine bovine.

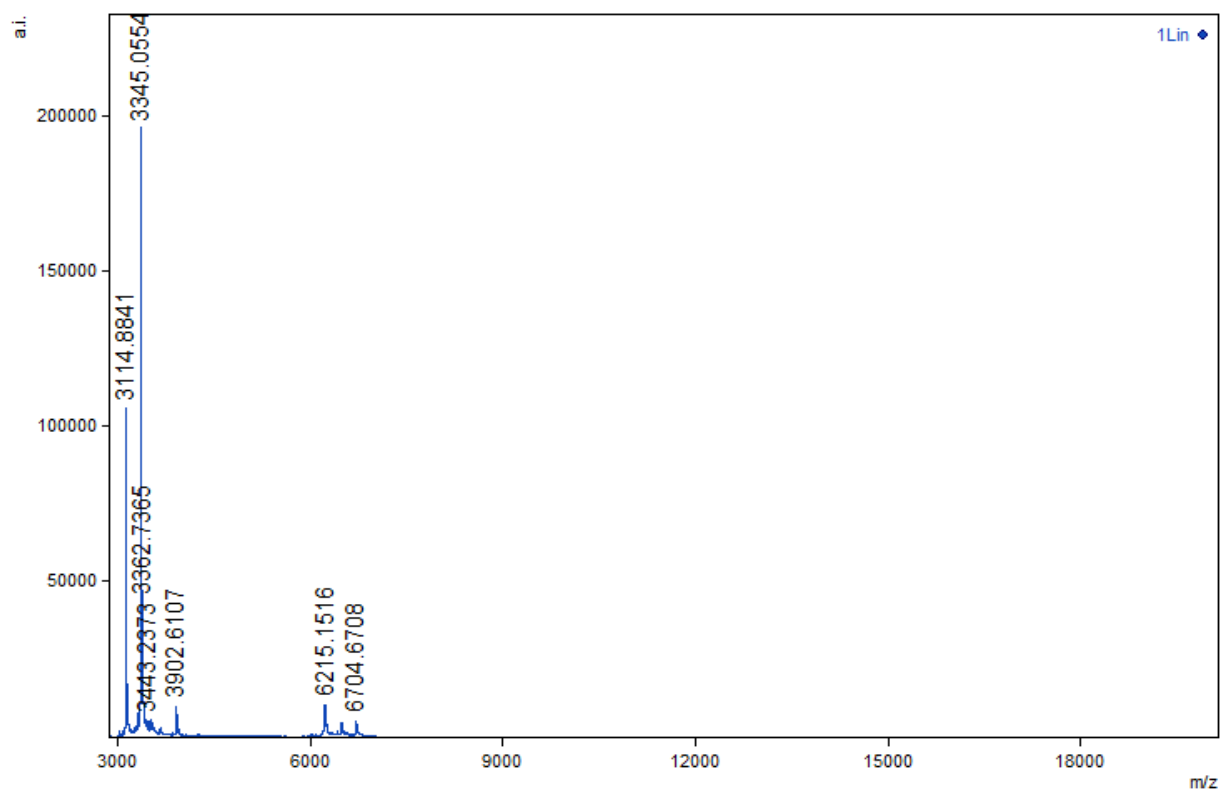


**Figure 1 :** Fraction 1

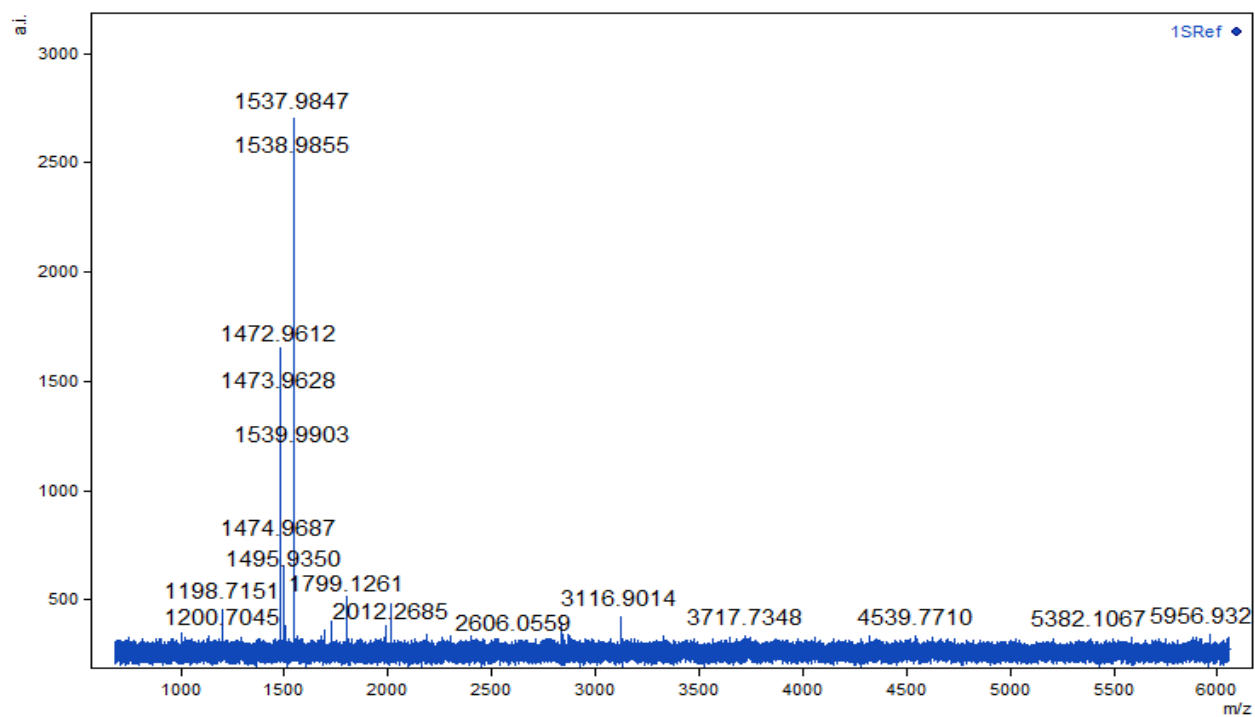


**Figure 2 :** Fraction 2

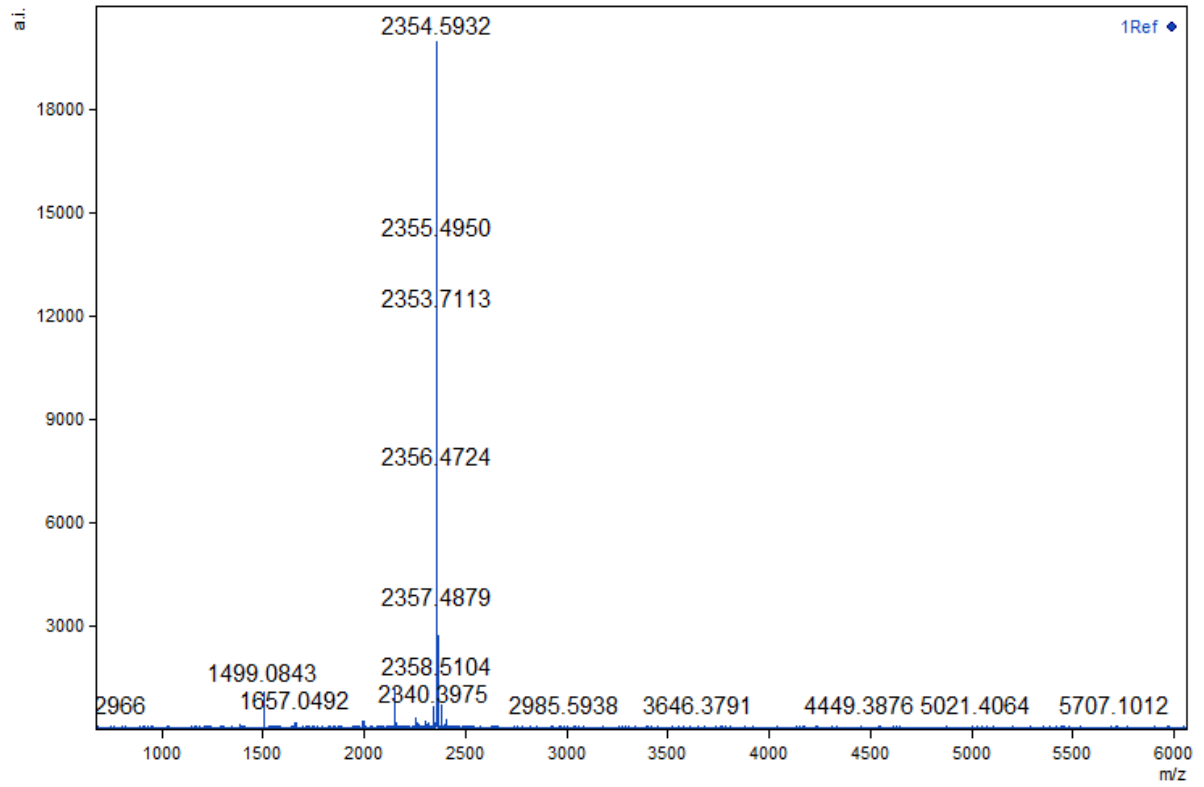
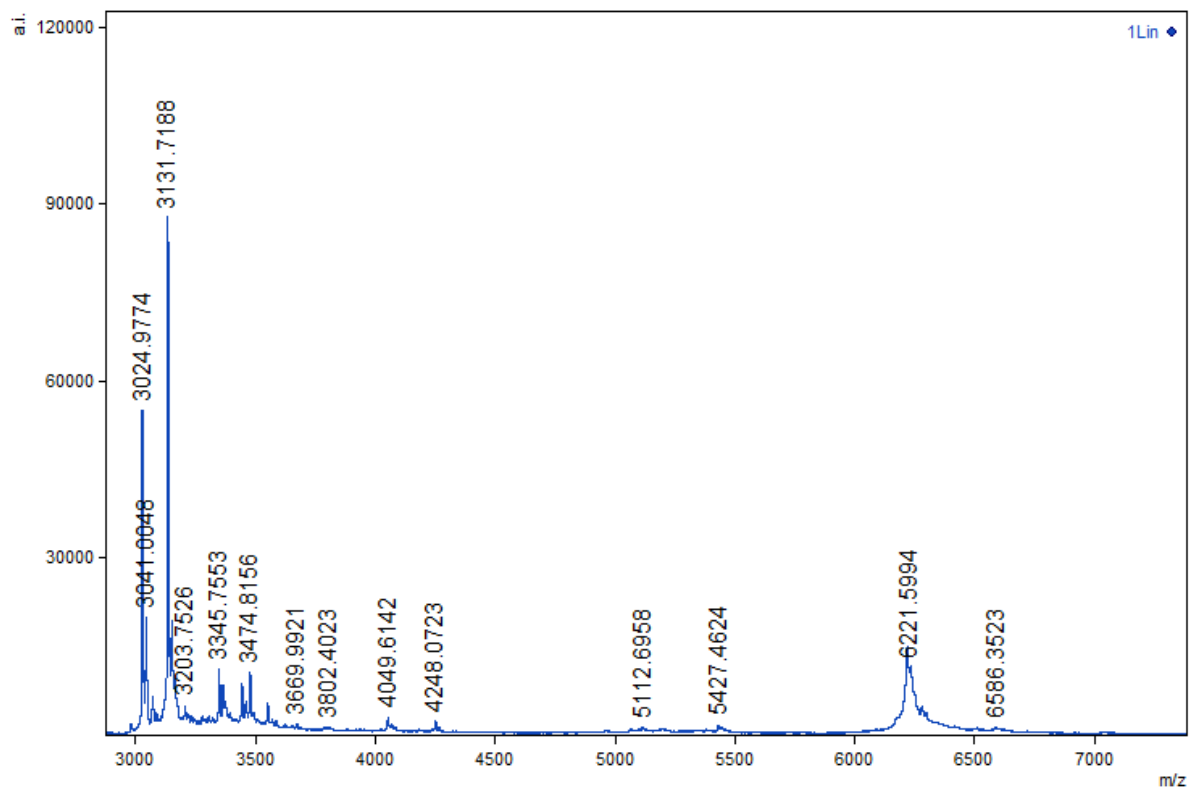




**Figure 3 : Fraction 3**



**Figure 4 : Fraction 6-1**

**Figure 5 : Fraction 6-2****Figure 6 : Fraction 8**

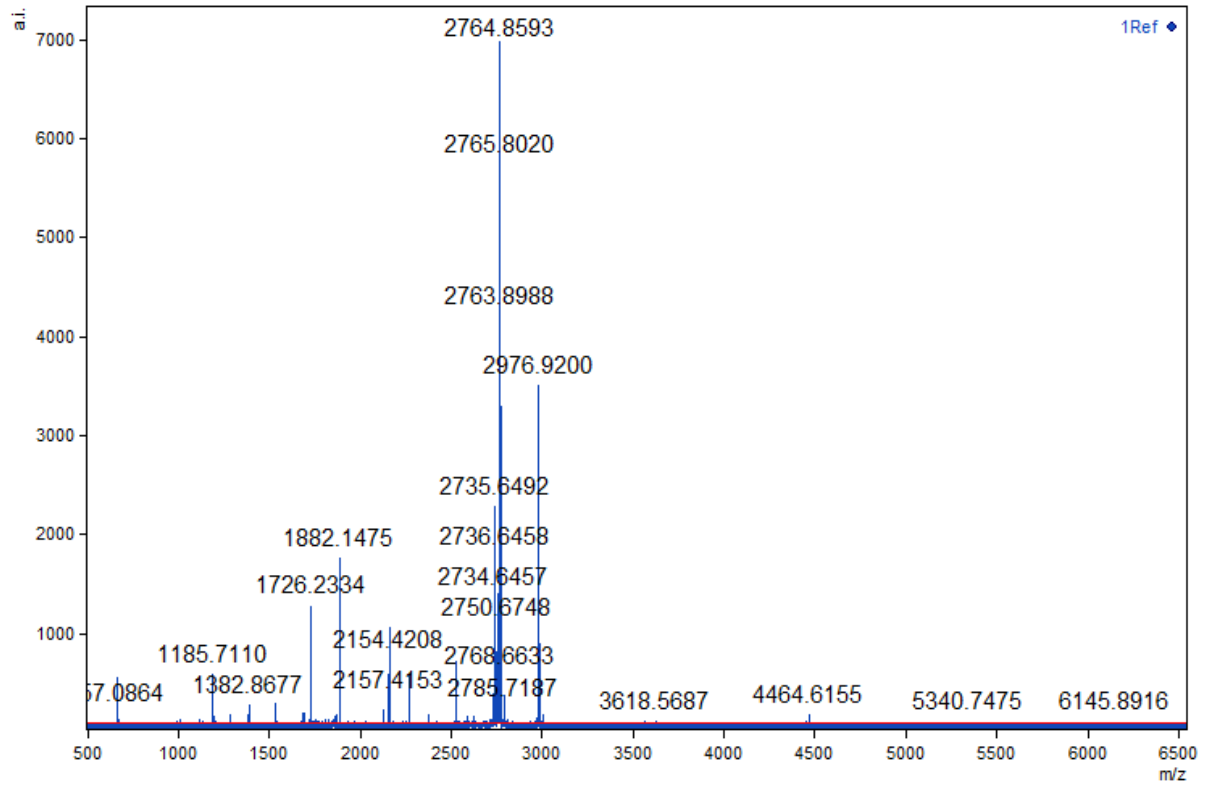


Figure 7 : Fraction 13-2

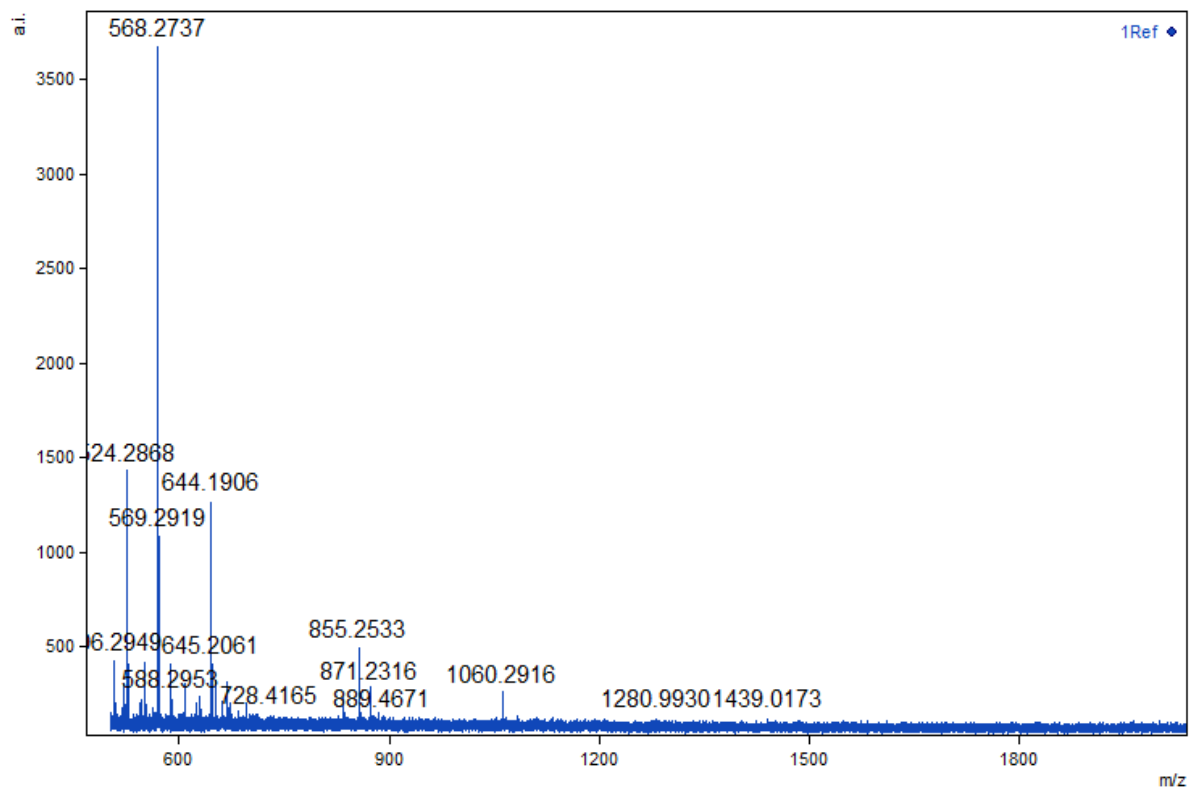


Figure 8 : Fraction 14-2

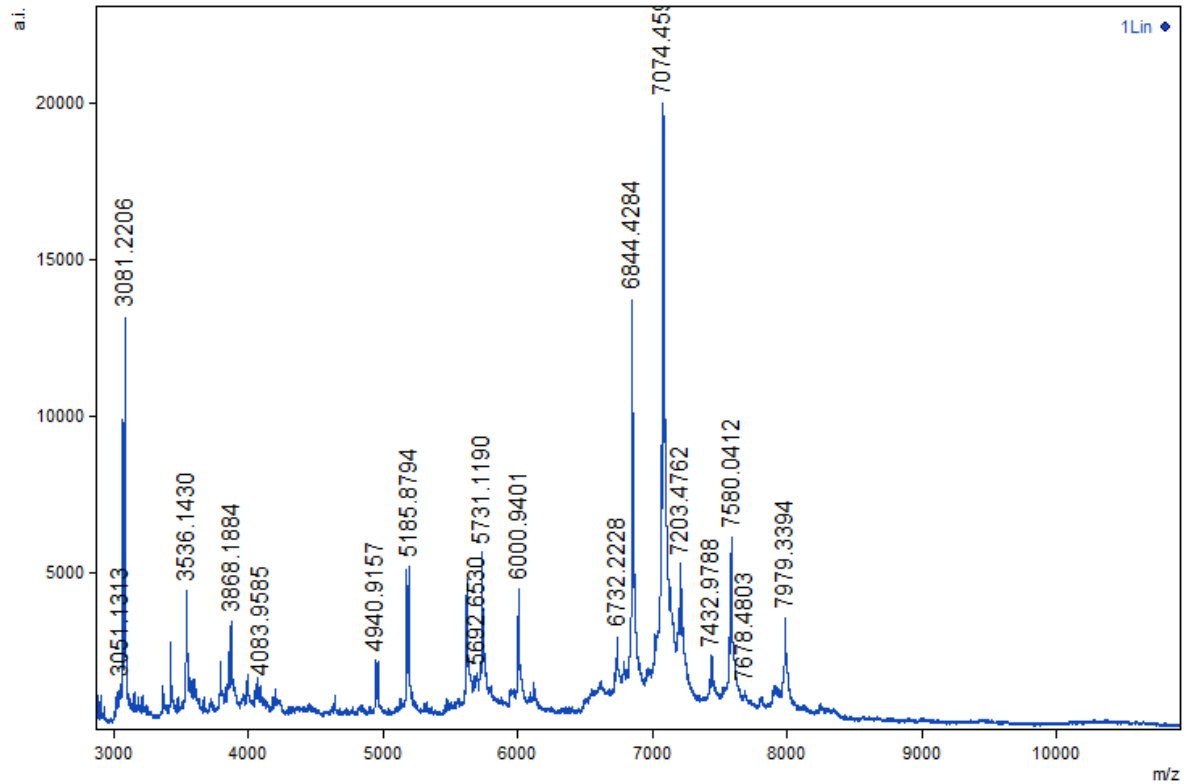


Figure 9 : Fraction 18-1

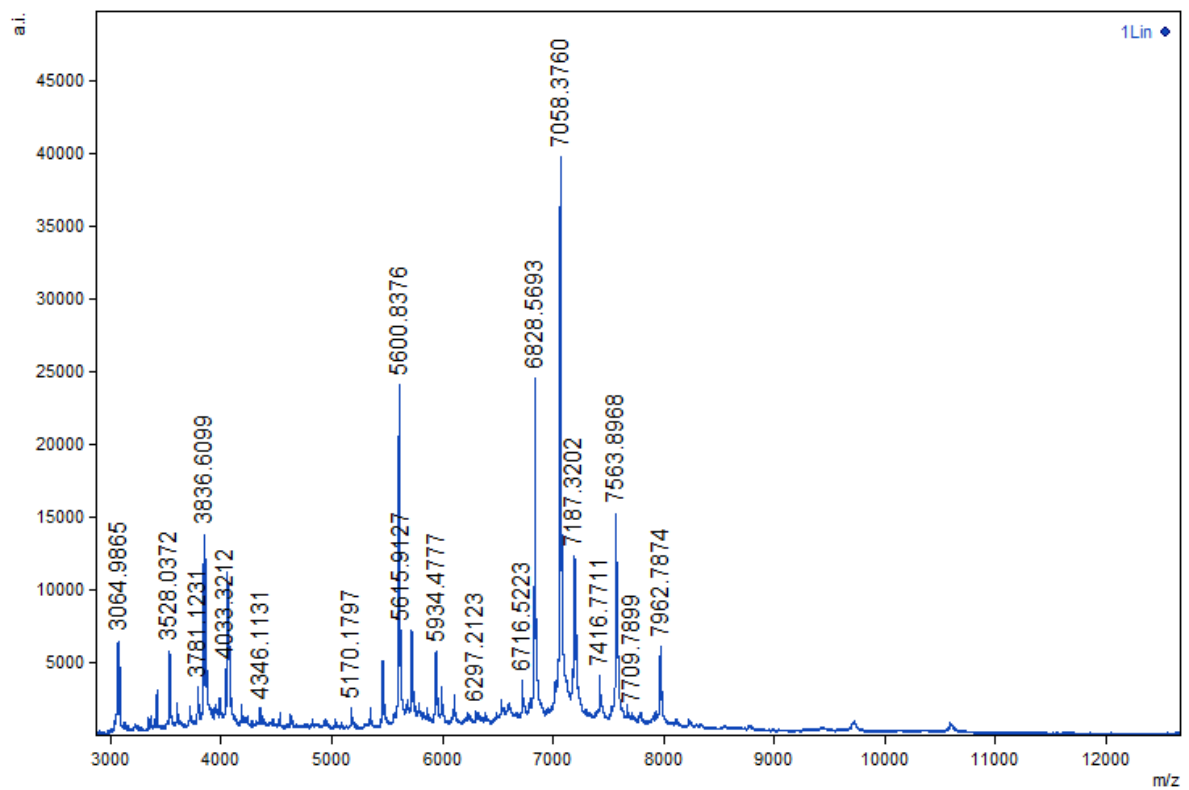
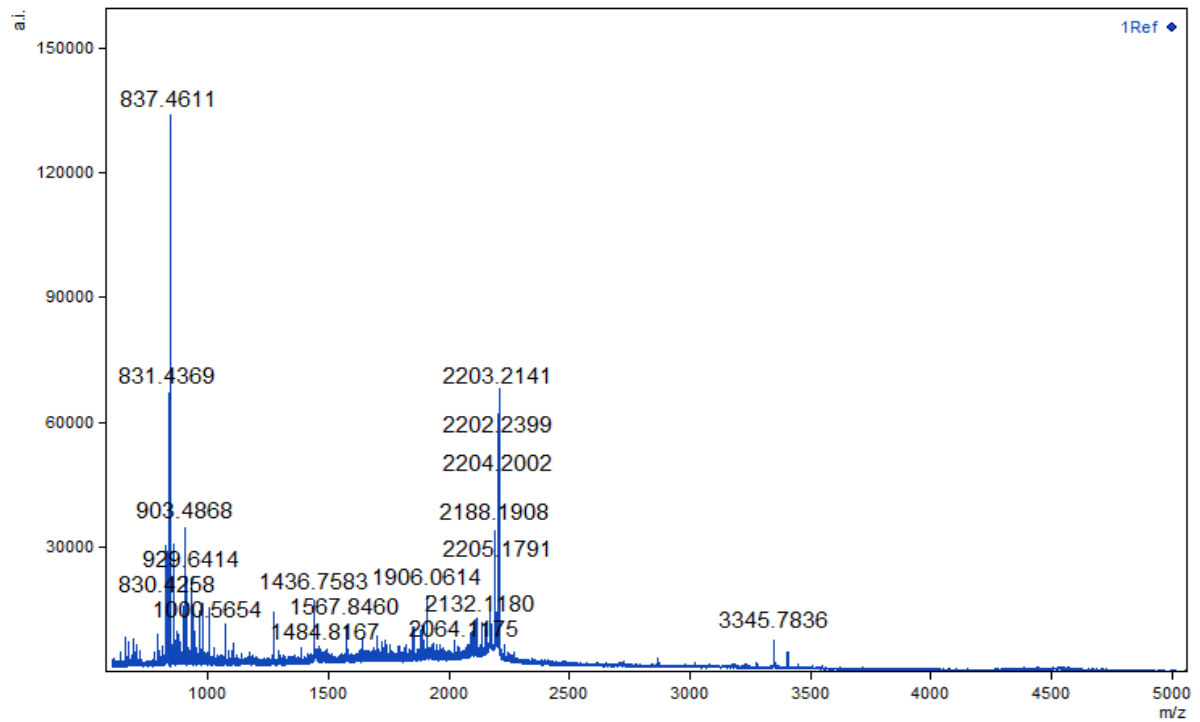
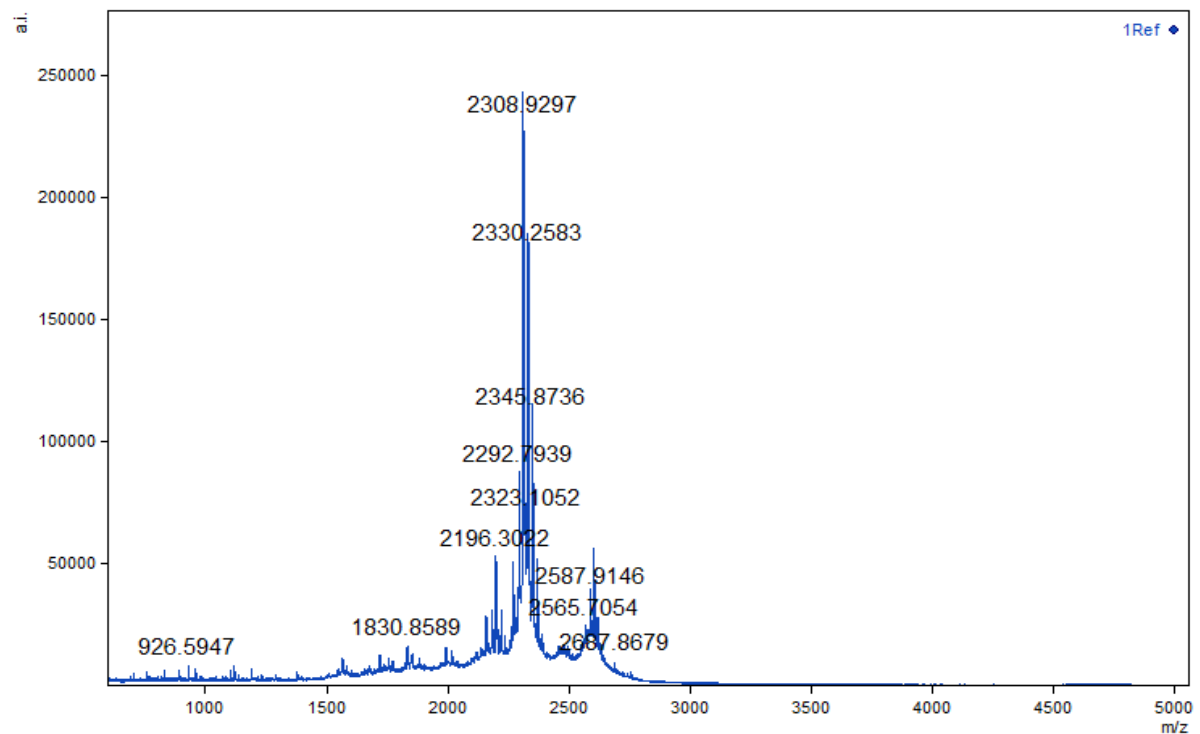


Figure 10 : Fraction 18-2

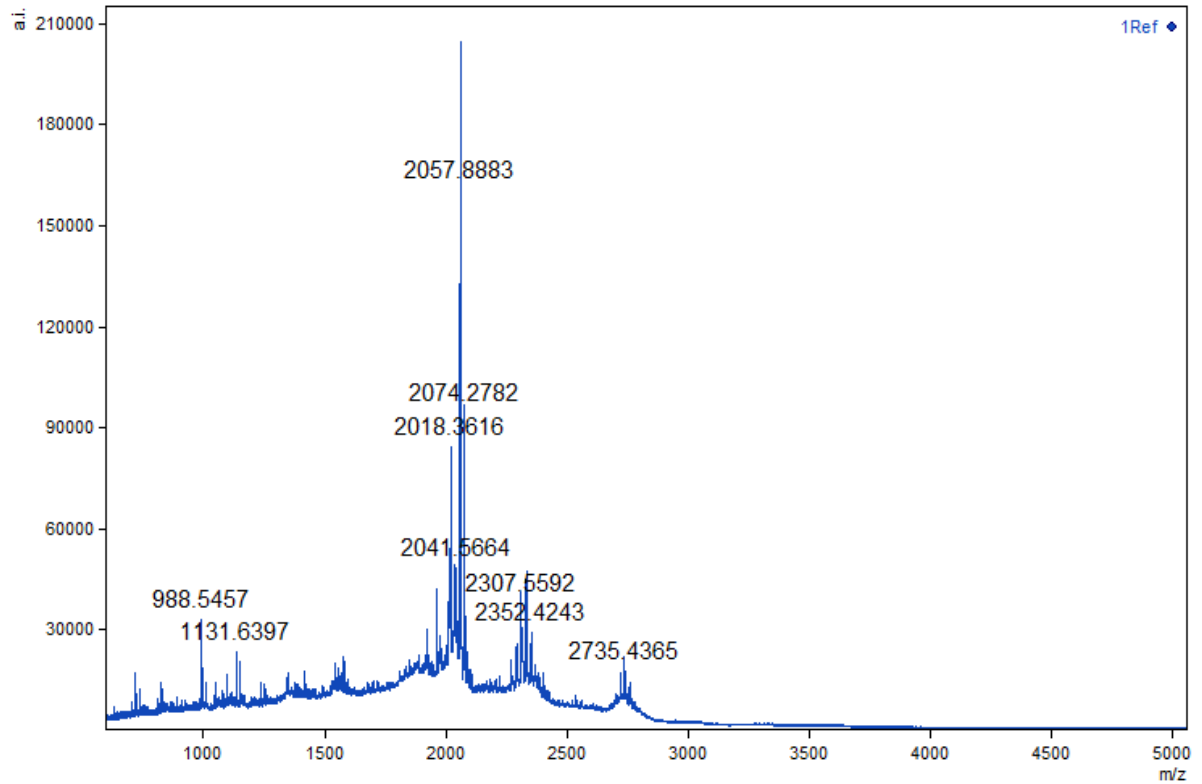
**Annexe 3.** Spectres de masses obtenus par MALDI-TOF des fractions séparées de l'hydrolysate peptidique de 3 H de la caséine cameline.



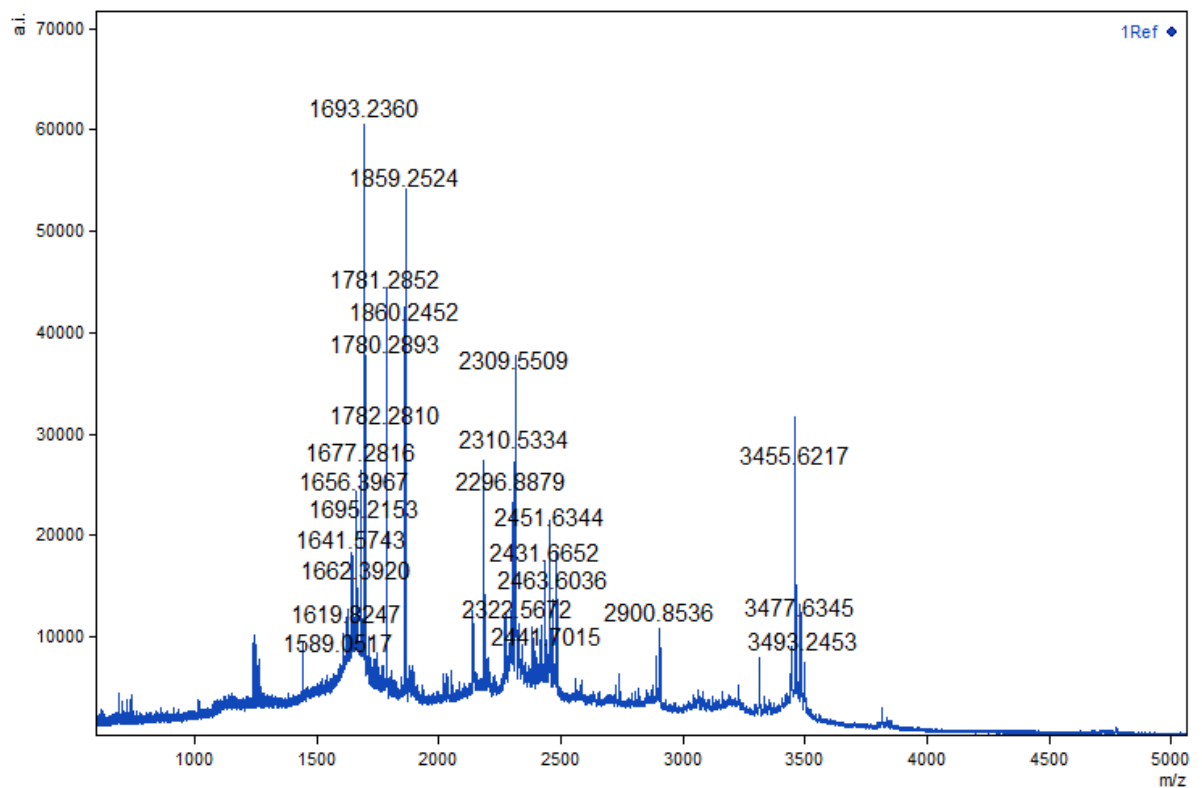
**Figure 1 :** Fraction de 52 min d'élution



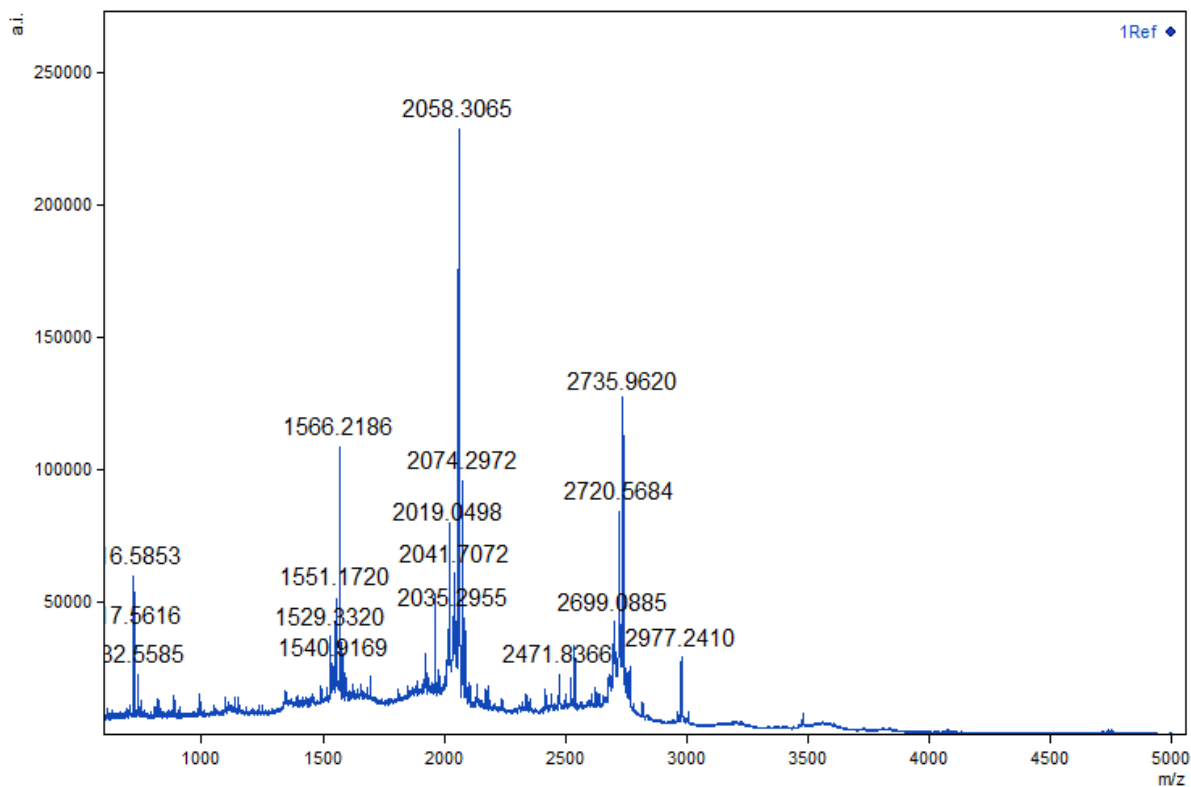
**Figure 2 :** Fraction de 53 min d'élution



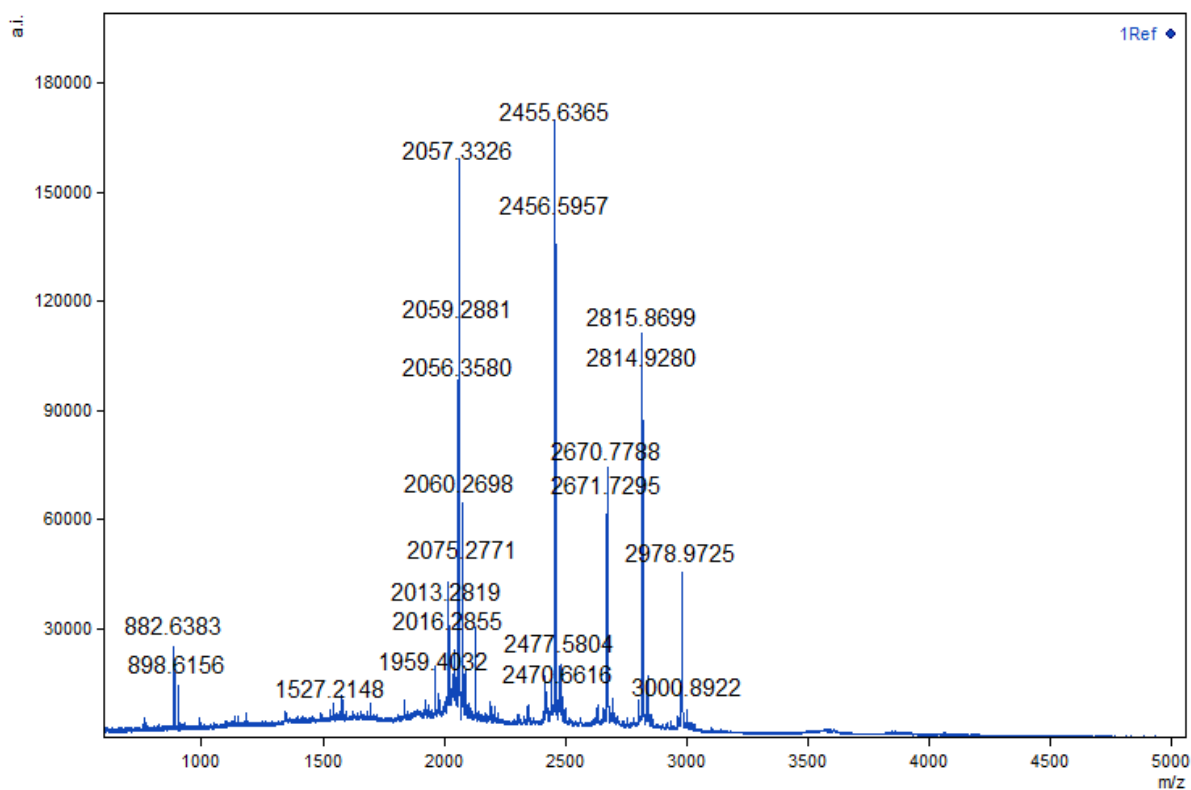
**Figure 3** : Fraction de 54 min d'élution



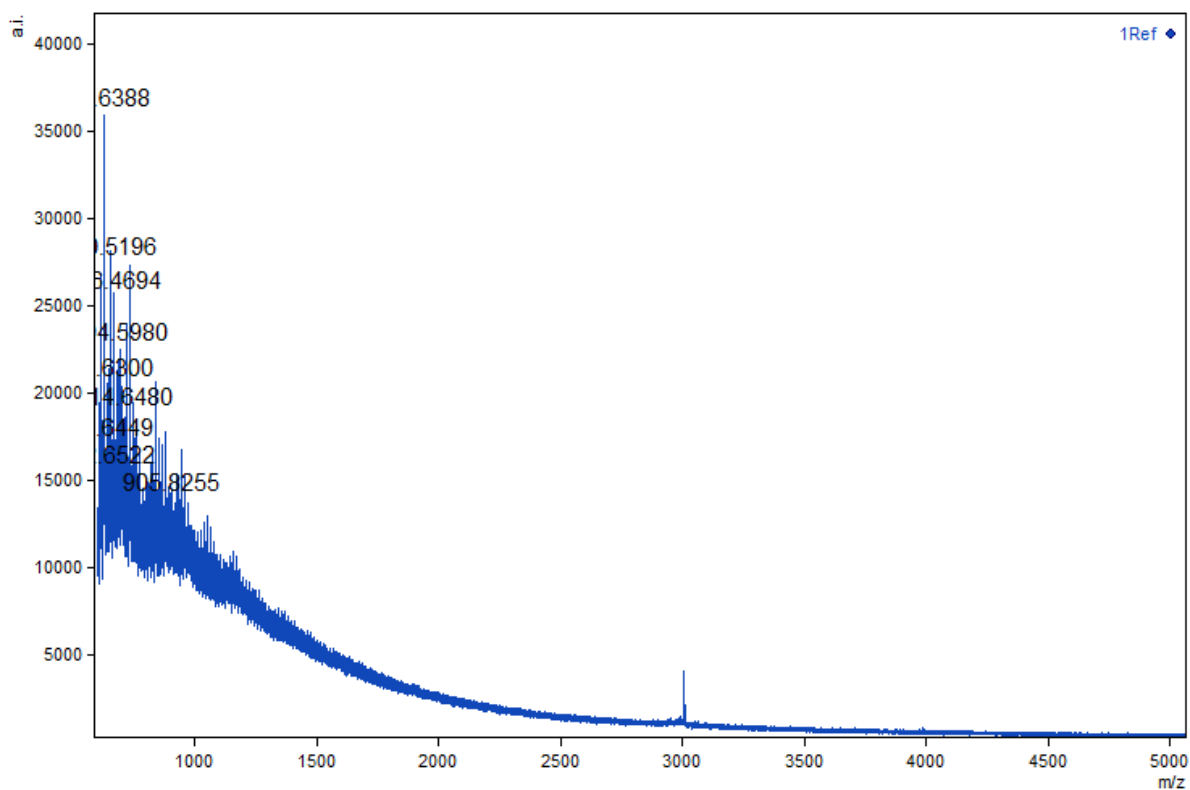
**Figure 4** : Fraction de 55 min d'élution



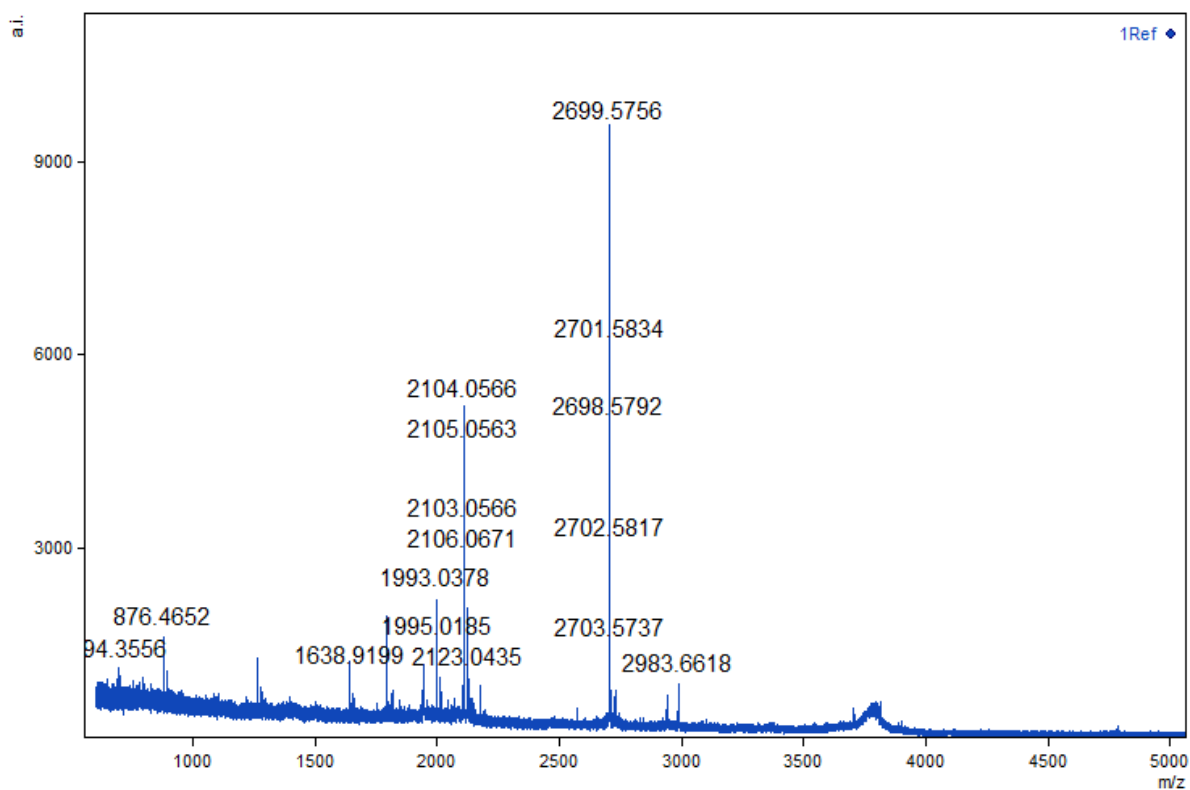
**Figure 5** : Fraction de 56 min d'élution



**Figure 6** : Fraction de 57 min d'élution

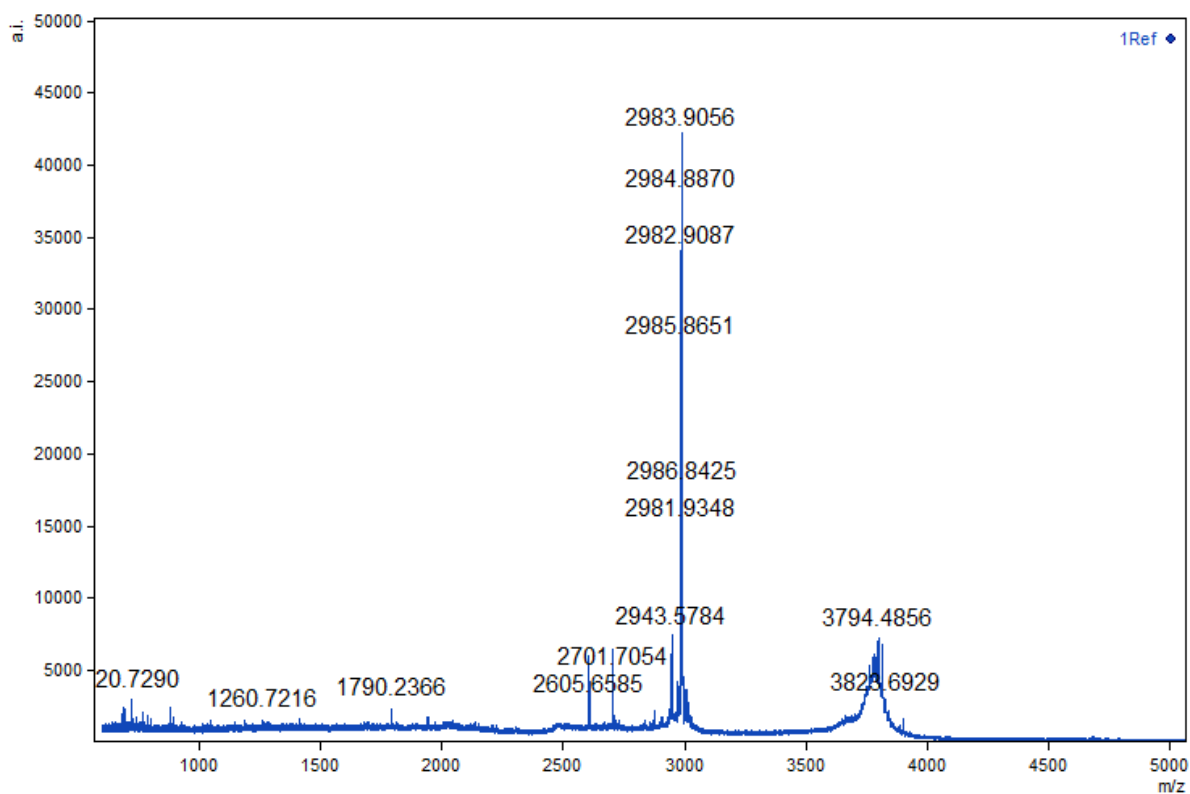


**Figure 7** : Fraction de 58 min d'élution

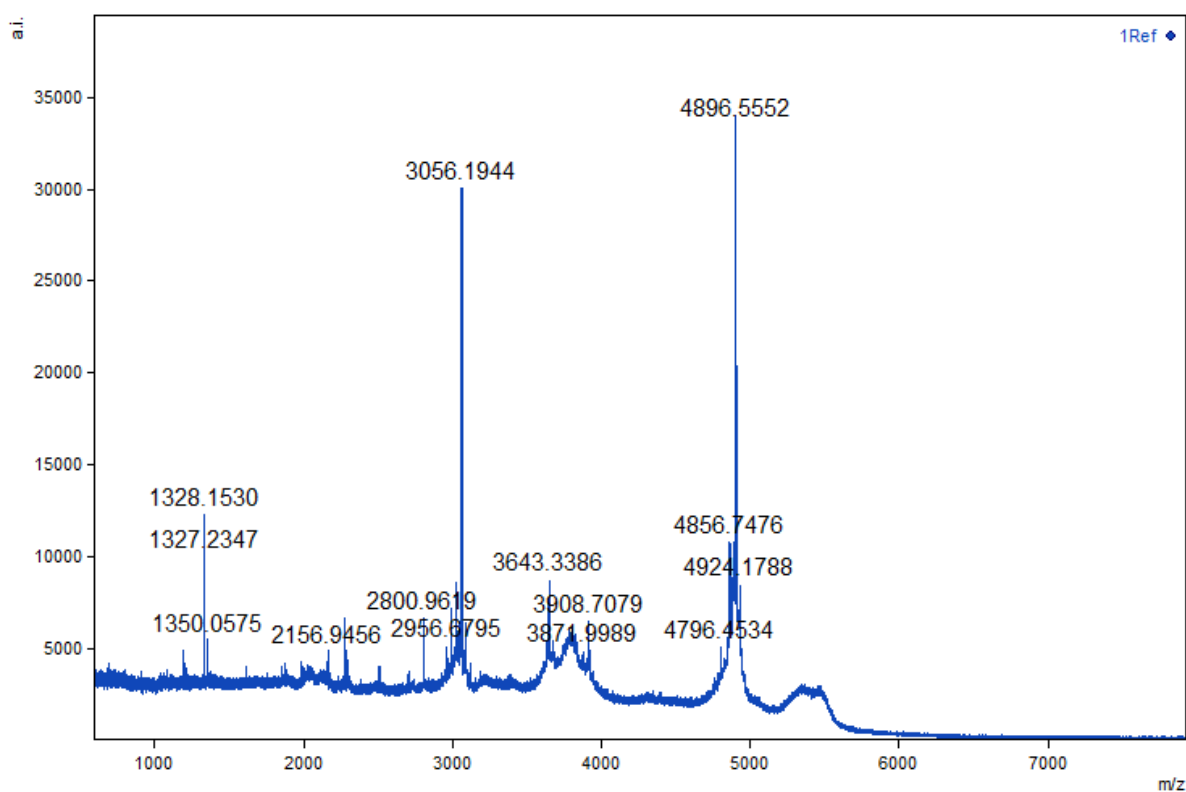


**Figure 8** : Fraction de 64 min d'élution

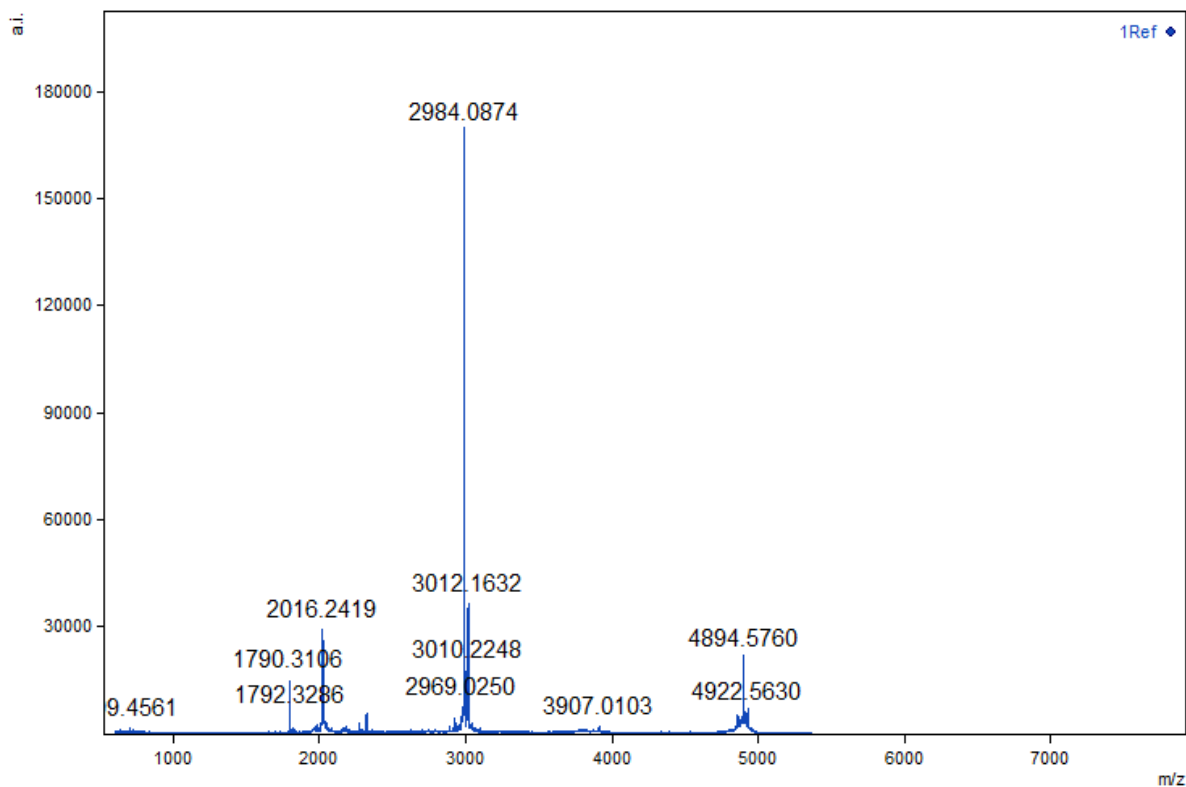




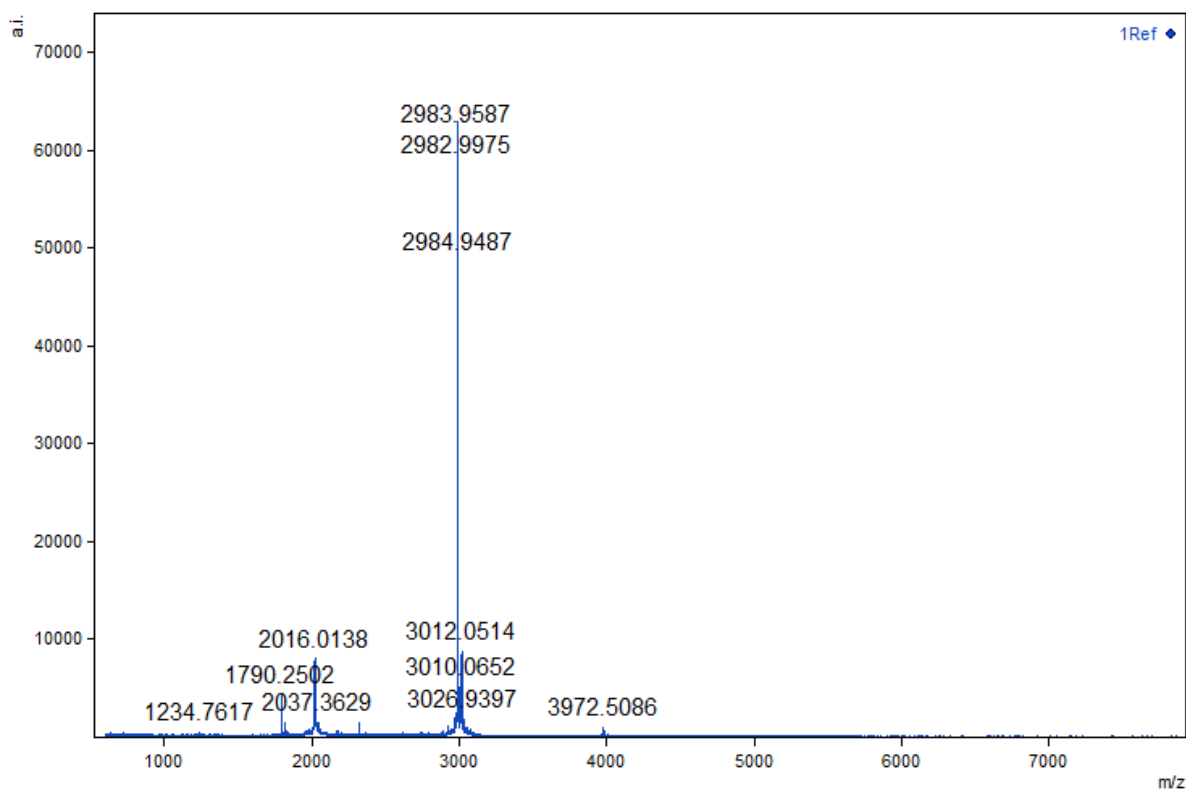
**Figure 9** : Fraction de 65 min d'élution



**Figure 10** : Fraction de 67 min d'élution



**Figure 11** : Fraction de 68 min d'élution



**Figure 12** : Fraction de 69 min d'élution

## Résumé

L'objectif de la présente étude est l'obtention de peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines et camelines. Les peptides d'intérêt sont générés par protéolyse de ces protéines, inactives à l'état natif, sous l'action de trois protéases gastro-intestinales : la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine.

Le suivi de l'hydrolyse est effectué à l'aide d'analyses chromatographiques (RP-HPLC, colonne C18) et électrophorétiques (SDS-PAGE à 15%) et le degré de protéolyse est mesuré par la méthode O-PhthaldiAldehyde (OPA). L'activité antimicrobienne est recherchée sur les hydrolysats bruts par mise en contact avec une souche cible selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les peptides actifs sont identifiés par spectrométrie de masse (LC/MS et MALDI-TOF), après fractionnement et purification sur RP-HPLC. Ils sont caractérisés par détermination de leurs concentrations minimales d'inhibition (CMI) et de la nature, bactériostatique ou bactéricide, de leur activité.

Un extrait enrichi en peptides antimicrobiens est préparé à partir d'hydrolysats pepsiques de caséine bovine par précipitation à NaCl à 2 M et à pH neutre. Les peptides actifs obtenus correspondent à ceux déjà connus de la caséine  $\alpha_{s2}$  (164-179 ; 148-166 ; 180-207 ; 183-207 et 176-207) et à de nouveaux fragments identifiés et dont certains sont des précurseurs de peptides actifs : (131-174), (153-196), (99-137) (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90) et (138-184) pour la caséine  $\alpha_{s2}$  et (9-68/70-126) pour la caséine  $\alpha_{s1}$ . L'extrait enrichi en peptides antimicrobiens ainsi que le peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207), séparé à l'état pur, ont présenté des valeurs de CMI plus faibles sur les souches à Gram-positif comparées à celles déterminées sur les souches à Gram-négatif. A la CMI, ils présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram-positif et un effet bactéricide sur les souches à Gram-négatif.

L'action de la pepsine sur les caséines camelines libère également des peptides antimicrobiens. Les peptides actifs identifiés correspondent aux fragments (66-90), (83-98), (109-126) de la caséine  $\alpha_{s1}$  ; (106-129), (1-19) et (126-142) de la caséine  $\alpha_{s2}$  ; (22-43), (52-69), (50-67) et (77-95) de la caséine  $\beta$  et (121-141), (116-136), (83-100), (106-124), (12-27) et (61-79) de la caséine  $\kappa$ .

L'action protéolytique de la pepsine offre donc, la possibilité de générer des peptides antimicrobiens à partir des caséines bovines et camelines. Par contre, pour la trypsine et la chymotrypsine, la protéolyse tentée dans les conditions de cette étude sur les caséines des deux espèces animales n'a pas révélé de fragments intéressants.

L'action des trois protéases sur les caséines suit un mécanisme intermédiaire entre le mécanisme « one by one » et « zipper ». D'après les résultats obtenus les peptides antimicrobiens sont des produits d'hydrolyse intermédiaires. Ainsi, l'application des conditions d'hydrolyse favorisant le mécanisme « zipper » mérite d'être étudié afin d'optimiser la libération de peptides d'intérêt.

La pepsine et la trypsine montrent une action plus poussée sur la caséine bovine comparée à leur action sur la caséine cameline. Exprimée en degré d'hydrolyse (DH), cette action a été évaluée au bout de 24 H à  $8,21 \pm 0,761\%$  contre  $5,41 \pm 0,057\%$  pour la pepsine et à  $9,91 \pm 0,409\%$  contre  $8,94 \pm 0,106\%$  pour la trypsine sur la caséine bovine et cameline respectivement. Cependant, la chymotrypsine montre un DH final comparable sur les protéines des deux espèces ( $8,70 \pm 0,413$  contre  $8,80 \pm 0,205\%$  pour la caséine bovine et cameline, respectivement).

**Mots clés :** peptides antimicrobiens, caséines bovines et camelines, pepsine, trypsine et chymotrypsine, RP-HPLC, MALDI-TOF, CMI.

## Abstract

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

The hydrolysis is carried out by the action of three gastrointestinal proteases; pepsin, trypsin and chymotrypsin. The hydrolysis is followed by chromatographic (RP-HPLC, C18 column) and electrophoresis (SDS-PAGE, 15 %) analysis. The degree of hydrolysis is measured by the O-Phthaldialdehyde method (OPA). The antimicrobial activity is sought on raw hydrolysates by a plate diffusion assay. The active peptides were identified by mass spectrometry (LC/MS and MALDI-TOF), after split and purification on RP-HPLC. They are characterized by determination of the Minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal or bacteriostatic properties.

A peptide extract enriched antimicrobial peptides is prepared from pepsin hydrolysis of bovine casein by precipitation at 2 M NaCl and neutral pH. The active peptides are derived from  $\alpha_{s2}$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -casein. They correspond to fragments (164-179) (148-166), (180-207) (183-207) and (176-207) of the  $\alpha_{s2}$ -casein. New active peptides were identified; (131-174), (153-196) (99-137) (99-163/100-164), (114-176) (115-174), (126-184), (28-90), (138-184) of  $\alpha_{s2}$ -casein and (9-68/70-126) of  $\alpha_{s1}$ -casein. The peptide extract and a pure peptide  $\alpha_{s2}$  (164-207), showed lower MIC values against Gram-positive bacteria compared to those determined on Gram-negative strains tested. At a concentration equal to the MIC, the tested peptides have a bacteriostatic effect and a bactericidal effect on Gram-positive and on Gram-negative strains, respectively.

The action of pepsin on camel caseins also releases antimicrobial peptides. The peptides identified correspond to fragments (66-90), (83-98), (109-126) of  $\alpha_{s1}$  casein; (106-129), (1-19) et (126-142) of  $\alpha_{s2}$  casein; (22-43), (52-69), (50-67) et (77-95) of  $\beta$  casein et (121-141), (116-136), (83-100), (106-124), (12-27) et (61-79) of  $\kappa$  casein.

Under imposed hydrolysis conditions, trypsin and chymotrypsin hydrolysis of casein from the two species, does not release peptides with antimicrobial activity. The study of the action of these proteases in different hydrolysis conditions should be considered.

The action of the three proteases on casein follows an intermediate mechanism between the mechanism "one by one" and "zipper". According to the results, antimicrobial peptides are intermediate hydrolysis products. Thus, the application of hydrolysis conditions favoring the mechanism "zipper" deserves to be studied in order to optimize the release of peptides of interest.

Bovine caseins were more susceptible to hydrolysis by pepsin and trypsin than camel caseins. The extent of hydrolysis measured over 24H is evaluated at  $8.21 \pm 0.761\%$  against  $5.41 \pm 0.057\%$  for pepsin and at  $9.91 \pm 0.409\%$  against  $8.94 \pm 0.106\%$  for trypsin on bovine and camel caseins respectively. Whereas, when using chymotrypsin, The extent of hydrolysis is similar on both species ( $8.70 \pm 0.413$  against  $8.80 \pm 0.205\%$  for bovine and camel caseins, respectively).

**Key words:** antimicrobial peptides, bovine and camel caseins, pepsin, trypsin, chymotrypsin, RP-HPLC, MALDI-TOF, MIC.

## ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو الحصول على ببتيدات مضادة للمكروبات من كازين حليب الأبقار و الإبل . يتم إنشاء هذه الببتيدات من التحلل البروتيني لهذه البروتينات الغير نشطة في حلتها الأصلية .و يتم التحلل بواسطة ثلاث إنزيمات هضمية : الببسين، التربيسين و الكيموتريبسين.

يتبع التحلل عن طريق التحليل الكروماتوغرافي (RP-HPLC C18)، و الكهربائي ( SDS-PAGE 15% ) و يتم قياس درجة التحلل بأسلوب (OPA) O-PhthaldiAldehyde. تم تحديد الببتيدات النشطة بقياس الطيف الكتلي (MALDI-TOF و LC/MS) بعد تنقيتها بواسطة التحليل الكروماتوغرافي و ميزة هذه الببتيدات عن طريق تحديد تركيز الحد الأدنى المثبط (MIC) و طريقة تأثيرها على البكتيريا .

التحلل بفعل الببسين ينتج ببتيدات مضادة للميكروبات من كازين الأبقار و الإبل. تم تحضير مستخلص من الببتيدات المضادة من حلامة الكازين البقري بانتزاع هذه الببتيدات عن طريق الترسيب تحت تأثير القوة الأيونية و درجة الحموضة. تستمد الببتيدات النشطة من كازين  $\alpha_2$  و كازين  $\alpha_1$  إنها تتوافق مع الشظايا (179-164) (148-166) (207-180) (207-183) (207-176) كازين  $\alpha_2$ . وقد تم تحديد ببتيدات نشطة جديدة : (174-132) (153-196) (137-99) (164-100) (176-114) (174-115) (184-126) (90-28) (184-138) من كازين  $\alpha_2$  و (9-68) (126-70) من كازين  $\alpha_1$ . الببتيد  $\alpha_2$  (207-164) الذي تم فصله في حالة نقية و مستخلص الببتيدات النشطة أدهرو انخفاض في قيم الحد الأدنى المثبط (MIC) على البكتيريا إيجابية الجرام مقارنة بتلك التي حددت على سلالات سالبة الجرام. الببتيدات المضادة التي تم اختبارها بتركيز يساوي لقيمة (MIC) ، يكون لها تأثير مثبت على تكاثر البكتيريا إيجابية الجرام و تأثير مبيد على سلالات سالبة الجرام .

عمل الببسين على كازين الإبل يوفر أيضا الببتيدات المضادة للمكروبات. هذه الببتيدات تتوافق مع شظايا (66-90) (98-83) (126-109) من كازين  $\alpha_1$  ، (129-106) (149-126) (19-1) من كازين  $\alpha_2$  ، (43-22) (69-52) (67-50) (95-77) من كازين  $\beta$  و (141-121) (136-116) (100-183) (124-106) (27-12) (79-61) من كازين  $\kappa$  .

وفقا للشروط المفروضة ، التحلل المائي لكازين حليب الأبقار و الإبل بالتربيسين و الكيموتريبسين لا يعطي ببتيدات ذات نشاط مضاد للميكروبات.

الإنزيمات الثلاث تعمل على الكازين وفقا لآلية وسيطة بين الآلية (واحد تلو الآخر) و (سحاب) . وفقا لنتائج المتحصل عليها ، الببتيدات المضادة للميكروبات هي منتجات التحلل وسيطة و بالتالي فإن تطبيق شروط التحلل لصالح آلية (سحاب) يستحق أن يدرس من أجل تحسين إنتاج الببتيدات النشطة.

الببسين والتربيسين لها تأثير أكبر على كازين البقر مقارنة مع عملها على كازين الإبل. معربا في درجة التحلل (DH)، تم تقييم هذا التأثير بعد 24 ساعة بقيمة  $0.761 \pm 8.21$  % مقابل  $0.057 \pm 5.41$  % للببسين و  $0.409 \pm 9.91$  % مقابل  $0.106 \pm 8.94$  % لتربيسين على كازين البقر وكازين الإبل على التوالي. بينما الكيموتريبسين لديه درجة من التحلل النهائي (DH) مماثلة لكلا النوعين من البروتين ( $0.205 \pm 8.80$  % مقابل  $0.413 \pm 8.70$  % لكازين الإبل و كازين البقر على التوالي).

**الكلمات الرئيسية :** الببتيدات المضادة للميكروبات ، كازين البقر و الإبل ، ببسين ، تربيسين ، كيموتريبسين ؛ HPLC .MALDI-TOF, CMI

Une partie des résultats obtenus dans cette étude, a fait l'objet d'une publication et de 4 communications affichées :

**Faiza Adoui**, Fateh Boughera, Guabrielle Chataigne, Nour-Eddine Chihib, Hacene El ameur, Pascal Dhulster, Mohammed Nasreddine Zidoune, Naima Nedjar-Arroume (2013)

A Simple Method to Separate the Antimicrobial Peptides from Complex Peptic Casein Hydrolysate and Identification of a Novel Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine  $\alpha$ s-Casein.

International Review of Chemical Engineering (I.RE.CHE.), Vol. 5, N. 2, 179-187.

**Adoui F**, Chataigne G., Chihib N, Dhulster P, Zidoune M.N. Nedjar-Arroume N.

Obtaining antimicrobial peptides by pepsin hydrolysis of bovine casein.

Third International Symposium on antimicrobial peptide -"To day Knowledge and future applications June, 13-15, 2012, Lille (Villeneuve d'ascq), France.

**Adoui F**, Chataigne G., Chihib N, Dhulster P, Nedjar-Arroume N., Zidoune M.N.

The prediction study of antimicrobial peptides derived from casein by online proteomics programs, comparison with those generated in vitro into the peptic casein hydrolysate.

Third International Symposium on antimicrobial peptide -"To day Knowledge and future applications June, 13-15, 2012, Lille (Villeneuve d'ascq), France.

**Adoui F**, Chataigne G., Chihib N, Dhulster P, Zidoune M.N. Nedjar-Arroume N.

*Hydrolyse pepsique de la caséine bovine : Obtention de peptides à activité antimicrobienne.*

Peptides issus des procédés d'hydrolyse, Filières Industrielles, colloque AdeBioTech-SFGP, 2 et 3 Octobre 2012, Parc Biotech, Paris-Romainville.

**Adoui F**, Boughellout H., Aissaoui-Zitoun O., Nedjar-Arroume N., Zidoune M.N.

Pepsin hydrolysis of bovine and camel casein

Bio-based technologies in the context of European food innovation systems, EFFoST annual meeting, 13-15 Novembre 2013, Bologna, Italy.

## **A Simple Method to Separate the Antimicrobial Peptides from Complex Peptic Casein Hydrolysate and Identification of a Novel Antibacterial Domains within the Sequence of Bovine $\alpha_2$ -Casein**

Faiza Adoui<sup>1</sup>, Fateh Boughera<sup>2</sup>, Guabrielle Chataigne<sup>3</sup>, Nour-Eddine Chihib<sup>4</sup>,  
 Hacene El Hameur<sup>5</sup>, Pascal Dhulster<sup>6</sup>, Mohammed Nasreddine Zidoune<sup>7</sup>,  
 Naima Nedjar-Arroume<sup>8</sup>

**Abstract** – A simple method to separate antimicrobial peptides from complex peptic hydrolysate of bovine casein is proposed. It consists to precipitation of the active peptides under ionic strength and pH conditions. The peptide extract obtained was fractionated using reverse phase high performance liquid chromatography and the actives fractions are analyzed by mass spectrometry (LC-ESI-MS and MADI-TOF). Several peptides derived mostly from  $\alpha_2$ -casein are identified. The major component in active fractions are  $\alpha_2$ -CN f(164-179),  $\alpha_2$ -CN f(148-166),  $\alpha_2$ -CN f(180-207),  $\alpha_2$ -CN f(183-207),  $\alpha_2$ -CN f(131-174),  $\alpha_1$ -CN f(153-196),  $\alpha_1$ -CN f(141-187),  $\alpha_2$ -CN f(176-207),  $\alpha_2$ -CN f(164-207),  $\alpha_2$ -CN f(99-163). The minimum inhibitory concentration and mode of action of the peptide extract and purified peptide  $\alpha_2$ -CN f(164-207) were studied against several Gram-positive and Gram negative Bacteria. **Copyright © 2013 Praise Worthy Prize S.r.l. - All rights reserved.**

**Keywords:** Antimicrobial Peptides,  $\alpha_2$ -Casein, Hydrolysis, Precipitation

### Nomenclature

LC-	Liquid Chromatography - Electrospray
ESI/MS	Ionization/ Mass Spectrometry
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography
DH	Degree of Hydrolysis
MALDI-	Matrix Assisted Laser Desorption
TOF	Ionization - Time Of Flight
MIC	Minimum Inhibitory Concentration

### I. Introduction

The use of food protein as a source of antimicrobial peptides appears among the current voices of research for natural molecules. Indeed, during these last decades, several studies reported the antibacterial properties of some food proteins (lysozyme, lactoperoxidase, lactoferrin...) [1], [2], as well as the possibility of generating active peptides by enzymatic hydrolysis of the precursor protein in vivo or in vitro [3], [4]. Thus, several antimicrobial peptides were obtained by enzymatic hydrolysis of bovine hemoglobin.

The first peptide obtained by pepsin hydrolysis of this protein corresponded to the fragment  $\alpha(1-23)$ , active against *Micrococcus luteus* [5]. Thereafter, within the same laboratory thirty active peptides were purified and characterized [6], [7].

In 1998, Ibrahim et al. [8] isolated by acid hydrolysis of the chicken ovotransferrin a peptide f(109-200).

From lysozyme of chicken egg white, the same authors arrived, in 2001, to isolate after hydrolysis with clostripaine a peptide f(98-112) [9]. However, milk proteins showed most interest. Indeed, The biodefensive properties of these proteins have been well described and widely recognized for several decades. The antimicrobial properties of lactoferrin, lysozyme and lactoperoxidase are now well studied [4].

Moreover several antimicrobial peptides were released by enzymatic hydrolysis of major milk protein, inactive in the native state. LAHOV et al., (1971) [10] were the first to identify polypeptides of high molecular weight and basic character after treatment of acidified milk by rennet. In 1974, HII et al. [11] identified the «Isracidin»: antimicrobial peptide corresponding to the N-terminal fragment f(1-23) of  $\alpha_{s1}$ -casein. From  $\alpha_{s2}$ -casein, Zucht et al., (1995) [12] isolated the «casocidine» I f(165-203), and in 1999, Recio and Visser [13] have isolated two other antimicrobial peptides corresponding to fragments f(183-207) and f(164-179), through pepsin hydrolysis. McCann et al. in 2005 [14], have separated by the action of chymosin other peptides from the same region of the  $\alpha_{s2}$ -casein, f(181-207, 180-207, 175-207,172-207, 164-207). In 2006, [15] this team arrived to separate, by peptic hydrolysis of sodium caseinate, the peptide f(183-207) from  $\alpha_{s2}$ -casein, already identified and a fragment.

f(99-109), of  $\alpha_{s1}$ -casein. Two antimicrobial peptides were obtained from  $\kappa$ -casein.

The first, called «kappacine», corresponding to the fragment f(138-158), showed an action toward cariogenic bacteria [16]. The second peptide whose sequence corresponds to the fragment f(63-117) was isolated through pepsin hydrolysis of human  $\kappa$ -casein [17]. Hydrolysis of human milk by *Lactobacillus helveticus* PR4 protease released a peptide corresponding to the fragment f(184-210) of  $\beta$ -casein [18]. Two whey protein,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin have also generated by enzymatic hydrolysis several antimicrobial peptides [19], [20]. These peptides are mainly active on Gram-positive bacteria. Lactoferricin, corresponding to the fragment f(17-41), is the first antimicrobial peptide released by peptic hydrolysis of lactoferrin, minor milk protein [21]. Other peptides corresponding to the fragment f(277-288), f(267-285), f(267-288), f(268-284) of lactoferrin were also separated [22].

Besides the fact that they represent an interesting source of antimicrobial peptides, the interest in casein is due to their availability and ease of their separation from milk. However, the separation of antimicrobial peptides from enzymatic hydrolysates needs fastidious and expensive techniques and finally without sufficient quantities of active peptides for subsequent characterizations particularly in relation to the application study. So, the aim of our study is revisit the possibility of applying conventional methods such as precipitation under the influence of ionic strength and pH. In the present paper, we try to develop a simple and non expensive method to recover the active peptide from complex bovine casein hydrolyzate by optimizing the separation conditions through ionic strength and pH parameters.

## II. Materials and Methods

### II.1. Materials and Bacterial Cultures

Bovine sodium caseinate, pig pepsin (EC 3.4.23.1, 3,200-4,500 units/mg proteins) were purchased from sigma chemical company (Evry, France). Cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 was from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA), *Listeria innocua* LMG 11387, *Escherichia coli* JM 109, *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Staphylococcus aureus* CIP 4.83, *E. coli* CIP 54127, *L. monocytogenes* ATCC 3512 (CM/NCTC, UK). Acetonitrile was of HPLC grade. Water was obtained from a Millipore MilliQ system; the resistance was about 18 MV. Common chemicals and solvents of analytical grade were obtained from different commercial sources.

### II.2. Digestion of Caseins with Pepsin

Aqueous solution of Bovine casein 5% (w/v) was adjusted to pH 2.5 with 1 M HCl and digested with 1% (w/w of substrate) pig pepsin (EC 3.4.23.1) for 30 min at

37°C. The reaction was terminated by adjusting pH to 7.0 by addition of 1M NaOH and heating at 80 °C for 15 min.

### II.3. Determination of the Degrees of Casein Hydrolysis

The degree of hydrolysis (DH) is defined as the ratio of the number of peptide bonds cleaved to the total number of peptide bonds of protein substrate. DH is determined by the OPA (o-phthaldialdehyde) method using leucine as standard [23], [24].

A fresh OPA solution was prepared extemporaneously with 25 ml of 100 mM sodium tetrahydroborate, 2.5 ml of 20% SDS solution (w/v), 40 mg of OPA (dissolved in 1 ml of methanol) and 100 mL of  $\beta$ -mercaptoethanol were adjusted to a final volume of 50 ml with distilled water. To assay proteolysis with milk proteins as substrates, an aliquot (usually 10–50 ml containing 5–100 mg proteins) was added to 1.0 ml of OPA reagent in a 1.5 ml quartz cuvette.

The solutions were mixed briefly and incubated for 2 min at room temperature, and then the absorbance at 340 nm was measured.

### II.4. Purification of Antibacterial Peptides

#### II.4.1. Separation of Antimicrobial Peptides from the Peptic Casein Hydrolysate by Precipitation Under Ionic Strength and pH Effect

A quantity of NaCl is added to a fixed volume of hydrolyzate, adjusted to pH 7.5, for a final concentration of 2.0 M of salt. The hydrolyzate was stirred for 30 min at room temperature before being centrifuged at 10,000  $\times$  g for 10 min at 4°C.

The pellet was washed twice by centrifugation with phosphate buffer (5 mM, pH 7.5) to remove soluble proteins, then resuspended in phosphate buffer (5 mM, pH 7.5, 100 mM NaCl) to 20 times the original hydrolyzate volume. The pH is adjusted between 1.5 to 2.

After one hour stirring at 7°C, the pellet was centrifuged (10,000  $\times$  g, 10 min), and the supernatant is recovered. The peptides concentration is determined using the OPA O-Phthaldialdehyde methods [18] and the solution was stored at -20°C until performing the antibacterial assay and analysis by Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC).

#### II.4.2. Analytical and Preparative HPLC

Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was performed with an automated HPLC system consisted of a Waters 600E automated gradient controller pump module, a Waters Wisp 717 automatic sampling device and a Waters 996 photodiode array detector. Spectral and chromatographic data were stored on a NEC image 466 computer. Millennium software was used to plot, acquire and analyze chromatographic data. An analytical XBridge



$C_{18}$  column, (5 $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm) and preparative XBridge  $C_{18}$  column, (5 $\mu$ m, 10  $\times$  250 mm) (Waters, Ireland) were used with a flow rate of 1ml/min and 4ml/min respectively. Gradient elution was carried out with a mixture of solvent A (0.1 %, trifluoroacetic acid (TFA), v/v) in deionized water and solvent B (0.1% TFA in acetonitrile, v/v). Proteins and peptides were eluted as follows: 0-80 min, 40% B; 80-85min, 40- 100% B; 85-90 min, 100% B; 90-100 min, 100-0% B and the HPLC system was equilibrated for 10 min with 100% A.

Elution was performed at room temperature. Samples were filtered through 0.2  $\mu$ m filters. On-line UV absorbance scans were performed between 200 and 300 nm at a rate of one spectrum per second with a resolution of 1.2 nm. Chromatographic analyses were completed with Millennium software.

### II.5. Peptide Analysis by On-Line LC-ESI-MS

Analysis were performed on a Accela UHPLC system acquired from Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) that consisted in an autosampler with a column oven and a tray compartment cooler and a quaternary pump with a built-in solvent degasser : all piloted by Xcalibur software.

The Accela UHPLC system was coupled to an Orbitrap mass spectrometry system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped to ESI ion source. HPLC analyses were performed with an analytical  $C_{18}$  column (Xbridge, 5 $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm). HPLC gradient is the same previously described (section II.4.2). A split was applied to divide the flow at 300  $\mu$ L/min. ESI inlet conditions were : Nitrogen used both as a sheath and auxiliary at arbitrary flow of 20 and 10 respectively. Capillary temperature was set at 275°C. In the positive mode, capillary voltage was set to 93.4 V, source voltage to 3.3 kV and the source current 0 to 8 $\mu$ A. Spectra were recorded over the masse/charge (m/z) range 400 to 2000.

### II.6. Peptides Identification by Mass Spectrometry

Data were acquired using an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam™ laser. Direct profiling data were performed in positive reflectron mode, for a mass range from m/z 500 to 6000 or from m/z 3000 to 20000. A total of 1000 spectra were acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz.

FlexImaging™ 2.1 software was used to record the data. Standards for spectral calibration consisted in a mixed solution of peptides ranging between m/z 900 to 3500 or a mixed solution of protein ranging between m/z 3000-9000.

Two matrices were used (UV absorber) : the first consisted of a solution of 10 mg/ml cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in a mixture of water and acetonitrile (30/70 ; v/v) with 0.1% TFA, and the second corresponded to sinapinic acid (SA) solution 10 mg/ml prepared in a mixture 25/75 (v/v) of water and acetonitrile

with 0.1% TFA.

Deposition of the sample on the target can be achieved by the method of the thin layer : 1  $\mu$ l of matrix and 1  $\mu$ l of each HPLC fraction were deposited. The samples were dried before being analyzed. 1000 laser shots at each target have generally been accumulated to produce the final mass spectrum. Processing software of the spectra has allowed for each peak detected and determined the corresponding masses in positive mode. The accuracy in the mass is 0.01%.

## II.7. Assays for Antibacterial Activity

### II.7.1. Agar Diffusion Method

Antibacterial activities of the different peptides were determined by a plate diffusion assay. *L. innocua*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* JM 109 grown in Brain Heart Broth were used as the indicator organism. 20 $\mu$ l of sample were applied to Müller-Hinton agar (containing 5g glucose per litre) seeded with strain (approximately  $1 \times 10^6$  CFU/ml). The plates were incubated at 37°C for 18-20 h and examined for zones of growth inhibition on the resultant bacterial lawn.

### II.7.2. Minimum Inhibitory Concentration Determination of Antibacterial Peptides

The Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were performed in sterile 96-well microplates (Costar 3799, Corning Incorporated, United Kingdom). In each well containing 190 $\mu$ l of Müller-Hinton medium were added 50  $\mu$ l of peptide and 10  $\mu$ l of the strain tested prediluted in Muller-Hinton medium for a final bacterial load at  $2-8 \times 10^4$  CFU/ml. The absence of bacterial growth is revealed by measuring absorbance at 630 nm on a microplate reader (MRX II, Dynex Technologies, microcicer company) after 18 h of incubation at 37°C. Peptides were tested in triplicate. Absorbance of wells at concentrations corresponding decays of the peptide is compared to that of the wells of a negative control consisting of Muller-Hinton medium and a control culture.

The MIC was defined as the lowest concentration of peptide that resulted in no increase of absorbance at 630 nm after incubation at 37°C for 18 h without shaking.

## III. Results

### III.1. Peptic Hydrolysis of Bovine Casein

Bovine casein was hydrolysed by pepsin at pH 2.5 (37°C) and kinetics studies were followed at 2.5, 5, 10, 15, 30, 45 min and from one to six hours of hydrolysis taking a sample each hour and finally a last sampling at 24h. The resulting hydrolysates were analyzed in one step by reversed phase HPLC on a  $C_{18}$ -column according to a method described in section (II.4.2).

Fig. 1 shows the chromatograms of peptic hydrolysates of bovine casein according to the degree of hydro-

lysis. Examination of the profiles obtained indicates the occurrence, in the initial stage of hydrolysis, of several large fragments, with elution times close to those of the substrate. As the evolution of the hydrolysis, the rate of the initial components decreases in favor of those of smaller peptides, which appear in small amounts to the top of the chromatograms and continued to increase during the hydrolysis. This change occurs while a part of the substrate remains intact. This suggests that pepsin acts on casein as a mechanism namely one by one which characterizing enzymatic reactions when the reaction mixture was composed of intact substrate and final product of small size. This means that the protease cleaves one molecule of protein substrate at a time. However, the appearance also of intermediate peptides of the beginning of hydrolysis, characteristic of the zipper mechanism indicates that the action of pepsin on casein follows an intermediate mechanism between the two described [25].

### III.2. Fractionation of ACTIF Peptic Hydrolysate

Several studies indicate the possibility of generating antimicrobial peptides by pepsin hydrolysis of bovine casein [13]-[15]. Antimicrobial activity was investigated on all hydrolysates taken at different intervals of hydrolysis. Hydrolysates were tested against *L. innocua* LMG 11387, *B. subtilis* ATCC 6633 and *E. coli* JM109 which were used as the test strain. A clear zone of growth inhibition was observed starting from 15 min of hydrolysis (Table I). Thus, to be able to isolate a active peptides and there precursors, analysis was carried out on sample from 30 min of hydrolysis which showed activity against all tested strain. This hydrolysate is fractionated using preparative RP-HPLC and the resulting fractions were collected at 1 min intervals.

Hydrolysats	Test strain		
	<i>L. innocua</i> LMG 11387	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>E. coli</i> JM109
T0	-	-	-
2.5 min	-	-	-
5 min	-	-	-
10 min	-	-	-
15 min	+	-	+
30 min	+	+	+
45 min	+	+	+
1 h	+	+	+
2 h	+	+	+
3 h	+	+	+
4 h	+	-	+
5 h	+	-	+
6 h	+	-	+
24 h	+	-	+

Assessment of each fraction, for antibacterial activity, identified the fractions with retention times of 61, 66, and 69 min as having inhibitory activity against *L. innocua* (Fig. 2(a)).

### III.3. Separation of Antimicrobial Peptides from the Peptic Casein Hydrolysate by Precipitation Under Ionic Strength and pH Effect

The total hydrolysate contains, beside the active peptides, a large number of peptides without antimicrobial activity. Thus, in order to separate the active peptides from this heterogeneous hydrolysate, we tried to separate them by precipitation under the ionic strength by adding salt (NaCl) and maintaining the pH of the hydrolysate in neutral zone. However, under these conditions different inactive peptides are also precipitated.

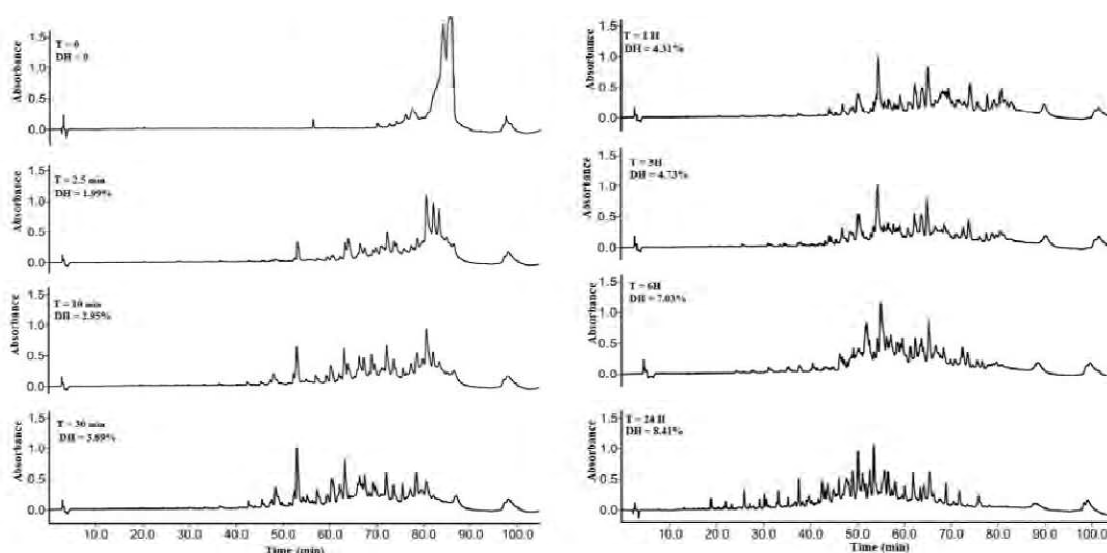


Fig. 1. Reverse-phase HPLC profiles of bovine casein hydrolysates obtained at different times of hydrolysis

Therefore another step of solubilization at low pH was required to separate the active peptides. The latter are recovered after 1 h of stirring at 4°C by centrifugation at  $10,000 \times g$ . The peptide extract thus obtained showed antimicrobial activity against *L. innocua* indicating the presence of active peptides. The chromatographic profile of the peptide extract obtained is shown in Fig. 2(b).

Several fractions separated have a retention time similar to those of the active fractions collected from the total hydrolysate as described in the previous section (fig. 2(a))

However, to identify the peptides present in this solution and responsible for the antimicrobial activity, all fractions (numbered 1 to 18 of the chromatogram, Fig. 2(b)) were collected by RP-HPLC on a preparative C18 under the conditions indicated in section II.4.2. The antimicrobial activity of collected fractions was determined primarily on *L. innocua*. Thereafter other strains were tested on fractions that showed clear inhibition zones toward *L. innocua*. The results obtained are presented in Table II.

#### III.4. Identification of Antibacterial Peptides

The peptide fractions collected from the active extract were analyzed by LC/MS and MALDI-TOF under the conditions indicated above (section II.5 and II.6). By the use of online proteomics programs, it was possible to determine the peptide sequences corresponding to the masses obtained. This analysis was conducted at the ExPasy website (ExPASy; SIB bioinformatics resource portal, <http://us.expasy.org/tools/>). The research was conducted on the actives fractions of bovine caseins by specifying the conditions of hydrolysis (pH > 2.5), the type of protease used (porcine pepsin A) and that the masses are treated as mono-isotopic.

In addition, the sequences determined were compared to those generated by hydrolysis of bovine casein reported in different studies.

The results obtained are given in Table III. The peptides identified corresponded mainly of fragments generated from the hydrolysis of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein and  $\alpha_{s1}$ -casein. Fraction 4 contains two major component of molecular mass of 2012 and 2348 Da (Fig. 3(a)). The first corresponds to antibacterial peptide  $\alpha_{s2}$ -CN f(164-179) reported by Recio and Visser (1999)[13].

The second corresponded to amino acid residues  $\alpha_{s2}$ -CN f(148-166). Antimicrobial activity of fraction 10 is due to the presence of two peptides of mass 3459 and 3115 Da corresponded, respectively, to amino acid residues f(180-207) and f(183-207) of bovine  $\alpha_{s2}$ -casein (Fig. 3(b)). The fraction 13 includes four majority fragments with mass of 5430, 4921, 4463.5 and 4080.8 Da correspond, respectively, to peptides f(131-174, 153-196, 99-137) of the  $\alpha_{s2}$ -casein and peptide f(20-55) of  $\alpha_{s1}$ -casein (Fig. 3(c)).

The antimicrobial activity of these peptides has not been previously reported. Three majority fragments are included in the fraction 14, those with a mass equal to 5470 and 3793 correspond to peptides  $\alpha_{s1}$ -CN f(141-147) and  $\alpha_{s1}$ -CN f(161-195) while that identified to have a molecular mass of 3957 Da correspond to  $\alpha_{s2}$ -CN f(176-207) (Fig. 3(d)). Mass analysis by MALDI-TOF indicates that the fraction 15 is pure and contains a single peptide with a molecular mass of 5254 Da (Fig. 3(e)). The purity of this fraction is confirmed by analysis on LC-MS (Fig. 4).

This peptide is identified as  $\alpha_{s2}$ -CN f(164-207). Fraction 17 is characterized by the presence of peptide with high molecular weight. Fragments of mass equal to 7562, 7415, 7185, 5714 Da were identified as peptides f(99-163/100-164), f(99-162), f(28-90), f(138-184) of  $\alpha_{s2}$ -casein (Fig. 3(f)), respectively. The peptide of mass equal to 6714 correspond to fragments f(9-68) of  $\alpha_{s1}$ -casein. This fraction showed antimicrobial activity toward the Gram-positive and Gram-negative bacteria tested (Table II).

#### III.5. MIC Determination and Bacteriostatic or Bactericidal Effect of Antibacterial Peptide

Enough material of the most abundant peptide  $\alpha_{s2}$ -CN f(164-207) on peptide extract was collected from the preparative HPLC system to determine the MIC against various microorganisms.

In addition, the peptide extract was also assessed for its MIC.

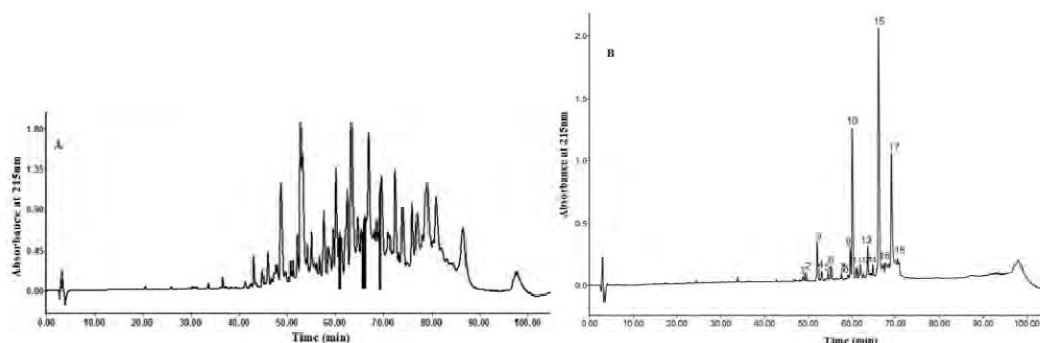
The purified peptide was tested at an initial concentration of 0.624 mg/ml while the peptide extract was tested at an initial concentration of 1.929 mg/ml. Both sample showed activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

TABLE II  
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PEPTIDE FRACTIONS COLLECTED FROM THE PEPTIDE EXTRACT

Fraction <sup>a</sup>	Diameters inhibition (mm)			
	<i>L. innocua</i> LMG1138	<i>E. coli</i> JM109	<i>S. aureus</i> CIP 4,83	<i>B. subtilis</i> ATCC6633
Fraction 4	5	—	—	—
Fraction 10	5	5	—	—
Fraction 13	8	8	—	7
Fraction 14	10	8	—	7
Fraction 15	11	11	8	11
Fraction 17	11	11	8	11

Note: — indicates absence of inhibition zone

<sup>a</sup>Refer to the RP-HPLC in Fig. 2(b)



Figs 2 Reverse-phase HPLC profile of bovine casein hydrolysate for 30 min of peptic hydrolysis, fractions which exhibited antibacterial activity are black filled (a). Reverse-phase HPLC profile of peptide extract prepared by precipitation from casein hydrolysate with 2M of NaCl and at pH 7.5 (b).

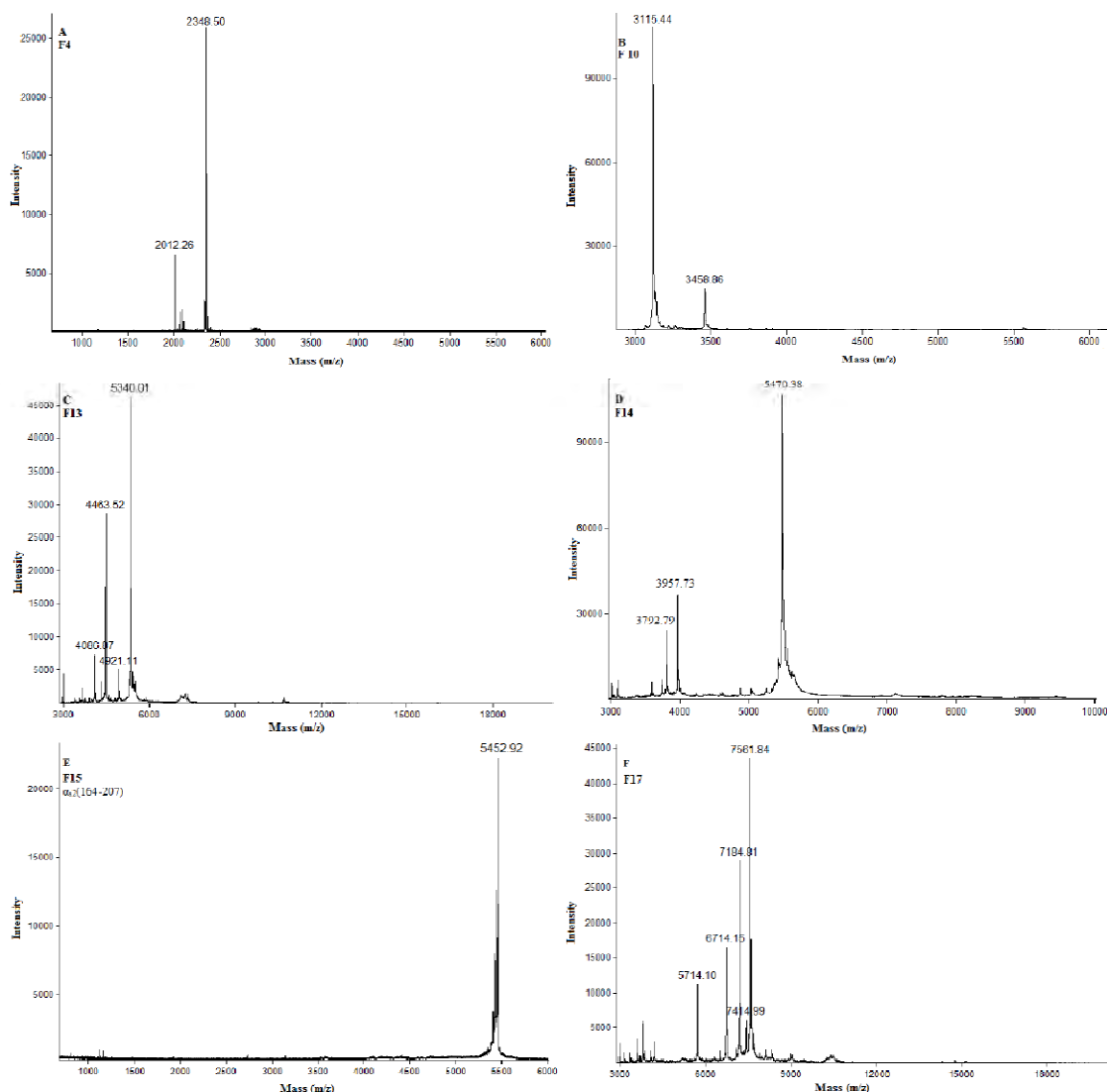
TABLE III  
MOLECULAR MASS, PRIMARY STRUCTURE OF PEPTIDES RELEASED FROM BOVINE CASEIN HYDROLYSATE WITH PEPSIN CONTAINED IN ACTIVE FRACTION

Fraction <sup>a</sup>	Weight (Da)	Sequence position <sup>b</sup>	Amino acid sequence
4	2012.20	$\alpha_{22}$ 164-179	LNFLKKISQRYQK FALPQY
	2348.58	$\alpha_{22}$ 148-166	TKKTKLTEEEKNRLNFKK
10	3458.86	$\alpha_{22}$ 180-207	LKTVYQH QKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	3115.44	$\alpha_{22}$ 183-207	VYQH QKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
13	5340.01	$\alpha_{22}$ 131-174	SEENSKKTVDMESTE VFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQKF
	4921.11	$\alpha_{21}$ 153-196	FYQI.DAVPSGAWVYVPI.GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTM
	4463.52	$\alpha_{22}$ 99-137	LYQGPIVLPWDQVKRNAVPIPTLNREQLSTSEENSKK
	4086.87	$\alpha_{22}$ 62-95	AEVATEEVKITVDDKHYQKALNEINQFYQKFPQYL
14	5470.38	$\alpha_{21}$ 141-187	LLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAME
	3957.73	$\alpha_{22}$ 176-207	LRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMESFSDIPNPIG
	3792.79	$\alpha_{21}$ 161-195	LPQYLKTVYQIQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	5452.92	$\alpha_{22}$ 164-207	SKDIGSESTEDQAMESFSDIPNPIGSENSEKTT
15	5452.92	$\alpha_{22}$ 164-207	LKKISQRYQK FALPQYLKTVYQH QKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL
	7561.84	$\alpha_{22}$ 99-163	L/YQGPIVLPWDQVKRNAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKK
17		$\alpha_{22}$ 100-164	KLTEEEKNRLN/L
	7414.99	$\alpha_{22}$ 99-162	QVKRNAVPIPTLNREQLSTSEENSKKTVDMESTE VFTKTKLTEEEKNRLN
	7184.81	$\alpha_{22}$ 28-90	INPSKENLCSFTCKEVVRNANEELYSIGSSSESAEVATEEVKITVDDKIYQK
		$\alpha_{21}$ 9-72	ALNEINQFY
		$\alpha_{21}$ 9-72	QGLPQEVLNENLLRFFVAPFPEVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAE
		$\alpha_{21}$ 9-68	SISSEEEIV
	6714.15	$\alpha_{21}$ 9-68	SSEESIISQET YKQEKMAINPSKENLCSFTCKEVVRNANEELYSIGSSSESAEVA
		$\alpha_{22}$ 138-184	TEE
	5714.10	$\alpha_{21}$ 26-77	TVDMESTE VFTKTKLTEEEKNRLNFKKISQRYQK FALPQYLKTVY
		$\alpha_{21}$ 26-77	MAINPSKENLCSFTCKEVVRNANEELYSIGSSSESAEVATEEVKITVDDKH

Note: <sup>a</sup> Refer to the RP-HPLC in Fig. 2(b)  
<sup>b</sup> Corresponding site in bovine  $\alpha$ s-casein sequence

However, The MIC of  $\alpha_{22}$ -CN f(164-207) and peptide extract against the Gram-positive bacteria, *L. innocua* LMG1138, *L. monocytogenes* ATCC 3512 and *B. subtilis* ATCC 6633 was considerably lower than the MIC against the Gram-negative bacteria, *E. coli* JM109, *E. coli* CIP 54127 and *E. coli* DH5 $\alpha$  (Table IV). Nevertheless, the peptides tested seems not very active against *S. aureus* CIP 4.83 (MIC > 624.2  $\mu$ g/ml for  $\alpha_{22}$ -CN f(164-207) and MIC >1929  $\mu$ g/ml for peptide extract). Although when the peptides were tested on these bacteria by a plate diffusion assay, zones of inhibition were observed, however, with the presence of some colonies. Thus, rates of peptides higher than those used on these bacteria must be tested to determine their MIC. In order to determine whether the MIC correspond to the Minimal Bactericidal Concentration (CMB) the wells corresponding to the MIC were used to determine if the peptide has bactericidal or bacteriostatic characteristics properties. For that, each well containing

the MIC is used to count the survival cells. The cells concentration obtained without addition of peptides are also enumerated to determine the percentage of cell death. After incubation at 37°C for 18 h, we counted the number of CFU (Colony Forming Units) per Petri dish, taking care to count plates containing 30–300 colonies (Table V). The bactericidal effect can be attributed to a molecule when the latter induces a higher percentage of cell death or equal to 99.99% when it use at a concentration near to its MIC (MBC/MIC ratio near 1). As shown in Table V, cell death measured for these peptides do not reach 99.99%, so the peptides are not bactericidal but bacteriostatic when used at a concentration corresponding to the MIC. Nevertheless it is necessary to note that although these peptides show a high MIC toward gram negative bacteria, they exhibit, against a higher mortality rate compared with that observed on Gram-positive bacteria.



Figs. 3. Mass spectra of fractions 4,10,13,14,15 and 17, obtained by MALDI-TOF

TABLE IV  
MIC VALUES OF THE ANTIBACTERIAL PEPTIDES. THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF THE PEPTIDE WAS DETERMINED IN A MICROITER PLATE ASSAY SYSTEM AFTER 18 H INCUBATION AT 37°C

	Minimum inhibitory concentration (MIC)							
	Peptide extract		$\alpha_1$ -CN f(164-207)		Tétracycline		Nisine	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{M}$
Gram-positive bacteria								
<i>L. innocua</i> LMG1138	30.14	NA	9.754	1.788	0.25	0.000520	31,25	8.928
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	60.28	NA	19.50	3.577	0.50	0.001040	15,625	4.462
<i>L. monocytogenes</i> ATCC3512	60.28	NA	—	—	—	—	62,5	17.857
<i>S. aureus</i> CIP4.83	>1929	NA	>624.2	> 114.49	0.488	0.001015	15,625	4.464
Gram-negative bacteria								
<i>E. coli</i> JM109	241.12	NA	78.02	14.311	15.62	0.032481	—	—
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	964.50	NA	312.10	57.245	3.90	0.008110	—	—
<i>E. coli</i> CIP 54127	482.25	NA	—	—	—	—	—	—

Note : NA indicates not applicable as sample contains multiple peptides;  
— indicates not tested.

TABLE V  
CELL DEATH CAUSED BY PEPTIDES WHEN USED AT  
A CONCENTRATION CORRESPONDING TO  
THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION

	Mortality evaluation (%)	
	Peptide extract	$\alpha_2$ -CN f(164-207)
Gram-positive bacteria		
<i>L. innocua</i> LMG1138	99.87	99.97
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	99.97	99.98
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> JM109	99.99	99.99
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	99.99	99.92

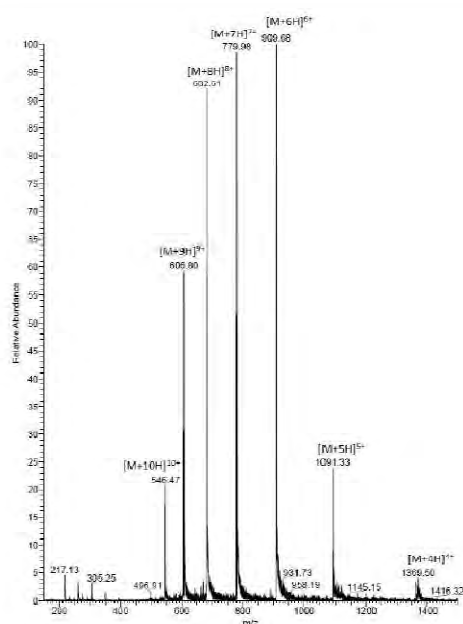


Fig. 4. Mass spectra of peptide  $\alpha_2$ -CN f(164-207) analysed par ESI/MS

#### IV. Discussion

McCann et al. [14] reported that centrifugation at pH 3.0 of the chymosin digest of sodium caseinate removed the insoluble protein and peptide material without affecting the antibacterial activity, indicating that antibacterial peptides were soluble at pH 3.0. However, when adjusting the pH to 7.0 of such treated hydrolysate, we observed the formation of a turbid. Thus, using base to increase pH of the pepsin digest create salts in the solution causing peptides to precipitate out of solution. Thus we chose to study the effect of ionic strength and pH on the separation of active peptides. The treatment of peptic hydrolysate as described in Section II.4.1., made it possible to separate several antimicrobial peptides. Among the fragments identified some are already reported by previous works [15], [16], [24]. The latter revealed the release of several active peptides from the C-terminal regions of the  $\alpha_2$ -casein such as the peptide f(164-179, 181-207, 180-207, 175-207, 172-207, 183-207, 164-207)

[13]-[15]. However, the peptide extract obtained in this work is characterized therein by the presence of the peptide  $\alpha_2$ -CN f(183-207) and peptide  $\alpha_2$ -CN f(164-207).

The latter, present in considerable quantities in the peptide extract, showed a broad spectrum of activity by acting on both gram-positive and gram-negative bacteria. Indeed, McCann et al [14] have already indicated that this fragment was the most active compared to other peptides separated in the same region of the  $\alpha_2$ -casein. In addition, we identified new active fragments, from different regions of two casein fractions. This is the case of peptides included in fractions 13 and 17 such as peptides f(99-163/100-164), f(99-162), f(99-137), f(131-174), f(153-196) of  $\alpha_2$ -casein. However, some antimicrobial peptides already defered are included in the sequence of these fragments or share common segments. This is the case of f(150-188)  $\alpha_2$ -casein peptide identified by Zucht et al. (1996) [12] allows us to suggest that some of these identified fragments are precursors of active peptides.

#### V. Conclusion

Although antimicrobial peptides issue from bovine caseins showed a broad spectrum of action, their use, in particularly in food industry, remains limited at the stage of research. There is no much works treating the study of antibacterial activity of peptides in the food medium.

Added to skimmed milk and to the carrot juice, the peptides resulting from  $\alpha_2$ -casein hydrolysis have showed substantial loss of activity.

The latter seems to be influenced by the presence of metals cations [26]. So, studies on the factors influencing the activity of these peptides and appropriate methods for efficient applications are necessary. However, this requires sufficient availability of these peptides and this was the aim of our work. Effectively, it was possible to obtain a peptide extract from casein hydrolysate containing several active antimicrobial peptides some of which are already reported by previous work and new peptides from  $\alpha_2$ -casein specially. These latter must be separated and purified to be characterized.

#### References

- [1] D.D. Kitts, and K. Weiler, Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Current Pharmaceutical Design* 2003, 9, 1309-1323
- [2] A. Pellegrini, Antimicrobial Peptides from Food Proteins. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9:1225-1238.
- [3] D.A. Clare, G.L. Catignani and H.E. Swaisgood Biodefense Properties of Milk : The Role of Antimicrobial Proteins and Peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 2003, 9, 1239-1255.
- [4] I. Lopez-Exposito, I. Recio. Antibacterial activity of peptides and folding variants from milk proteins. *International Dairy Journal* 2006; 16: 1294-1305.
- [5] R. Froidevaux, F. Krier, N. Nedjar-Arroume, D. Vercaigne-Marko, E. Kosciarza, C. Rue kebusch, P. Dhulster, D. Guillochon, Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *FEBS Letters* 2001;49:1159-163.
- [6] N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, K. Miloudi, R. Daoud, F. Krier, M. Kouach, G. Briand, D. Guillochon, Isolation and

- characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 2006;27:2082–2086.
- [7] N. Nedjar-Arroume, V. Dubois-Delval, E.Y. Adje, T. Krier, P. Mary, M. Kouach, G. Briand, D. Guillochon, Bovine hemoglobin; an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 2008;29:969–77.
- [8] H.R. Ibrahim, E. Iwamori, Y. Sugimoto, T. Aoki, Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochim Biophys Acta* 1998;1401:269–303.
- [9] H. R. Ibrahim, U. Thomas and A. Pellegrini A, helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J. Biol. Chem.* 2001; 1276:43767–43774.
- [10] E. Lahov, D. Edelstein, M.T. Sode-Mogensen and E. Sofer, Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*. 1971;26:489–495.
- [11] R. D. Hill, E. Lahov and D. Givol, A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research* 1974;41: 147–153.
- [12] H.D. Zucht, M. Raida, K. Adermann, H.J. Magert and W. G. Forssmann, Casocidin-I : A casein- $\alpha_{2}$  derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 1995;372:185–188.
- [13] I. Recio, S.Visser, Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha_{2}$ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta*.1999; 1428: 314–326.
- [14] K.B. McCann, B.J. Shiell, W.P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski, M.J. Coventry, Isolation and characterisation of antibacterial peptides derived from the R(164–207) region of bovine  $\alpha_{2}$ -casein. *International Dairy Journal* 2005; 15:133–143.
- [15] K.B. McCann, B.J. Shiell, W.P. Michalski, A. Lee, J. Wan, H. Roginski, M.J. Coventry, Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha_{31}$ -casein. *International Dairy Journal* 2006 ;16:316–323.
- [16] M. Malkoski, S.G. Dasiper, N.M. O'Brien-Simpson, G.H. Talbo, M. Marcis, K.J. Cross and E.C.Reynolds, Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45: 2309–2315.
- [17] C.Liepkc, H.D. Zucht, W.G. Forssman, and L. Ständker, Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *Journal of Chromatography B* 2001; 752:369–377.
- [18] F. Minervini, F. Algaron, C.G. Rizzello, P.F. Fox, V. Monnet and M.Gobetti, Angiotensin I-Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinasehydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69:297–3305.
- [19] A. Pellegrini, U. Thomas, N. Bramaz, P. Hunziker, and R. von Fellenberg, Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\alpha$ -lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1426:439–448.
- [20] A. Pellegrini, C. Dettling, U. Thomas and P. Hunziker, Isolation and characterization of four bactericidal domains in the  $\beta$ -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1526:131–140.
- [21] W. Bellamy, M. Takase, K. Yamauchi, H. Wakabayashi, K. Kawase, and M. Tomita, Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992; 1121: 130–136.
- [22] I. Recio, and S.Visser, Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin. In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A* 1999;831:191–201.
- [23] P.M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann, Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001; 66:642-646.
- [24] F.C. Church, H.E. Swaisgood, D.H. Porter, and G.L. Catignani, Spectrophotometric assay using O-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 1983;66: 1219-1227.
- [25] J. Sridvidhya, and S. Schnell, Why substrate depletion has apparent first-order kinetics in enzymatic digestion. *Computational Biology and Chemistry* 2006;30 :209-214.
- [26] P. Chantaysakorn, and R.L. Richter, Antimicrobial properties of pepsin-digested lactoferrin added to carrot juice and filtrates of carrot juice. *Journal of Food Protection*, 2000; 63:376–380.

## Authors' information

<sup>1</sup>Ph.D student at Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire (LNITA), Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 25000 Constantine, Algérie.  
E-mail: [faiza\\_adoui@yahoo.fr](mailto:faiza_adoui@yahoo.fr)

<sup>2</sup>Ph.D student at Laboratoire de Bio-ressources Naturelles, Université hassiba Benbouali de Chlef, BP 151, Hay Salem 02000, Chlef, Algérie.

<sup>3</sup>Ph.D at Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>4</sup>HDR at Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>5</sup>Ph.D student at Laboratoire de Bio-ressources Naturelles, Université hassiba Benbouali de Chlef, BP 151, Hay Salem 02000, Chlef, Algérie.

<sup>6</sup>Professor at Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

<sup>7</sup>Professor at Laboratoire de Nutrition et de Technologie Alimentaire (LNITA), Institut de la Nutrition de l'Alimentation et des Technologies Agro-alimentaires (I.N.A.T.A.A.), 25000 Constantine, Algérie.

<sup>8</sup>Professor at Laboratoire ProBioGEM, Université Lille Nord de France, Polytech Lille, Av. Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.