

## Table des matières

Liste des abréviations .....	i
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux .....	vi
<b>Introduction .....</b>	<b>01</b>
<b>1. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>03</b>
1.1. Caséines du lait.....	03
1.1.1. Constitution de la caséine totale.....	03
1.1.1.1. La caséine $\alpha_{S1}$ .....	03
1.1.1.2. La caséine $\alpha_{S2}$ .....	03
1.1.1.3. La caséine $\beta$ .....	04
1.1.1.4. La caséine $\kappa$ .....	04
1.1.2. Propriétés Générales Des Caséines.....	04
1.1.2.1. Polymorphisme génétique .....	05
1.1.2.2. Composition en acides aminés.....	05
1.1.2.3. Phosphorylation.....	06
1.2. La Micelle De Caséine.....	06
1.2.1. Composition et propriétés.....	06
1.2.2 Structure.....	07
1.2.2.1. Modèle avec sous-unités.....	07
1.2.2.2. Modèle à dualité des liens.....	08
1.2.3. Caractéristiques physicochimiques de la micelle de caséine.....	09
1.2.3.1. Diamètre micellaire.....	09
1.2.3.2. Hydratation .....	09
1.2.3.3. Minéraux... ..	09
1.3. la stabilité des micelles de caséines .....	10
1.4. Généralités sur les bactéries lactiques .....	11
1.4.1. Caractéristiques générales des bactéries lactiques .....	12
1.4.2. Habitat .....	12
1.5. Classification et taxonomie.....	13
1.5.1. Le genre <i>Lactobacillus</i> .....	13
1.5.2. Le genre <i>Lactococcus</i> .....	14

1.6. Intérêt des bactéries lactiques .....	15
1.6.1. Dans l'industrie alimentaire .....	15
1.6.2. Dans le domaine thérapeutique .....	15
1.6.3. Rôles technologiques des bactéries lactiques .....	16
1.7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques .....	17
1.7.1. Exigences en acides aminés .....	17
1.7.2. Exigences en vitamines .....	17
1.7.3. Exigences en bases azotées .....	18
1.7.4. Exigences en glucides .....	18
1.7.5. Exigences en sels minéraux.....	19
1.8. La protéolyse chez les bactéries lactiques.....	19
1.8.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques ans le lait.....	19
1.8.2. Le système protéolytique des bactéries lactiques.....	21
1.8.2.1.Les protéases de paroi.....	22
1.8.2.1.1. Les propriétés biochimiques et génétiques.....	23
1.8.2.1.2. Classification des protéases de paroi.....	25
1.8.2.1.3. Intérêt technologique des protéases de paroi .....	26
1.8.2.2. Les protéases intracellulaires.....	26
1.8.2.3. Les systèmes de transport des acides aminés et des peptides chez les bactéries lactiques.....	27
1.8.2.3.1. Les systèmes de transport des acides aminés.....	27
1.8.2.3.2. Les systèmes de transport des di/tripeptides.....	28
1.8.2.3.3. Les systèmes de transport des oligopeptides.....	29
1.8.2.4. Les peptidases.....	29
1.8.2.4.1. Classification et propriétés des peptidases.....	30
1.8.2.4.2. Intérêt technologique des peptidases .....	31
1.8.3. La régulation du système protéolytique.....	31
1.9. Intérêt de l'activité protéolytique des bactéries lactiques .....	33
1.10. Peptides générés par la caséinolyse et leurs activités biologiques.....	34
1.10.1.Peptides à activité antihypertensive.....	35
1.10.2. Peptides à activité antithrombotique .....	36
1.10.3. Peptides à activité antimicrobienne .....	36
1.10.4. Peptides à activité antioxydante.....	37
1.10.5. Peptides à activité antidiabétique.....	38

1.10.6. Peptides à activité opiacée .....	39
1.11. Méthodes d'obtention de peptides bioactifs .....	40
1.12. Fractionnement, purification et identification des peptides bioactifs .....	41
1.13. Applications commerciales des peptides bioactifs .....	42
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	46
2.1. Souches bactérienne utilisées.....	46
2.2. Milieux de culture.....	46
2.3. Conditions de culture.....	46
2.4. Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe des bactéries Lactiques.....	47
2.5. Conservation des souches pures .....	47
2.6. préparation des caséinesa partir du lait cru.....	47
2.7. Confirmation de l'aptitude des bactéries à la protéolyse .....	48
2.7.1. Recherche de l'activité protéolytique en milieu solide.....	48
2.7.2. Recherche des protéases extracellulaires dans le surnageant de culture.....	48
2.7.2.1. Préparation des surnagants de culture.....	48
2.7.2.1.1. En absence de lait.....	48
2.7.2.1.2. En presence de lait .....	49
2.7.2.1.3. En présence de caséines.....	49
2.7.2.2. Extraction des protéases.....	49
2.7.2.2.1. Incubation des cellules en absence d'ions calcium.....	49
2.7.2.2.2. Incubation des cellules en présence d'un chélateur d'ions EDTA 15 mm .....	50
2.8. Techniques utilisées pour l'étude des protéases .....	50
2.8.1. Précipitation des protéases au sulfate d'ammonium.....	50
2.8.2.Dialyse.....	50
2.8.3. Dosages des protéines par la méthode de Bradford (1976).....	51
2.9. Préparation des hydrolysats de caséines.....	52
2.9.1. Par les fractions enzymatiques .....	52
2.9.2. Hydrolyse acide des caséines.....	53
2.10. Evaluation de la protéolyse par méthodes biochimiques .....	54
2.10.1. Dosage des produits de dégradation.....	54
2.10.1.1. Méthode de Folin et Ciocalteu (1927).....	54
2.10.1.2. Méthode de BCA (Bicinchoninic Acid ProteinAssay).....	55
2.10.2. Calcul du degré d'hydrolyse.....	57

2.11. Techniques d'étude des hydrolysats.....	57
2.11.1. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	57
2.11.2. Identification des séquences peptidiques des hydrolysats par Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse tandem Spectrométrie de Masse.....	59
2.12. Recherche d'activités biologiques liées aux peptides générés.....	60
2.12.1. Recherche in-vitro de l'activité inhibitrice sur l'enzyme ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine).....	60
2.12.2. Détermination in-vitro de l'activité antioxydante par le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).....	62
2.12.3. Détermination in-vitro de l'activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV).....	64
2.12.4. Recherche de l'activité antibactérienne des hydrolysats .....	65
2.13. Analyse statistique.....	66
<b>3. Résultats et discussion</b> .....	67
3.1. Vérification de la pureté des caséines totales préparées au laboratoire.....	67
3.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes.....	68
3.3. Confirmation du caractère protéolytique des souches.....	70
3.3.1. Activité protéolytique en milieu solide.....	70
3.3.2. Détection des protéases extracellulaires dans les surnageants de culture.....	72
3.3.2.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu MA.....	72
3.3.2.2. Influence des ions calcium et de l'EDTA sur les protéases liées à la paroi.....	74
3.4. Purification partielle des protéases extracellulaires par précipitation au sulfate d'ammonium .....	75
3.5. Mise en évidence et caractérisation des peptides dans les hydrolysats de caséines.....	76
3.5.1. Mise en évidence des produits d'hydrolyse des caséines par dosage au réactif de Folin-ciocalteu .....	77
3.5.2. Mise en évidence des produits d'hydrolyse des caséines par dosage au BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay).....	78
3.5.3. Caractérisation des hydrolysats par le degré d'hydrolyse DH.....	80
3.5.4. Analyse des hydrolysats par électrophorèse SDS-PAGE.....	82
3.6. Identification et caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse des caséines par Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la Spectrométrie de Masse (RP-HPLC-MS/MS).....	84
3.6.1. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de brebis.....	85

3.6.2. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine bovine.....	90
3.6.3. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de chamelle.....	94
3.7. Mise en évidence in-vitro des activités biologiques liées aux hydrolysats .....	102
3.7.1. Mise en évidence de l'inhibition de l'enzyme ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine) .....	102
3.7.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	106
3.7.3. Mise en évidence de l'inhibition de l'enzyme DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV).....	109
3.7.4. Activité antibactérienne des hydrolysats .....	111
<b>4. Conclusion et perspectives .....</b>	<b>114</b>
<b>5. Références bibliographiques .....</b>	<b>117</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>147</b>

## Liste des Abréviations

**A** : absorbance  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**Ala** : alanine  
**Arg** : arginine  
**Asp** : aspartate  
**AUC** : area under the curve  
**BS** : blanc d'échantillon  
**BSA** : Sérum Albumine Bovine  
**C** : Contrôle  
**CN** : caséine  
**CNb** : caséine de brebis  
**CNc** : caséine bovine commerciale  
**CNch** : caséine de chamelle  
**DH** : degré d'hydrolyse  
**DPP-IV** : dipeptidyl peptidase IV  
**ECA** : enzyme de conversion de l'angiotensine  
**EDTA** : éthylène diamine tétra acétate  
**Gln** : glutamine  
**Glu** : glutamate  
**Gly** : glycine  
**HPLC** : chromatographie liquide à haute performance  
**IC50** : concentration inhibitrice de 50% de l'activité.  
**Ileu** : isoleucine  
**LAB** : lactic acid bacteria  
**Lb** : *Lactobacillus*  
**Lc** : *Lactococcus*  
**LC/MS** : liquide chromatographie/ masse spectrometry  
**Leu** : leucine  
**Lys /Arg** : lysine/arginine  
**Lys** : lysine  
**Met** : méthionine  
**MS** : masse spectrometry (spectrométrie de masse)  
**ORAC** : oxygen radical absorbance capacity  
**Orn** : ornithine  
**Pro** : proline  
**RP-HPLC-MS/MS** : reversed phase-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.  
**SDS** : sodium dodécyl sulfate  
**SDS-PAGE** : sodium dodécyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis  
**Ser** : serine

**T2DM** : Diabète de type 2

**TCA** : trichloacétique acide.

**Thr** : thréonine

**Tris** : Tris (hydroxyméthyl)- aminométhane.

**Try** : trypsine.

**Val** : valine

Rapport-Gratuit.com

## Liste des figures

### Partie Synthèse bibliographique

<b>Figure 1:</b> Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot <i>et al.</i> , 2002).....	07
<b>Figure 2 :</b> Structure de la micelle selon le modèle à dualité des liens (Horne, 1998).....	08
<b>Figure 3 :</b> Les principaux équilibres salins du lait (Britten et Pouliot, 2002).....	10
<b>Figure 4 :</b> Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994).....	21
<b>Figure 5 :</b> Système protéolytique de <i>Lactococcus lactis</i> (Savijoki <i>et al.</i> , 2006).....	22
<b>Figure 6:</b> Protéases de paroi de quelques souches de bactéries lactique (Siezen, 1999).....	24
<b>Figure 7 :</b> Modèle du cycle de transport de la leucine par un transporteur dépendant de la force proton motrice (Driessen <i>et al.</i> , 1987).....	28
<b>Figure 8 :</b> Modèle présentant la régulation de l'expression de certains gènes du régulon protéolytique de <i>Lc. lactis</i> (Guédon <i>et al.</i> , 2001a et b).....	32

### Partie Matériels et méthodes

<b>Figure 9:</b> Courbe étalon établie avec la solution de BSA 1 mg/ml (méthode de Bradford)...	51
<b>Figure 10 :</b> Courbe étalon représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en tyrosine.....	54
<b>Figure 11 :</b> Courbe étalon représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en BSA (méthode de BCA).....	56
<b>Figure 12:</b> Schéma simplifié du processus d'oxydation de la fluorescéine par les radicaux Peroxydes produits par décomposition thermique d'AAPH (Ou <i>et al.</i> , 2001).....	61
<b>Figure 13:</b> Courbe d'étalonnage Trolox dans le test ORAC.....	63
<b>Figure 14 :</b> Courbe contrôle du test de l'inhibition de la DPP-IV en fonction du temps de Réaction.....	65

### Partie Résultat et discussion

<b>Figure 15:</b> Profil électrophorétique des caséines de chamelle, de brebis et caséine bovine commerciale. Séparation sur un gel polyacrylamide en conditions dénaturante....	67
<b>Figure 16:</b> Aspect des colonies des souches cultivées sur milieu MRS et M17 solides.....	69
<b>Figure 17 :</b> Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (G10x100).....	69
<b>Figure 18 :</b> Aspect des halos de protéolyse par les bactéries déposées en touche.....	70
<b>Figure 19 :</b> Activité protéolytique des trois souches bactériennes en milieux solides: MRS-lait 2% (BH14, CHTD27), M17-lait 2% (LCL) et MA 2%.....	71
<b>Figure 20 :</b> Activité protéolytique extracellulaire des souches sur milieu agar- lait 1%.....	72



<b>Figure 21 :</b> Activité protéolytique dans les surnageants de culture en présence et en absence du lait 2%.....	73
<b>Figure 22 :</b> Activité protéolytique des fractions enzymatiques après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% et dialyse.....	76
<b>Figure 23:</b> Dosage au réactif de Folin-Ciocalteu des peptides dans les hydrolysats de Caséines .....	78
<b>Figure 24:</b> Dosage des hydrolysats de caséines par la méthode de BCA.....	79
<b>Figure 25:</b> Degré d'hydrolyse (DH) des caséines.....	81
<b>Figure 26:</b> Profil électrophorétique SDS-PAGE sur un gel polyacrylamide 12% des produits de dégradation des caséines totales par les fractions enzymatiques et par la trypsine après 24 heures de réaction... ..	83
<b>Figure 27 :</b> Diagrammes ( <i>Venn's diagrams</i> ) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de brebis selon les protéases utilisées.....	99
<b>Figure 28 :</b> Diagrammes ( <i>Venn's diagrams</i> ) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de chamelle selon les protéases utilisées.....	99
<b>Figure 29 :</b> Diagrammes ( <i>Venn's diagrams</i> ) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine bovine selon les protéases utilisées.....	100
<b>Figure 30 :</b> Mise évidence de l'activité antibactérienne des hydrolysats contre la souche Indicatrice <i>E. Coli</i> .....	111

## Annexes

<b>Figure 31 :</b> Les quantités de sulfate d'ammonium requises pour atteindre les différents niveaux de saturation pour la purification des protéases extracellulaires.....	149
<b>Figure 32 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	154
<b>Figure 33 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	154
<b>Figure 34 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche <i>Lc. lactis</i> LCL.....	154
<b>Figure 35 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par la trypsine.....	154
<b>Figure 36 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	155
<b>Figure 37 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	155

<b>Figure 38 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche <i>Lc. lactis</i> LCL.....	155
<b>Figure 39 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine la trypsine.....	155
<b>Figure 40 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	156
<b>Figure 41 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	156
<b>Figure 42 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche <i>Lc. lactis</i> LCL.....	156
<b>Figure 43 :</b> Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par la trypsine.....	156

## Liste des tableaux

### Partie Synthèse bibliographique

<b>Tableau 1 :</b> Caractéristiques physico-chimiques des caséines (Brulé <i>et al.</i> , 1997).....	05
<b>Tableau 2 :</b> Contenu des caséines en acides aminés (Fox <i>et al.</i> , 2000).....	06
<b>Tableau 3 :</b> Composition moyenne de la micelle de caséine (Brulé <i>et al.</i> , 1997) .....	07
<b>Tableau 4 :</b> Peptides bioactifs libérés par certains micro-organismes et enzymes bactériennes à partir des caséines (Korhonen et Pihlanto, 2006).....	40
<b>Tableau 5 :</b> Ingrédients et produits laitiers commercialisés ayant des effets revendiqués sur santé basés sur des peptides bioactifs issus du lait (d'après Korhonen et Pihlanto, 2006) ... ..	43

### Partie Matériels et méthodes

<b>Tableau 6 :</b> Préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines totales.....	51
<b>Tableau 7 :</b> Préparation de la gamme étalon pour le dosage au Folin-Ciocalteu.....	53
<b>Tableau 8 :</b> Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines au BCA .....	55
<b>Tableau 9 :</b> Répartition des réactifs nécessaires pour le test de l'inhibition <i>in-vitro</i> de la DPP-IV.....	64

### Partie Résultat et discussion

<b>Tableau 10 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la Caséine de brebis produits par les protéases extracellulaires de <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	86
<b>Tableau 11 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la Caséine de brebis produits par les protéases s extracellulaires de <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	87
<b>Tableau 12 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de brebis produits par les protéases extracellulaires de <i>Lc. Lactis</i> LCL.....	88
<b>Tableau 13 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la Caséine de brebis produits par la trypsine.....	89
<b>Tableau 14 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la Caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	91

<b>Tableau 15 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	91
<b>Tableau 16 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de <i>Lc. lactis</i> LCL. ....	92
<b>Tableau 17 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de caséine bovine produits par la trypsine.....	93
<b>Tableau 18 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de <i>Lb. brevis</i> CHTD27.....	94
<b>Tableau 19 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de <i>Lb. plantarum</i> BH14.....	95
<b>Tableau 20 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de <i>Lc. lactis</i> LCL.....	96
<b>Tableau 21 :</b> Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par la trypsine.....	97
<b>Tableau 22 :</b> Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ECA par les hydrolysats dérivés de caséines. ....	103
<b>Tableau 23 :</b> Mesure de l'activité antioxydante des hydrolysats par le test ORAC .....	106
<b>Tableau 24 :</b> Concentration inhibitrice induisant 50% d'inhibition (IC <sub>50</sub> ) pour la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV).....	109

# *Introduction*

De nombreuses études récentes ont lié la prédominance des maladies cardiovasculaires, de l'obésité, de l'hypertension, du diabète et même du cancer à des facteurs alimentaires. Ainsi, des aliments qui fournissent non seulement tous les nutriments nécessaires au corps humain et qui possèdent une bioactivité contre ces maladies pourraient offrir une nouvelle alternative pour les prévenir. Un aliment fonctionnel est un aliment qui, en plus des fonctions nutritionnelles de base, procure des avantages supplémentaires à la santé, en régulant une ou plusieurs fonctions dans le corps (**Hernández-Ledesma et al., 2011**). Pour cela, les progrès technologiques récents ont suscité un grand intérêt pour l'utilisation de peptides biologiquement actifs. Ceux-ci peuvent être définis comme des fragments spécifiques de protéines composés de 2 à 20 acides aminés exprimant une ou des activité(s) biologique(s) souhaitable(s) bénéfique(s) pour la santé humaine (**De Castro et al., 2015**). Ces activités biologiques peuvent être des effets antimicrobiens, antihypertensifs, antioxydants, anticancéreux, anti-adipogéniques, immunomodulateurs et anti-inflammatoires (**Alemán et al., 2011 ; Ahn et al., 2015**).

Les peptides possédant une bioactivité peuvent être apportés par divers aliments, principalement par le lait et les produits laitiers. Les protéines laitières constituent la source la mieux caractérisée de tels peptides (**Léonil et al., 2002**). Par exemple, les protéines du lactosérum contiennent des peptides à effet antidiabète (dont des inhibiteurs de l'enzyme dipeptidyl peptidase IV) et à effet antihypertensif (incluant des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine). De nombreuses investigations ont été entreprises sur les peptides libérés par les caséines pendant l'hydrolyse enzymatique, la fermentation microbienne et pendant la digestion gastro-intestinale.

Au cours du processus de fermentation, les bactéries lactiques hydrolysent les protéines du lait, principalement les caséines, en peptides et en acides aminés qui sont utilisés comme source d'azote nécessaire à leur croissance. La capacité de ces microorganismes à produire des enzymes protéolytiques les rend des producteurs potentiels de peptides bioactifs. Plusieurs bactéries lactiques *Lb helveticus*, *Lb delbrueckii*ssp. *bulgaricus*, *Lc lactis*ssp. *diacetylactis*, *Lc lactis*ssp. *cremoris* et *Streptococcus salivarius*ssp. *thermophilus* ont été largement rapportées dans la littérature possédant un système protéolytique efficace pour l'hydrolyse des protéines et la libération de peptides bioactifs (**Savijoki et al., 2006**). En plus de l'utilisation des microorganismes vivants, des enzymes protéolytiques isolées à partir de bactéries lactiques ont été également utilisées avec succès dans les procédés d'hydrolyse enzymatique

pour la production de peptides bioactifs. L'utilisation des protéases d'origine microbienne commercialement disponibles est un avantage, car ces enzymes sont économiques, hautement spécifiques et le rendement de produits est très élevé. Plusieurs peptides issus des caséines ont été identifiés après fermentation avec des bactéries lactiques ou après hydrolyse enzymatique par les protéases commerciales (**Chen *et al.*, 2007**). La présence naturelle de peptides bioactifs dans des produits laitiers traditionnels comme les fromages a été également mise en évidence (**Saito *et al.*, 2000 ; Rizzello *et al.*, 2005; Büetikofer *et al.*, 2007**).

Ces dernières années, les peptides bioactifs dérivés des protéines alimentaires ont été bien étudiés pour déterminer leurs utilisations potentielles et leurs effets sur les principaux systèmes du corps humain (système cardiovasculaire, immunitaire et digestif).

Le choix des enzymes protéolytiques, ou des ferments, est une étape cruciale dans la génération de peptides bioactifs, car les protéines sont hydrolysées différemment et les peptides obtenus seront différents.

La plupart des études sur les peptides bioactifs ont considéré les protéines du lait de vache comme des précurseurs de ces peptides, et très peu de travaux ont utilisé le lait de différentes espèces.

Notre objectif principal est d'utiliser des protéases issues de bactéries lactiques autochtones isolées au laboratoire pour hydrolyser les caséines de différentes sources de lait (chamelle et brebis) en comparaison aux caséines de lait de vache reconnues une source de peptides bioactifs. Puis détecter les peptides à activité biologique dans les hydrolysats obtenus et identifier leurs séquences. Dans une dernière étape, évaluer *in vitro* le potentiel des hydrolysats pour les activités biologiques antihypertensive, antioxydante, antidiabétique et antibactérienne.

# *1. Synthèse bibliographique*



## **1.1. Caséines**

Les caséines sont des protéines spécifiques du lait, elles représentent la majeure partie de ses composants azotés (plus de 80% des protéines laitières). Ce sont des complexes protéiques phosphorés à caractère acide, elles sont naturellement regroupées, formant des particules colloïdales appelées micelles de caséine (**Filion, 2006 ; Liu et Guo, 2008**).

Parmi les constituants du lait, la caséine est l'un des plus intéressants par la multiplicité de ses utilisations sous différentes formes, par ses propriétés fonctionnelles et par ses qualités nutritionnelles (**Harless, 2009**).

### **1.1.1. Constitution de la caséine totale**

La caséine totale est constituée de plusieurs fractions caséiniques qui peuvent être séparées, isolées et identifiées par les techniques classiques de séparation des protéines. On distingue quatre espèces de caséines :  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ . Les différentes caséines ont des poids moléculaires très proches les uns des autres. Ce sont des holoprotéines, hormis la caséine  $\kappa$  qui possède un groupement prosthétique glucidique. Les caséines  $\alpha_{S1}$  et  $\beta$  sont les plus abondantes. Elles représentent, à elles seules, 70% de la caséine totale (**Delacroix et Jean, 2008**).

#### **1.1.1.1. Caséine $\alpha_{S1}$**

La caséine  $\alpha_{S1}$  représente entre 34 et 40% des caséines soit entre 9 et 11 grammes par litre de lait. Cette fraction compte 199 résidus d'acides aminés avec un poids moléculaire de 23615 Da. La molécule de caséine  $\alpha_{S1}$  ne présente pas de conformation sous forme d'hélice ou de feuillet  $\beta$ . Cette caséine est sensible à l'action des protéases (**De Roissart et Luquet, 1994 ; Farrel *et al.*, 2004**).

#### **1.1.1.2. Caséine $\alpha_{S2}$**

La Caséine  $\alpha_{S2}$  représente entre 11 et 16% des caséines soit entre 4 et 5 grammes par litre de lait. Elle renferme 207 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 25226 Da. La caséine  $\alpha_{S2}$  est la plus hydrophile des caséines et sera très sensible à l'action des ions calcium. Elle précipite à une température supérieure à 20°C (**De Roissart et Luquet, 1994 ; Delacroix et Jean, 2008**).

#### **1.1.1.3. Caséine $\beta$**

La caséine  $\beta$  est présente en très forte proportion, elle constitue entre 36 et 42% des caséines soit entre 11 et 13 grammes par litre de lait. C'est une molécule qui est constituée de 209 résidus d'acides aminés pour une masse moléculaire de 23983 Da. La caséine  $\beta$  est la caséine où l'hydrophobie moyenne d'un résidu d'acide aminé est la plus élevée (**De Roissart et Luquet, 1994**).

#### **1.1.1.4. Caséine $\kappa$**

La Caséine  $\kappa$  représente environ 12% des caséines de lait, elle est formée de 169 résidus d'acides aminés et possède un poids moléculaire de 19000 Da. La Caséine  $\kappa$  est la plus hydrophobe des caséines après la caséine  $\beta$ . Elle se différencie des autres caséines par sa grande sensibilité à la chymosine, sa faible affinité pour le calcium et la présence de résidus glucidiques. Sa solubilité est peu affectée par la présence de calcium, par conséquent, la caséine  $\kappa$  est un agent stabilisateur de la micelle (**Léonil *et al.*, 2007**).

#### **1.1.2. Propriétés générales des caséines**

Les caséines se distinguent par leur faible solubilité à pH 4,6 et elles sont différenciées sur la base de la distribution des charges et de la sensibilité à la précipitation par le calcium. Leurs caractéristiques physicochimiques sont présentées au **tableau 1**. Elles partagent un facteur de composition commun puisque ce sont des protéines conjuguées, la plupart avec des groupements phosphate estérifiés à des résidus sérine. Les sites phosphoséryls sont souvent regroupés, créant des zones hydrophiles dans leur chaîne (**Brulé *et al.*, 1997**). La capacité des caséines à fixer le calcium diminue dans l'ordre  $\alpha_{s2} > \alpha_{s1} > \beta > \kappa$ , correspondant à leur contenu décroissant en phosphosérine. Le groupe phosphate des résidus phosphosérine constitue le principal site de liaison du calcium, contribuant à la structure de la micelle (**Rollema, 1992**).

**Tableau 1** : Caractéristiques physico-chimiques des caséines (Brulé *et al.*, 1997).

	Caséine $\alpha_{s1}$	Caséine $\alpha_{s2}$	Caséine $\beta$	Caséine $\kappa$
Résidus d'a.a.	199	207	209	169
Poids moléculaire (Da)	23 600	25 200	24 000	19 000
Résidus cystéine	-	2	-	2
Groupe phosphoséryls	8-9	10-13	5	1-2
Glucides	-	-	-	+
Sensibilité à la chymosine	+	-	+	+++
Sensibilité au calcium	++	+++	+	-

### 1.1.2.1. Polymorphisme génétique

Les trois principales espèces de caséines du lait de vache montrent un polymorphisme génétique (variant). Ce sont des protéines très proches les unes des autres par leur composition en acides aminés, leurs poids moléculaires et leurs propriétés. Ces variants correspondent à plusieurs formes génétiques d'une protéine identique et leur synthèse est sur la dépendance des gènes spécifiques. Les variants d'une même caséine ne représentent que des différences minimales de leur composition en acides aminés, dues à la substitution de quelques acides aminés au sein de leur chaîne polypeptidique (Jouan, 2002).

Huit variantes de la caséine  $\alpha_{s1}$  (A, B, C, D, E, F, G, H), dix de la caséine  $\beta$  ( $A^1$ ,  $A^2$ ,  $A^3$ , B, C, D, E, F, G, H), cinq de la caséine  $\kappa$  (A, B,  $B^2$ , C, D) deux de la caséine  $\alpha_{s2}$  (A et B) ont été découverts dans les races de bovins (Farell *et al.*, 2004). Seulement deux variants génétiques de la caséine  $\alpha_{s1}$  (A et B) ont été découverts dans les caséines camelines (Kappeler *et al.*, 1998).

### 1.1.2.2. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés des caséines a été déduite d'hydrolyses totales, on retrouve :

- Des teneurs élevées en acides glutamique, proline, leucine, lysine, mais aussi en amino-acides à fonction alcool (sérine, thréonine) et un taux très faible de cystéine (Tableau 2).
- La présence de tous les acides aminés dont les acides aminés indispensables (Audigé et Zonszain, 1999 ; Fox *et al.*, 2000).

**Tableau 2 :** Contenu des caséines en acides aminés (Fox *et al.*, 2000).

Résidus /molécule	Caséines			
	$\alpha_{S1}$	$\alpha_{S2}$	$\beta$	$\kappa$
<b>Proline</b>	17	10	35	20
<b>Isoleucine</b>	11	11	10	13
<b>Leucine</b>	17	13	22	8
<b>Valine</b>	11	14	19	11
<b>Méthionine</b>	5	5	6	2
<b>Cystéine</b>	0	2	0	2

### 1.1.2.3. Phosphorylation

La présence des phosphopeptides au sein des molécules de caséines est une caractéristique essentielle de celles-ci. La phosphorylation s'effectue sur les molécules de sérines, plus exceptionnellement sur celles de thréonine. Au cours de la digestion, les phosphopeptides sont libérés par les enzymes digestives : pepsine, trypsine et chymotrypsine (Jouan, 2002).

## 1.2. La micelle de caséine

### 1.2.1. Composition et propriétés

La grande majorité des caséines sont présentes sous la forme de particules colloïdales nommées micelles de caséine qui sont passablement stables. C'est une particule sphérique formée par l'association des caséines ( $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ), de quelques fragments peptidiques (les caséines  $\gamma$ ) issus de la protéolyse de la caséine  $\beta$  par plasmin et de composants salins dont les deux principaux sont le calcium et le phosphate (Jeantet *et al.*, 2008).

La micelle de caséine renferme, en plus des différentes caséines et composants salins présentés au **tableau 3**, du lactosérum enchâssé et les enzymes lipase et plasmin. La micelle de caséine est constituée à 92% des caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  et le 8% restant correspond aux composants salins. La micelle de caséine est une particule de taille variante de 80 à 600 nm avec un diamètre moyen de 150 à 180 nm (Amiot *et al.*, 2002 ; Fox et Broadkorb, 2008).

**Tableau 3 :** Composition moyenne de la micelle de caséine (Brulé *et al.*, 1997).

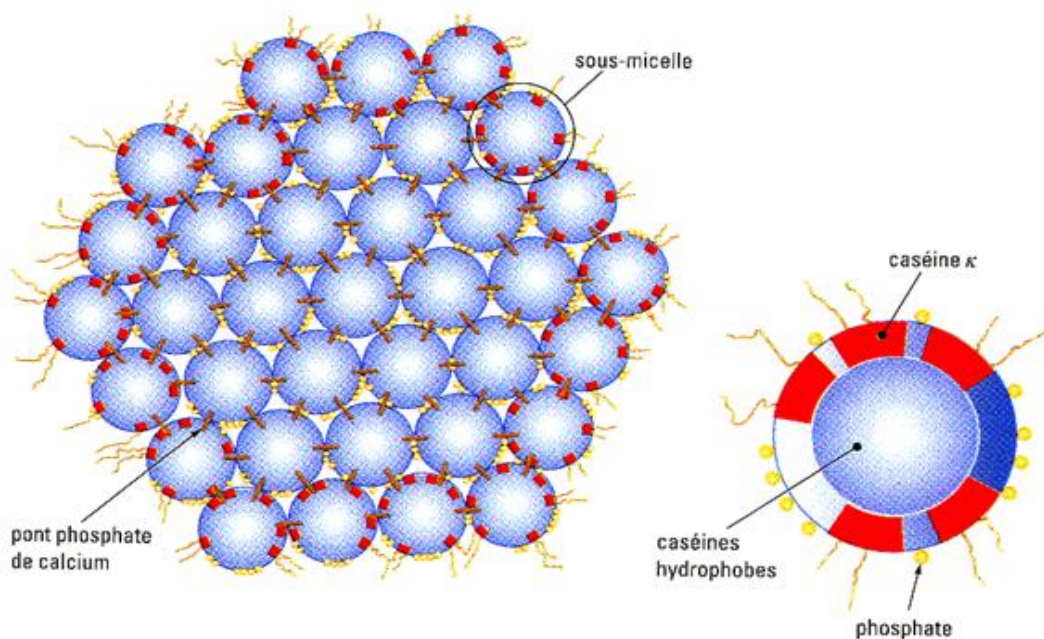
Caséines	(g/100g)	Composants salins	(g/100g)
$\alpha_{s1}$	33	Calcium	2.9
$\alpha_{s2}$	11	Magnésium	0.2
$\beta$	33	Phosphate inorganique	4.3
$\kappa$	11	Citrate	0.5
$\gamma$	4		
Caséines totales	92	Total composants	8.0

### 1.2.2. Structure

Il existe plusieurs modèles de micelles de caséine dont le plus répandu est le modèle avec sous-unités de **Schmidt (1982)**.

#### 1.2.2.1. Modèle avec sous-unités

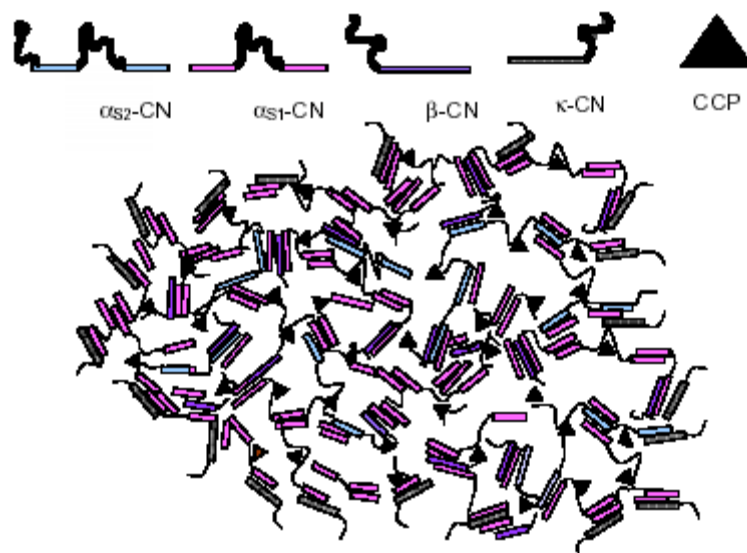
Ce modèle (**Figure 1**), suggère que les sous-unités n'étaient pas toutes de même composition mais que certaines étaient plus riches en CN- $\kappa$  et étaient situées en surface de la micelle. Finalement, **Schmidt (1982)** précisa que les sous-micelles étaient reliées par des agrégats de  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ . Dans le modèle actuel, les micelles sont en fait composées de sous-unités comprenant 10 à 100 molécules de caséines nommées sous-micelles.

**Figure 1:** Modèle de micelle de caséine avec sous-unités (Amiot *et al.*, 2002).

Les sous-micelles sont reliées entre elles par des ponts phosphate de calcium. Leur composition au centre et en périphérie est différente. En effet, les caséines  $\beta$  et  $\alpha_{s1}$  sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe alors que la partie externe, davantage hydrophile, est formée de caséine  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$  (Amiot *et al.*, 2002).

### 1.2.2.2. Modèle à dualité des liens

Un nouveau modèle, nommé « à dualité de liens », a été proposé par **Horne (1998)** pour remédier au manque d'un mécanisme plausible pour expliquer l'assemblage, la croissance et la terminaison de la croissance des autres modèles, tout en étant conforme à la réaction des micelles suite à un changement de pH, de température, d'addition d'urée ou de retrait de phosphate de calcium avec l'EDTA. Le modèle propose deux voies de polymérisation pour l'assemblage des micelles. Ces voies sont la polymérisation de caséines individuelles via les régions hydrophobes des caséines et le pontage grâce au phosphate de calcium colloïdal (CCP). La formation des micelles est contrôlée par l'équilibre entre les forces d'attraction et de répulsion dans les micelles (**Horne, 1998**). La structure de la micelle selon le modèle à dualité des liens est présentée à la **figure 2**.



**Figure 2 :** Structure de la micelle selon le modèle à dualité des liens (**Horne, 1998**).

### **1.2.3. Caractéristiques physicochimiques de la micelle de caséine**

#### **1.2.3.1. Diamètre micellaire**

Le diamètre de la micelle varie entre 50 à 600 nm et le diamètre moyen est de 120 nm (**Fox, 1993**). Le rayon de la micelle de caséine est inversement proportionnel au contenu en caséine  $\kappa$ . En effet, les plus petites micelles renferment de plus fortes proportions de caséine  $\kappa$  en raison du ratio surface-volume élevé des petites micelles (**Horne et al., 1997**). Quoique le contenu en calcium et en phosphore micellaire augmente avec l'augmentation du diamètre micellaire, il ne contrôle pas la taille des micelles. C'est la quantité de caséine  $\kappa$  qui est le facteur dominant (**Umeda et Aoki, 2002**).

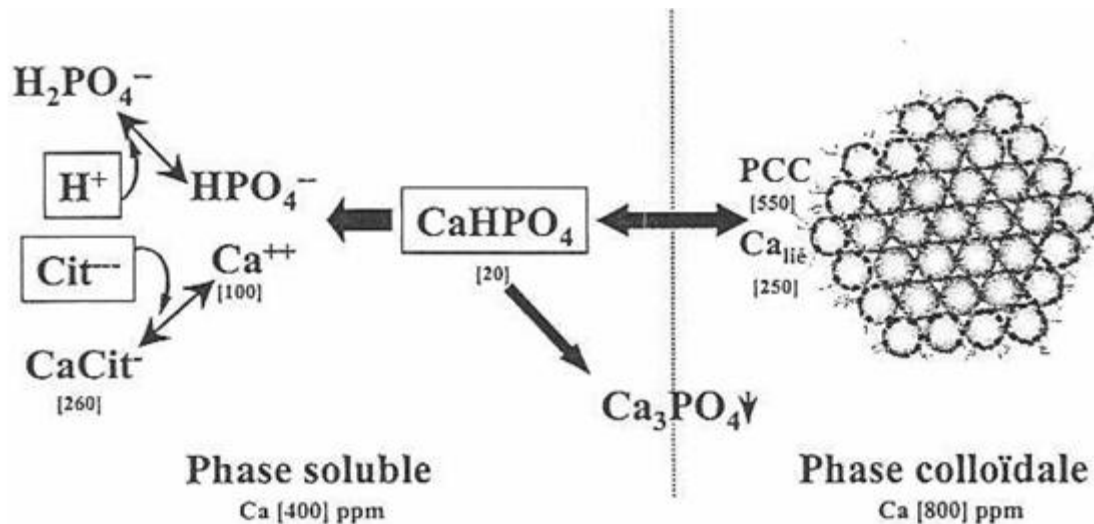
#### **1.2.3.2. Hydratation**

La quantité d'eau qui se lie à la micelle dépend de sa composition, du nombre de groupes polaires exposés, de la conformation des protéines superficielles, de la polarité en surface, du pH, des sels présents et leur concentration (**Kinsella, 1984**). La micelle fixe environ 3 g d'eau/g de protéines pour un volume hydrodynamique de 3,9 ml/g de protéines lorsque le chevelu micellaire est inclus. Cependant, l'hydratation interne de la micelle est d'environ 2 g d'eau/g de protéines (**Fox, 1993**). Il y a une forte corrélation positive entre la quantité de caséine  $\kappa$  présente et le degré d'hydratation. La capacité d'hydratation et le diamètre micellaire sont donc étroitement reliés. De ce fait, les petites micelles contiennent davantage de caséine  $\kappa$  et sont plus hydratées (**Anema et al., 2003**).

#### **1.2.3.3. Minéraux**

Les deux principaux minéraux dans la structure de la micelle sont le calcium et le phosphore dont la teneur dans le lait excède leur solubilité. C'est grâce à l'interaction avec les micelles que la précipitation est évitée. L'équilibre entre les formes solubles et associées de ces minéraux est représenté à la **figure 3**.





**Figure 3 :** Les principaux équilibres salins du lait (Britten et Pouliot, 2002).

Environ le tiers du calcium se retrouve dans la phase soluble qui se divise en 20% de sel citrate ou phosphate et 10% d'ions calcium libre. Les deux-tiers restants sont soit directement liés à la micelle ou font partie des complexes de phosphate de calcium à l'intérieur de celle-ci. Dans le cas du phosphore, la majeure partie (60%) est sous forme de phosphate organique, dont la moitié est liée à la caséine et l'autre en solution, 20% est lié aux groupements hydroxyles de certains acides aminés et le reste se partage entre les phospholipides et les esters hydrosolubles (FAO, 1998).

### 1.3. Stabilité des micelles de caséines

Les micelles de caséines présentent une grande stabilité due à deux facteurs principaux :

- La charge de surface : au pH du lait, les micelles de caséines portent de nombreuses charges négatives qui créent des répulsions électrostatiques entre les micelles qui ne s'agrègent pas.
- La forte hydratation : les micelles fixent 3.4 g d'eau par g de protéines, une partie de cette eau, située à la surface de la molécule, la stabilise.

Les facteurs de variation de la stabilité des micelles de caséines sont la température et le pH (Vierling, 2008).



La caséine  $\kappa$  est un agent stabilisateur de la micelle, elle favorise la stabilité de la micelle de deux façons. Tout d'abord, prises individuellement et en présence du calcium, les caséines  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  sont insolubles et la caséine  $\beta$  n'est soluble qu'entre 0-4 ° C. L'association de ces caséines avec la caséine  $\kappa$  est une condition essentielle à leur dispersion en présence du calcium (**Holt et Horne, 1996**). Ensuite, la caséine  $\kappa$  possède deux régions qui sont séparées lors de l'hydrolyse du lien Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> lors de l'hydrolyse par la chymosine. La partie N-terminale se nomme para- CN- $\kappa$  et est de nature hydrophobe, elle demeure attachée à la micelle, alors que la partie C-terminale de la CN- $\kappa$  est le caséinomacropéptide (CMP), de nature hydrophile et chargée négativement. La partie CMP s'étend dans le sérum et forme le chevelu micellaire d'une épaisseur de 5 à 10 nm (**Dalgleish, 1998**). Ce dernier participe à la stabilisation des micelles par répulsion électrostatique et stérique (**Brulé et al., 1997**). La protéine qui perd le chevelu micellaire par hydrolyse n'a plus la capacité de stabiliser les autres caséines (**Amiot et al., 2002**).

La caséine  $\kappa$  est également la seule caséine à avoir des résidus glucidiques dans sa constitution. La nature et l'emplacement de ces glucides sont responsables de l'hétérogénéité de sa structure. La glycosylation n'a pas de rôle spécifique mais renforce le caractère hydrophile de la partie C-terminale en plus d'augmenter l'encombrement stérique à la surface de la micelle (**Brulé et al., 1997**).

L'aggrégation des micelles de caséine soit peut-être induite par l'utilisation d'enzymes protéolytiques, les conditions acides, les traitements de chaleur et la gélification causée par le vieillissement (**Filion, 2006**).

#### **1.4. Généralités sur les bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques occupent une place importante dans l'alimentation. Elles sont responsables de la fermentation de produits alimentaires d'origine laitière, carnée ou végétale. Leurs caractères variés et leurs multiples propriétés sont largement exploités dans l'agro-alimentaire. Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes caractérisé par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. C'était en 1919 qu'Orla-Jensen a défini pour la première fois le groupe des bactéries lactiques (**Dortu et Thonart, 2009**).

#### **1.4.1. Caractéristiques des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques sont des procaryotes hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles regroupent des bactéries à coloration de Gram positive, généralement immobiles, asporulées, dépourvues de catalase et de cytochromes oxydases. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives: microaérophiles, uniquement capables de fermentation en aérobiose comme en anaérobiose. Ce sont par ailleurs des bactéries dépourvues de nitrate réductase. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux et seulement quelques espèces hydrolysent faiblement la caséine. Elles ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. Généralement acidototérantes et capables de vivre à des températures comprises entre 10 et 45 °C (**De Roissart, 1986 ; Drider et Prevost, 2009**).

Selon le type de fermentation préférentiellement utilisé, les bactéries lactiques sont dites

- Homofermentaires : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation.
- Hétérofermentaires : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique et d'autres composés : éthanol, CO<sub>2</sub> et autres acides organiques (**De Roissart et Luquet, 1994**).

#### **1.4.2. Habitat**

Les bactéries lactiques sont ubiquistes, elles ont comme habitat plusieurs milieux naturels, elles se trouvent généralement associées à des aliments riches en sucres simples. Elles peuvent être isolées du lait, du fromage, de la viande, des végétaux (plantes et fruits). Elles se développent avec la levure dans le vin, la bière et le pain. On les trouve aussi dans les cavités buccales et vaginales. Quelques espèces colonisent le tube digestif de l'homme et des animaux où elles accomplissent de nombreuses fonctions. Elles créent surtout un environnement hostile aux bactéries pathogènes (**Leveau et Bouix, 1993; Dortu et Thonart, 2009**).

## **1.5. Classification et taxonomie**

Depuis la découverte des bactéries lactiques, leur classification a connu plusieurs modifications. La première classification des bactéries lactiques basée sur les propriétés observables à savoir les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques a été établie en 1919 par Orla-Jensen qui rassembla les membres des bactéries lactiques dans un même groupe. (Stiles et Holzapfel 1997). Les marqueurs chimio-taxonomiques tels que les compositions des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été aussi utilisés pour la classification (Konig et Frohlich, 2009). Les nouveaux outils pour l'identification et la classification des bactéries lactiques remettent couramment et/ou complètent les méthodologies traditionnelles basées sur les phénotypes. La classification s'appuie sur des données moléculaires comme la comparaison des séquences codant pour les ARN16S ribosomiques qui a entraîné des changements importants dans la taxonomie des bactéries lactiques (Salminen *et al.*, 2004 ; Ho *et al.*, 2007; De Vos *et al.*, 2009) .

Selon la dernière édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (2009), les bactéries lactiques sont classées dans le phylum des Firmicutes, la classe des Bacilli et l'ordre des Lactobacillales renfermant trente-cinq genres répartis sur six familles. Parmi ces genres , seulement douze sont utilisés dans la biotechnologie alimentaire, il s'agit de : *Aerococcus* , *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oenococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Vagococcus* , *Tetragenococcus* , *Weissella* (Dridier et Privost, 2009).

### **1.5.1. Le genre *Lactobacillus***

Avec environ 154 espèces et 35 sous-espèces, le genre *Lactobacillus* (*Lb*) est le groupe le plus large des bactéries lactiques. Les lactobacilles sont très hétérogènes et les diverses espèces présentent des caractères phénotypiques et génotypiques variés. Les cellules de ce genre sont soit des bacilles longs parfois incurvés ou des coccobacilles courts isolés, comme elles peuvent former des chaînes et sont généralement immobiles. Les souches sont acidophiles et peuvent croître à un pH égal à 5 ou moins avec un optimum de 5.5 à 6.2. La température optimale de croissance est de 30°C à 40°C, mais peuvent croître à un intervalle de température allant de 2°C à 53°C. Les thermophiles sont incapables de se développer à moins de 15°C. Les lactobacilles exigent pour leur développement des milieux bien adaptés,

riches en acides aminés, en vitamines et en acides gras Ils sont généralement peu protéolytiques et peu lipolytiques (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Le genre *Lactobacillus* peut être divisé en trois groupes, selon la voie métabolique de la fermentation des sucres: homofermentaires stricts, hétérofermentaires facultatifs et hétérofermentaires stricts (**De Roissart, 1986 ; Hutkins. 2006**).

**Groupe 1:** *Thermobactérium* renferme les lactobacilles homofermentaires stricts (*Lb. delbrueckii*) qui ne fermentent que les hexoses par la voie de la glycolyse en produisant presque exclusivement du lactate.

**Groupe 2:** *Streptobacterium* renferme les lactobacilles homo-hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*) qui fermentent les hexoses mais aussi les pentoses en lactate.

**Groupe 3:** *Bétabactérium* regroupe les lactobacilles hétérofermentaires stricts (*Lb. brevis*) qui fermentent les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO<sub>2</sub>, les pentoses aussi sont fermentés en lactate et en acétate, ces lactobacilles ont un faible pouvoir acidifiant et produisent des substances aromatiques.

### **1.5.2. Le genre *Lactococcus***

Le genre *Lactococcus* (*Lc*) correspond au groupe des bactéries lactiques dont la principale espèce est *Lactococcus lactis* qui fut la première bactérie lactique dont le génome a été entièrement séquencé. Par définition, le genre *Lactococcus* est formé de bactéries à Gram positif dont les cellules, en forme de coques, sont associées par paires ou en chaînettes de longueur variable (**Desmazaud, 1998**).

Le groupe des levains mésophiles, auquel les lactocoques appartiennent, est le premier à avoir fait l'objet de sélection et de production pour l'industrie laitière. Parmi, les *Lc. Lactis* sp, deux sous-espèces et un bivariant prédominant en fermentation laitière : *Lc. Lactis* subsp. *lactis*(*Lc. lactis*), *Lc. Lactis* subsp. *cremoris* (*Lc. cremoris*) et *Lc. Lactis* subsp. *lactis* biovar. *Diacetylactis* (*Lc. Diacetylactis*)) (**De Vos et al., 2009**).

Ces souches sont sélectionnées pour leur aptitude à acidifier le lait, à travers leur métabolisme homofermentaire produisant uniquement l'acide lactique L(+), et la formation d'arômes (**John et al., 2009**). Leur température optimale de croissance varie de 10 à 40°C mais sont incapables de se développer à 45°C. Elles se développent généralement à 4% de

NaCl et à un pH proche de la neutralité, leur croissance s'arrête lorsque le pH du milieu atteint 4,5. Ce genre est un habitant typique des plantes, des animaux et de leurs produits (**De Roissart et Luquet, 1994**).

### **1.6. Intérêt des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques jouent un rôle important que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans le domaine thérapeutique. Elles interviennent en effet par elles-mêmes en exerçant des effets sur l'homme directement; par la fermentation qui enrichit l'aliment de probiotiques connus et à découvrir et sur l'aliment en améliorant sa conservation et ses propriétés organoleptiques.

#### **1.6.1. Dans l'industrie alimentaire**

Les bactéries lactiques sont impliquées dans la fermentation et la bioconservation de différents aliments. Ainsi, les souches de *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* sont utilisées pour la production du yaourt, des fromages et des laits fermentés. Le vin, les poissons, les viandes, les charcuteries, le pain au levain entre autres sont aussi des produits de fermentation par des bactéries lactiques (**Badis et al., 2005 ; Yateem et al., 2008**). L'utilisation de ces dernières a pour but l'amélioration des caractéristiques organoleptiques des produits fermentés et l'augmentation de leur durée de conservation sans l'utilisation de conservateurs chimiques grâce aux substances antimicrobiennes qu'elles sécrètent (**Dortu et Thonart, 2009**). Les souches utilisées en industrie alimentaire doivent répondre à des critères comme l'absence de pathogénicité ou l'activité toxique, la capacité d'améliorer les caractéristiques organoleptiques, la capacité de dominance, la facilité de culture et de conservation, et maintenance des propriétés désirables durant le stockage (**Marth et Steele, 2001**).

#### **1.6.2. Dans le domaine thérapeutique**

On découvre de plus en plus d'effet bénéfique des bactéries lactiques aussi bien pour l'homme que pour l'animal. Etant des probiotiques, les bactéries lactiques apportent des bénéfices à l'hôte en conférant une balance de la microflore intestinale, et en jouant également un rôle important dans la maturation du système immunitaire (**Yateem et al., 2008**).

Différentes études ont démontré le rôle préventif aussi bien que curatif de ces bactéries sur plusieurs types de diarrhées (**Mkrtchyan et al., 2010**). D'autres ont cité leur capacité à diminuer les allergies liées aux aliments grâce à leur activité protéolytique (**El-Ghaish et al., 2011**). **Uehara et al., (2006)** ont démontré la capacité des souches de *Lactobacillus crispatus* d'empêcher la colonisation du vagin par les bactéries pathogènes et de prévenir ainsi les rechutes chez les femmes qui souffrent d'inflammations fréquentes et répétées de la vessie.

### **1.6.3. Rôles technologiques des bactéries lactiques**

Certaines bactéries lactiques sont capables de produire des composés d'arômes qui participent aux qualités organoleptiques des fromages. La plupart des composés d'arôme sont issus du métabolisme du citrate (**Hugenholtz et al., 2002**).

Certaines souches ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des polymères de sucre appelés polysaccharides exocellulaires ou EPS, qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini. En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yogourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (**Ruas-Madiedo et al., 2002**).

Les bactéries lactiques jouent également un rôle essentiel dans la conservation des produits alimentaires, elles sont capables de produire une variété de produits inhibiteurs dont les effets peuvent se répercuter sur la flore lactique elle-même mais aussi sur la flore indésirable ou pathogène (**florèz et al., 2008**). Les acides organiques sont produits lors du processus de fermentation et permettent d'inhiber la croissance des levures et d'autres bactéries qui ne peuvent se développer à pH acide. L'effet inhibiteur de ces acides organiques est principalement provoqué par les molécules non dissociées qui diffusent à travers les couches lipidiques des membranes des microorganismes provoquant ainsi un abaissement du pH dans le cytoplasme qui a pour conséquence la déstabilisation des cellules (**Slover et Danziger, 2008**).

La production et l'accumulation de peroxyde d'hydrogène créent un environnement toxique pour les cellules non équipées de systèmes de protection capable de dégrader ce composé. Son accumulation est inhibitrice vis-à-vis des souches qui génèrent le peroxyde mais aussi vis-à-vis d'autres microorganismes (**De Roissart et Luquet, 1994**).

Les bactériocines sont des substances de nature protéique synthétisées par les bactéries lactiques et qui ont un pouvoir antibactérien dirigé contre des bactéries taxonomiquement proches du micro-organisme producteur (**Måyra-Måkinen, 2004**). Ces peptides antibactériens ont une action contre les bactéries à Gram positif associées à l'altération de la qualité hygiénique des aliments et à certaines pathologies humaines (**Rodriguez et al., 2003**).

D'autres agents antimicrobiens sont aussi produites: dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), l'acide acétique, le Diacétyle et l'acétaldéhyde (**Drider et al., 2006**).

### **1.7. Exigences nutritionnelles des bactéries lactiques**

Les bactéries lactiques ont une faible aptitude biosynthétique et sont en principe incapables d'assimiler directement les principaux précurseurs de leur environnement. Elles sont considérées comme un groupe bactérien le plus exigeant du point de vue nutritionnel, car elles requièrent non seulement des substrats carbonés, azotés, phosphatés et soufrés mais aussi des facteurs de croissance comme les vitamines et les oligoéléments dont le rôle des coenzymes est plus important. (**Drider et Prevost, 2009**).

#### **1.7.1. Exigences en acides aminés**

Les bactéries lactiques sont en principe incapables d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme. Les lactobacilles ont besoin d'aspartate, d'histidine, de lysine, de leucine, de méthionine et de valine (**Lenoir et al., 1992**), alors que les lactocoques exigent pour leur croissance seulement deux acides aminés, l'isoleucine et la leucine (**Juillard et al., 1996**).

#### **1.7.2. Exigences en vitamines**

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle irremplaçable de coenzyme. Les bactéries lactiques sont, à quelques exceptions près, incapables de synthétiser des vitamines d'où l'importance d'un apport exogène de vitamines au milieu de culture (**De Roissart, 1986**).

Toutes les espèces de lactobacilles présentent une exigence absolue pour le pantothénate de calcium (vitamine B<sub>5</sub>) et la niacine (vitamine PP) ou la riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) (sauf pour *Lb brevis*). De plus, *Lb lactis*, *Lb bulgaricus* et *Lb acidophilus* exigent la



cobalamine (vitamine B12) ; *Lb brevis* nécessite la thiamine (vitamine B1) et l'acide folique ; *Lb helveticus* la pyridoxine (vitamine B6) ; *Lb acidophilus* l'acide folique ; *Lb casei* la pyridoxine et l'acide folique. Les lactocoques ont une exigence en niacine et en acide pantothénique, ils sont stimulés par la pyridoxine ou l'acide aspartique. Pour ces bactéries, la biotine (vitamine H) agit avec le gaz carbonique ce qui peut expliquer leur stimulation puisque ces composés sont impliqués dans la synthèse de l'acide aspartique et de certains acides gras (De Roissart et Luquet, 1994).

### **1.7.3. Exigences en bases azotées**

Chez certaines souches de lactocoques, la production d'acide dans le lait peut être stimulée par le mélange adénine, guanine, uracile et xanthine (Selby-Smith *et al.*, 1975). Les streptocoques thermophiles présentent une exigence absolue pour ces quatre bases. Dans les milieux synthétiques, les lactobacilles exigent la présence d'adénine, de cytosine, de désoxyguanosine, de guanine, de thymidine et d'uracile (Ramasamy et Natarajan, 1981).

D'autre part, l'acide orotique, qui est un intermédiaire de la synthèse des bases puriques, est un facteur de croissance pour *Lb bulgaricus*. L'acide orotique régule la synthèse des acides ribonucléiques, tandis que la synthèse des acides désoxyribonucléiques n'est pas affectée. En général, chez les lactobacilles, les exigences en bases azotées sont très variables selon les souches ; l'addition de ces composés peut même, chez certaines souches, entraîner des phénomènes d'inhibition de la croissance (Desmazeaud, 1992).

### **1.7.4. Exigences en glucides**

Pour croître, les bactéries lactiques ont besoin d'un apport de nutriments comportant au moins un sucre fermentescible comme source d'énergie. La fermentation des sucres s'effectue essentiellement en trois étapes : le transport du sucre à travers la barrière hydrophobe de la membrane cellulaire, le catabolisme intracellulaire du sucre et enfin la formation et l'expulsion extracellulaire des métabolites terminaux généralement acides, deux types de métabolismes fermentaires sont décrits : le métabolisme à caractère homofermentaire et le métabolisme à caractère hétérofermentaire (Hutkins, 2006).



### **1.7.5. Exigences en sels minéraux**

Les principaux éléments requis sont le magnésium et le manganèse, ils jouent un rôle important dans la nutrition des *Lactobacillus* (Mazali, 1992 ; Letrot et Juillard, 2001).

Le magnésium est le principal cation divalent des cellules vivantes. Il intervient dans les systèmes de transport intra-membranaires, et serait indispensable pour la croissance de *Lb helveticus* et essentiel pour celle de *Lb lactis* et *Lb delbrueckii* (Desmazeaud, 1992). Le magnésium est un activateur des différentes réactions métaboliques (division cellulaire, stabilisation des acides nucléiques ou hydrolyse peptidique) (Corrieu et Luquet., 2008).

Le manganèse est nécessaire à la structure et le fonctionnement des enzymes, et à la détoxification des cellules mises en présence de l'oxygène, notamment chez *Lb plantarum* (Desmazeaud, 1992). Le fer n'a pas d'action générale sur la croissance ou sur la production d'acide lactique (Boyaval, 1989). Le calcium intervient au niveau membranaire, lors de l'efflux de lactate formé lors de la fermentation lactique, il y a formation d'ATP par une ATPase membranaire dépendante du complexe  $\text{Ca}^{2+} / \text{Mn}^{2+}$  (Konings et Otto, 1983).

Le potassium joue un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire. Cet ion est exigé pour la croissance de *Lb helveticus*, *Enterococcus faecalis* et *Lb casei*. Le sodium exerce un effet sélectif sur les différentes espèces de bactéries lactiques. Des souches résistantes au sel peuvent être isolées de laits crus salés (jusqu'à 120 g/l) ou de fromages salés comme le Domiati Egyptien : elles appartiendraient aux genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* (El-Gendy et al., 1983). Le zinc présente un effet positif pour la croissance de certains lactobacilles, mais il est toxique à forte concentration (Corrieu et Luquet, 2008).

## **1.8. La protéolyse chez les bactéries lactiques**

### **1.8.1. Métabolisme azoté des bactéries lactiques dans le lait**

Les bactéries lactiques sont auxotrophes pour de nombreux acides aminés. Elles exigent l'apport exogène d'acides aminés pour leur croissance car elles sont incapables, pour la plupart, d'en effectuer la synthèse à partir d'une source azotée plus simple (Desmazaud, 1983). Les bactéries lactiques ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, peu abondants dans le lait, ou des peptides composés seulement de quelques acides aminés. Leur

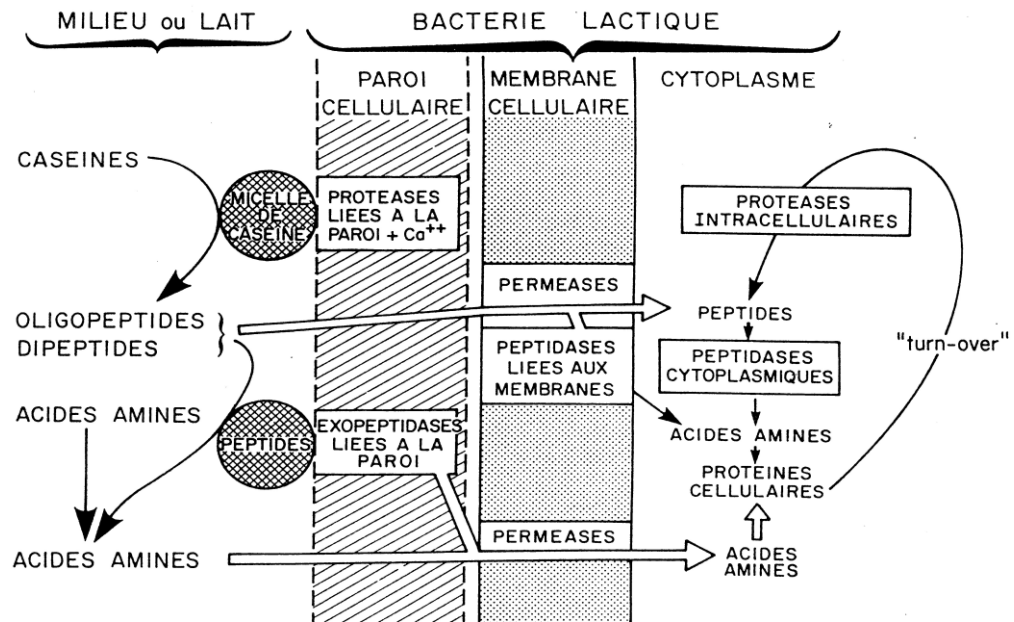
nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des protéines du lait, notamment les caséines, par des enzymes protéolytiques (**Fedrerighi, 2005**).

Le lait de vache contient environ 37 mg/ml de protéines dont la plupart sont de poids moléculaires élevés (caséines et protéines du lactosérum), mais il ne renferme que très peu d'acides aminés libres et de peptides (0.04 à 0.01mg/ml, soit 8 à 16% de la quantité nécessaire aux bactéries lactiques pour atteindre une densité cellulaire maximale). Cela signifie que le lait contient des substances azotées assimilables suffisantes pour assurer le démarrage du métabolisme bactérien mais un fractionnement des protéines est indispensable pour que la croissance se poursuive (**Monnet et Grippon, 1994 ; Juillard *et al.*, 1995 et 1996**).

L'étude de la croissance de certaines souches de *Lactococcus* dans un lait additionné de protéines et peptides marqués au  $^{14}\text{C}$ , lors de l'introduction des peptides marqués, la radioactivité des protéines bactériennes d'une souche de *Lactococcus lactis ssp cremoris* reste identique au cours des 5 premières générations de croissance, suggérant que les peptides du lait procurent une proportion constante de l'azote utilisé pour la croissance, la contribution de la fraction peptidique restant faible par rapport aux besoins azotés totaux.

Lors de l'introduction des protéines marquées dans le lait, la radioactivité des protéines bactériennes augmente régulièrement au cours des 5 premières générations, indiquant que les protéines du lait représentent une source d'azote de plus en plus importante. Lorsque les protéines radioactives sont ajoutées individuellement au lait, la radioactivité est incorporée dans les protéines bactériennes, et ceci quelle que soit la protéine marquée ajoutée. Ceci indique que toutes les protéines du lait (caséine mais aussi les protéines du lactosérum) sont utilisées comme source d'azote (**Mills et Thomas, 1981**). Les bactéries lactiques utilisent toutes ces protéines grâce à leur système protéolytique.

En raison de leur charge et de leur poids moléculaire, les oligopeptides et, à plus forte raison, les protéines, ne peuvent traverser les enveloppes et les membranes cellulaires microbiennes, en particulier la membrane cytoplasmique, pour être utilisés, ils doivent être au préalable hydrolysés par des enzymes protéolytiques soit extracellulaires, soit liées à la paroi cellulaire (**Gupta *et al.*, 2002**). D'autre part, les plus courts peptides qui ont été transportés dans la cellule, doivent être hydrolysés en acides aminés constitutifs par les enzymes protéolytiques intracellulaires (**Figure 4**).



**Figure 4 :** Utilisation des protéines, des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques (De Roissart et Luquet, 1994).

### 1.8.2. Le système protéolytique des bactéries lactiques

L'activité protéolytique globale des bactéries lactiques est considérée comme faible comparée à celle d'autres bactéries comme *Bacillus* ou *Pseudomonas* mais leur équipement enzymatique est complexe par la diversité et la nature des enzymes détectées et par leur localisation intra ou extracellulaire (De Roissart et Luquet, 1994 ; Osaana *et al.*, 2006).

La dégradation des caséines, et l'utilisation ultérieure des produits de dégradation, nécessitent un système protéolytique complexe. Ce dernier n'est pas seulement indispensable pour le métabolisme de l'azote des bactéries lactiques, mais joue aussi un rôle dans le processus d'affinage de plusieurs variétés de fromages (Fox, 1989 ; Gobbetti *et al.*, 2005).

Le système protéolytique est un ensemble composé d'une ou plusieurs protéases liées à l'enveloppe cellulaire capable de dégrader les caséines en oligopeptides, un système de transport pour des acides aminés et des peptides, une série de peptidases intracellulaires nécessaires à la dégradation de peptides du lait et de peptides dérivés des caséines en acides aminés (Kungi *et al.*, 1996 ; Mc Sweeney, 2004 ; Chaves-López *et al.*, 2014).

Les études du système protéolytique ont été menées essentiellement pour le genre *Lactococcus lactis* pour l'importance qu'il joue sur le plan industriel, et a permis l'établissement d'un modèle de la protéolyse.

La première étape de la protéolyse fait intervenir une protéase ancrée à la surface bactérienne, appelée protéase de paroi (PrtP). Les peptides sont pris en charge par deux systèmes de transport des oligopeptides (Opp et Opt) pour traverser l'enveloppe bactérienne. Des di et tri peptides peuvent aussi être transportés par deux autres systèmes (DtpT et Opt). Les acides aminés sont eux transportés par des systèmes spécifiques. Dans le cytoplasme bactérien, un éventail de peptidases concourt à achever l'hydrolyse des peptides en acides aminés (Savijoki *et al.*, 2006; Atlan *et al.*, 2008; Picon *et al.*, 2010) (Figure 5). Le catabolisme des acides aminés est une voie majeure de formation de molécules aromatiques (alcool, aldéhydes, acides organiques, ...), comme il peut être une source d'énergie pour certaines bactéries lactiques en cas de limitation en nutriments (Williams *et al.*, 2001).

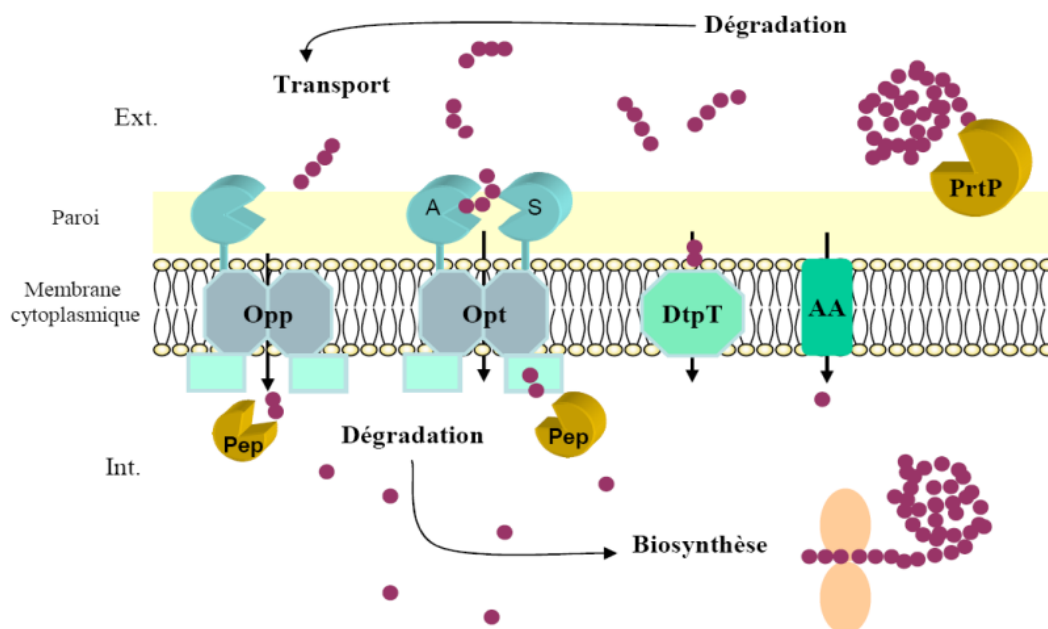


Figure 5 : Système protéolytique de *Lactococcus lactis* (Savijoki *et al.*, 2006).

### 1.8.2.1. Les protéases de paroi

Les caséines du lait représentent la principale source d'azote pour les lactocoques : en effet 90% de la croissance bactérienne lui est imputable et son utilisation met en œuvre un système complexe qui fait intervenir plusieurs enzymes agissant séquentiellement. Les

protéases de paroi assurent la première étape dans la cascade des réactions permettant la dégradation des caséines du lait (Juillard *et al.*, 1996 ; Vinogradov *et al.*, 2013).

#### 1.8.2.1.1. Les propriétés biochimiques et génétiques

Des travaux de caractérisation moléculaire ont permis de démontrer que les protéases de paroi des bactéries lactiques sont des enzymes monomériques, et font partie de la famille des protéases à sérine (Laan et Konings, 1989). Les protéases sont de haut poids moléculaire, compris entre 180 et 190 kDa (Kunji *et al.*, 1996), assez différents du poids moléculaire de 145 kDa estimé pour une protéase de paroi purifiée à partir de *Lactobacillus acidophilus* (Kojic *et al.*, 1991). Leur maximum d'activité est obtenu dans un spectre de pH allant de 5,5 jusqu'à 6,5 ; la température optimale pour l'activité diffère pour chaque protéase, elle se situe généralement entre 30°C et 40°C (Kok *et al.*, 1994). Cependant une protéase de paroi de *Lactobacillus casei* a montré un maximum d'activité à pH 8.0 et à température 50°C (Sharmin *et al.*, 2004). Certaines souches de *Lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus* possède une métalloenzyme de paroi insensible au PMSF (Gobbetti *et al.*, 2005).

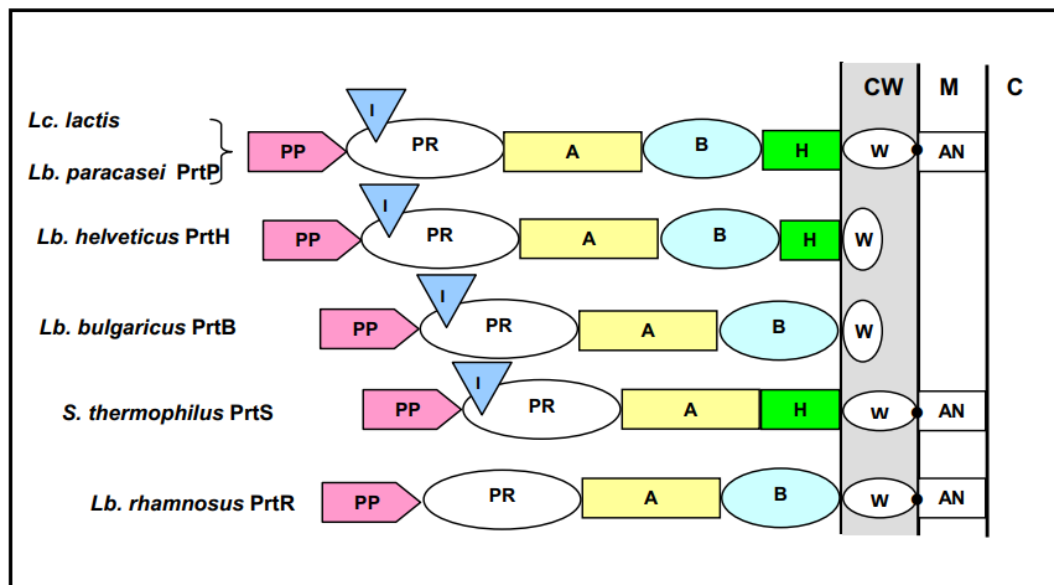
La majorité des protéases de paroi des bactéries lactiques sont  $\text{Ca}^{2+}$  dépendantes, ces ions jouent un rôle dans l'attachement des protéases à la paroi et dans la stabilisation des sites catalytiques (Kok, 1990 ; Exterkate et Alting, 1999). Ces enzymes sont libérées dans le milieu à la suite d'un traitement des cellules par le lysozyme ou la glycine ou par un lavage par un tampon contenant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Fernandez-Espla *et al.*, 2000).

Des analyses génétiques réalisées sur des souches de *Lactococcus lactis* ont montré que les gènes codants les protéases de paroi sont généralement plasmidiques (Kunji *et al.*, 1996), par contre, ils sont chromosomiques chez les lactobacilles (Holck et Naes, 1992 ; Kojic *et al.*, 1995). La synthèse des protéinases par les lactobacilles pourrait être plus constante que chez les lactocoques étant donné que les plasmides sont souvent éliminés après plusieurs cycles de division.

Les protéases de paroi des lactocoques sont produites sous forme de pré-protéine de poids moléculaire voisin de 200 kDa. Elles subissent une maturation par libération d'un peptide de 18 kDa résultant de l'hydrolyse de la partie N terminal sous l'action de lipoprotéine PrtM dont le gène se trouve en amont du gène PrtP qui code pour la protéase pariétale (Fernandez-Espla *et al.*, 2000 ; Savijoki *et al.*, 2006). Aucune protéine homologue

à PrtM n'a été détectée chez les lactobacilles. Chez ce genre, les protéases ne sont pas libérées par autolyse mais après un traitement des cellules par une muramidase (lysozyme) suivi d'un choc osmotique (Atlan, 1996).

Quatre gènes codants pour des protéases de paroi ont été décrits chez les lactobacilles, les gènes prtB et prtH chez *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* NCDO1489 et *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 respectivement, le gène prtR chez *Lactobacillus rhamnosus*, et le gène prtP chez *Lactobacillus paracasei* (Figure 6). Le gène prtP code pour une protéase identique à celle des lactocoques. Les gènes prtH, prtB et prtR codent pour des protéases non solubilisées par les ions  $Ca^{2+}$  ayant des propriétés ressemblant à celles observées chez les subtilases de paroi (Courtin et al., 2002 ; Pastar et al., 2006 ; Savijoki et al., 2006). La transcription des gènes prtP est influencée par la composition du milieu : la production de la protéase de paroi est induite par la présence de caséines dans le milieu et est réprimée par une concentration élevée de peptides. Cette répression n'est possible qu'après diffusion des peptides dans la cellule et leur dégradation dans le cytoplasme (Hebert et al., 2000).



**CW** Cell wall, **M** membrane, **C** cytoplasme, **PP** préprodomaine, **PR** domaine catalytique, **I** domaine d'insertion, **A** domaine A, **B** domaine B, **H** domaine en hélice, **W** domaine intermembranaire, **AN** domaine d'attachement, ● signal court

**Figure 6:** Protéases de paroi de quelques souches de bactéries lactique (Siezen, 1999).



#### 1.8.2.1.2. Classification des protéases de paroi

Une classification basée sur la spécificité catalytique de ces enzymes envers les caséines a été proposée pour différencier les protéases des lactocoques.

Un premier type de protéinase (ou protéase), appelé PI, et isolé des souches *Lc lactis* subsp *cremoris* HP et *Lc lactis* subsp *cremoris* H2, s'attaque fortement à la caséine  $\beta$ , mais faiblement à la caséine  $\alpha_{s1}$ .

Un deuxième type de protéinase, appelé PIII, et isolé des souches *Lc lactis* subsp *cremoris* AM1 et *Lc lactis* subsp *cremoris* SK11 hydrolyse la caséine  $\beta$  d'une manière différente de la protéinase PI, tout en s'attaquant à la caséine  $\alpha_{s1}$ , et à la caséine  $\kappa$ . Finalement, d'autres protéinases ont été isolées à partir d'autres souches de lactocoques telles que *Lc lactis* subsp *cremoris* NCDO763 et *Lc lactis* subsp *cremoris* Wg2, et posséderaient des spécificités intermédiaires entre les enzymes PI et PIII. Cette dernière classe de protéinase dégrade la caséine  $\beta$  de la même manière que la protéinase PI, mais elle est incapable d'hydrolyser la caséine  $\alpha_{s1}$  (**Exterkate et al., 1992**). PI est le seul type rencontré chez *Lc lactis* subsp *cremoris* HP, TR, C13, et Wg2, alors que PIII est le seul type retrouvé chez les souches *Lc lactis* subsp *cremoris* AM1, et SK11. D'autres souches, comme *Lc lactis* subsp *cremoris* FD27, et E8 possèdent les deux types de protéinases PI et PIII simultanément. (**Visser et al., 1991**).

Chez les espèces du genre *Lactobacillus*, les protéinases sont hautement spécifiques, et se divisent en deux classes PI et PIII (**Kunji et al., 1996**).

Des analyses génétiques réalisées sur des souches de *Lc. lactis* ont montré que les protéases type-PI et type-PIII sont codées sur des plasmides dont l'élimination conduit à une perte de l'activité protéasique. Les séquences génétiques codantes pour les deux types de protéases démontrent une homologie de 98% et pour chacune des deux séquences, il y a production des deux transcrits prtP et prtM (**Otto et al., 1982; Kok et al., 1988**).

**Naes et Nissen-Meyer (1992)** ont démontré que *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* NCDO 151 produit un transcrit de prtM identique à celui des souches de lactocoques. La séquence peptidique de la protéase liée à la paroi cellulaire des lactobacilles serait identique à celles des protéases des lactocoques. Toutefois, les séquences génétiques codant les protéases des

lactocoques et de *Lb. bulgaricus* montrent peu d'homologie. Cette différence pourrait s'appliquer à d'autres espèces de lactobacilles car aucune réponse immunologique n'a été observée sur des extraits de plusieurs espèces de lactobacilles (*Lb. bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. buckneri*) et des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéases de *Lb. cremoris* Wg2 ou SKI1 (Sasaki *et al.*, 1995 a et b).

#### **1.8.2.1.3. Intérêt technologique des protéases de paroi**

Les protéases de paroi sont les enzymes clés du système protéolytique des bactéries lactiques et sont impliquées dans la première étape de la dégradation des caséines. En plus de leur rôle vital pour la croissance bactérienne, elles contribuent au développement de la flaveur et de la texture des produits fermentés. En outre, certaines protéases de paroi peuvent libérer, durant la fermentation laitière, des peptides à activités biologiques (Broadbent *et al.*, 2002).

Durant la fabrication de fromage, la protéolyse de la caséine joue un rôle central, les acides aminés résultants sont les principaux précurseurs d'arôme comme les alcools, aldéhydes, acides, esters et les composés soufrés (Smit *et al.*, 2005). L'accumulation de peptides hydrophobes riches en résidus proline, est un problème pour l'industrie fromagère car ce sont les principales causes de l'amertume du produit (Smukowski *et al.*, 2003). Les spécificités de la protéase de paroi jouent un rôle essentiel dans la production de ces peptides (Visser *et al.*, 1991).

#### **1.8.2.2. Les protéases intracellulaires**

Les bactéries lactiques possèdent aussi un équipement protéolytique intracellulaire important. Différentes protéases intracellulaires ont été décrites chez des souches du genre *Lactobacillus*.

En plus de leur rôle strictement nutritionnel qui permet aux bactéries d'utiliser les peptides ayant franchi les enveloppes microbiennes, les enzymes protéolytiques intracellulaires interviennent dans la nutrition à trois niveaux : lors de l'hydrolyse de peptides éventuellement toxiques (résistance aux antibiotiques), dans le « turn - over » des protéines intracellulaires et dans la synthèse et la maturation des protéines intracellulaires (De Roissart et Luquet, 1994).



### **1.8.2.3. Les systèmes de transport des acides aminés et des peptides chez les bactéries lactiques**

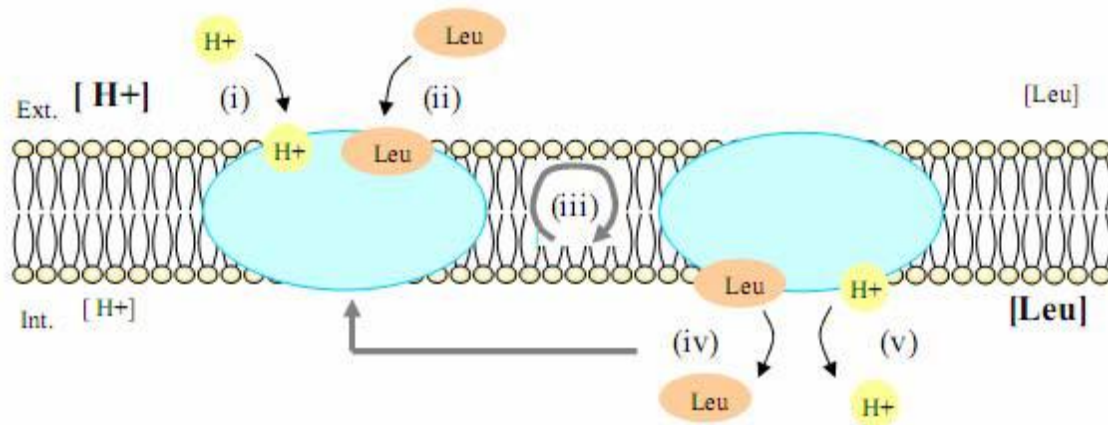
L'utilisation des peptides et des acides aminés par les bactéries lactiques est conditionnée par leur transport à travers la membrane via les systèmes de transport des acides aminés, des di et tri peptides et des oligopeptides, c'est un système énergie et température dépendant pouvant être facilement saturé (**Charbonnel et al., 2004**).

#### **1.8.2.3.1. Les systèmes de transport des acides aminés**

Trois mécanismes de transport d'acides aminés ont été décrits chez les bactéries lactiques. En premier lieu, le transport actif dont l'énergie est fournie par l'ATP ou d'autres composés phosphorylés riches en énergie. Ce mode de transport est unidirectionnel et permet l'accumulation intracellulaire des acides aminés (**Driessen et al., 1987**). L'énergie nécessaire pour ce type de transport est fournie par hydrolyse de liaisons phosphates de l'ATP, il catalyse le transport spécifique des acides aminés glutamate, glutamine, aspartate, proline et glycine-bétaine (**Kunji et al., 1996**). Chez *St. thermophilus*, il est utilisé pour transporter les acides aminés à chaîne ramifiée, méthionine, glutamine et des acides aminés polaires (**Hols et al., 2005; Juilliard, 2007**).

En second lieu, le transport couplé à la force promotrice qui permet le transport simultané et réversible d'acides aminés et de protons (ou d'autres cations comme Na<sup>+</sup>). C'est un système utilisant une force promotrice générée par un potentiel électrique et un gradient chimique de proton (H<sup>+</sup>) à travers la membrane ; il est spécifique au transport des acides aminés leucine, thréonine, isoleucine, alanine, valine, glycine et méthionine (**Kunji et al., 1996**).

Parmi les systèmes de transport liés à la force proton motrice celui de la leucine a été particulièrement étudié. Chez *Lc lactis* subsp *cremoris*. Le mécanisme de transport de la leucine se découpe en plusieurs étapes ordonnées (**Driessen et al., 1987**): la première étape est la fixation d'un proton à la partie extracellulaire de la perméase qui une fois protonnée, fixe la leucine de manière spécifique. Le complexe perméase-proton-leucine alors formé, inverse sa topologie, ce qui permet la libération de l'acide aminé dans le cytoplasme. Une fois l'acide aminé libéré, la perméase se réoriente vers le milieu extracellulaire (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Modèle du cycle de transport de la leucine par un transporteur dépendant de la force proton motrice (Driessen *et al.*, 1987).

Enfin, le transport par système antiport où la force motrice est dû au gradient chimique des acides aminés transportés. Cet échange ne nécessite donc pas d'énergie. Ainsi, l'entrée d'un acide aminé précurseur est couplée à la sortie d'un produit de ce précurseur (Poolman, 1993). Ce type de transport est décrit surtout pour le couple d'acides aminés Arg/Orn, ce mécanisme dépend de la concentration de l'un des deux acides aminés dans le milieu (Konings *et al.*, 1989).

#### 1.8.2.3.2. Les systèmes de transport des di/tripeptides

Il existe deux systèmes de transport des dipeptides chez *Lc. lactis ssp. lactis* : le système DtpT et le système DppP (ATP-dépendant). Le premier système est spécifique aux di- et tripeptides hydrophiles, il s'agit d'un transport lié à une force promotrice. Ce système de transport est caractérisé par la protéine DtpT (Di-tri-peptide Transporter) essentiellement décrite chez *Lc. lactis*. Cette protéine permet le transport d'une large variété de di- et tripeptides hydrophiles en symport avec des protons (Smid *et al.*, 1989). La protéine DtpT a été également mise en évidence chez d'autres bactéries, notamment chez *Lb. helveticus* (Nakajima *et al.*, 1997).

Un second système de transport spécifique aux di- et tri-peptides hydrophobes a été mis en évidence chez des mutants de *Lc. lactis*. Il s'agit d'un système de transport à ATP-dépendant, caractérisé par une protéine DtpP, capable de transporter les di- et tripeptides hydrophobes (Foucaud *et al.*, 1995).

#### **1.8.2.3.3. Les systèmes de transport des oligopeptides**

Le système de transport d'oligopeptides joue un rôle essentiel dans la nutrition azotée chez les bactéries et tout particulièrement chez les bactéries lactiques qui sont auxotrophes pour certains acides aminés. Le système de transport des oligopeptides est particulièrement important pour la croissance en lait, car l'incapacité à transporter ces peptides entraîne une lente coagulation du lait, même en présence de la protéase PrtP (Tynkkynen *et al.*, 1993).

Chez les bactéries lactiques, le transport d'oligopeptides se fait via un transporteur. Le transporteur de *Lc. lactis*, appelé Opp, a été bien caractérisé et a été utilisé comme modèle d'étude. Il s'agit d'un système ATP-dépendant car l'addition de vanadate (inhibiteur d'ATPase) inhibe entièrement le système (Kunji *et al.*, 1993; Tam et Saier, 1993).

Le gène d'Opp comporte cinq cadres de lecture ouverts (ORFs) dont les produits correspondent aux protéines de fixation de l'ATP. Les gènes *oppDFBCA* sont organisés en opéron avec le gène *pepO* et codent pour les cinq composants du transporteur. La protéine OppA est extracellulaire et lie l'oligopeptide à transporter, OppB et OppC sont des protéines intra-membranaires responsables de la translocation du peptide, alors que OppD et OppF, qui sont intracellulaires, sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP fournissant ainsi l'énergie au transport (Charbonnel *et al.*, 2004).

La spécificité du transport est régie par la protéine OppA qui lie spécifiquement et emprisonne les 6 premiers résidus du peptide transporteur alors que les autres interagissent avec la surface de la protéine (Detmers *et al.*, 2000).

L'affinité de ce système est optimale pour les peptides contenant des résidus basiques et hydrophobes, alors que le transport des peptides acides de taille importante est impossible (Juillard *et al.*, 1996).

#### **1.8.2.4. Les peptidases**

La consommation des peptides par les bactéries lactiques dépend, dans un premier temps, de la spécificité des systèmes de transport qui vont les internaliser. Ces peptides seront ensuite hydrolysés par un ensemble de peptidases intracellulaires dépendant de la souche bactérienne.

Une nomenclature a été proposée pour les peptidases, elles sont nommées Pep lorsque le gène correspondant a été caractérisé, suivie d'une lettre capitale indiquant soit la spécificité de l'enzyme ou l'origine bactérienne, par exemple PepS (pour Streptocoques), PepN (pour indiquer la spécificité de l'enzyme) (Tan *et al.*, 1993).

#### **1.8.2.4.1. Classification et propriétés des peptidases**

En général, les peptidases des bactéries lactiques peuvent être classées selon la position de la liaison peptidique hydrolysée en endopeptidases ou exopeptidases. Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à l'intérieur de l'oligopeptide. Sur la base de leur spécificité, on distingue les endopeptidases générales dont la spécificité est large (PepN, PepC, PepV et PepD) et les endopeptidases spécifiques dont la spécificité de substrat est plus étroite (PepS, PepL, PepG, PepW et PepT) voire spécifique d'un acide aminé comme de la proline (PepX, PepI, PepQ et PepR) ou des acides aminés acides (PepA). Par contre, les exopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques à partir des extrémités amino (N)- ou carboxy (C-) terminales des chaînes polypeptidiques et sont donc classées en aminopeptidases et carboxypeptidases (Gagnaire *et al.*, 2001).

D'autres peptidases ont plus de spécificité de substrat telles que : PepA qui libère les acides aminés acides à partir des peptides de trois à neuf résidus ; PepP, qui préfère les tripeptides contenant une proline au milieu ; PepR et PepI, qui agissent sur les dipeptides avec une proline en première position ; PepQ, qui dégrade les dipeptides à proline en deuxième position ; et PepS, qui montre une préférence pour les peptides contenant deux à cinq résidus avec une arginine ou des acides aminés aromatiques en position N-terminale (Kunji *et al.*, 1996 ; Christensen *et al.*, 1999 ; Fernandez-Espla et Rul, 1999).

Les enzymes appartenant à ce groupe sont généralement des métalloenzymes inhibées par l'EDTA, cependant certaines peptidases isolées chez le genre *Lactobacillus* montrent une sensibilité à d'autres agents tels que le paraméthylsulfonate (PMSF) et le phénanthroline. L'activité des peptidases de type N est liée à la présence de cations métalliques divalents ; le cation  $Zn^{+2}$  est le plus fréquemment associé à ces enzymes (Magboul et Mc Sweeney, 1999).

La plupart des peptidases isolées des lactocoques ont également été décrites chez les lactobacilles (Christensen *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2003) à l'exception des peptidases PepA et PepP ou aminopeptidase P (Sridhar *et al.*, 2003).

Différentes localisations ont été décrites pour ce type d'enzymes, elles sont généralement intracellulaires ou membranaires (**Atlan *et al.*, 1990**). Les voies d'utilisation des peptides dérivés des caséines sont des événements intracellulaires, et sont assurées par les peptidases dans le cytoplasme dont la localisation intracellulaire a été confirmée (**Kunji *et al.*, 1996 ; Christensen *et al.*, 1999**).

Toutes les données biochimiques, génétiques et immunologiques aboutissent à une localisation intracellulaire des peptidases. De plus, leur instabilité très élevée conduit à leur dénaturation lors de leur relargage dans le milieu extracellulaire. (**Monnet *et al.*, 1994**).

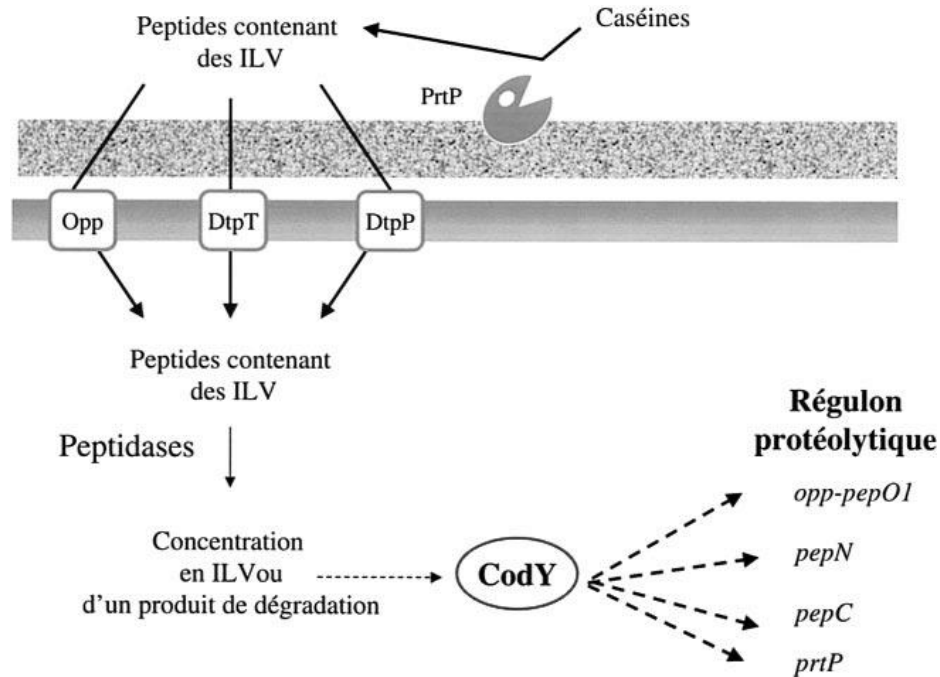
#### **1.8.2.4.2. Intérêt technologique des peptidases**

Outre leur rôle dans la nutrition azotée, les peptidases des bactéries lactiques permettent l'hydrolyse des peptides amers dans les fromages et la libération d'acides aminés et peptides précurseurs de composés d'arômes (**Monnet *et al.*, 1993 ; Jakob et Piccinali, 2006**). Les peptidases PepN, PepT et PepX ont été rapportées les plus importantes dans le processus de l'affinage du fromage. PepN intervient dans le développement de la flaveur et la diminution de l'amertume (**Guldfeldt *et al.*, 2001**).

#### **1.8.3. La régulation du système protéolytique**

Les conditions nutritionnelles des bactéries sont susceptibles d'être modifiées brusquement et cela à tout instant. Ces micro-organismes, en modulant et/ou modifiant leur métabolisme, et notamment leur synthèse protéique, sont capables de s'adapter aux variations du milieu extérieur. Alors, la composition du milieu de croissance et les conditions de la culture peuvent modifier l'activité protéolytique totale ou activer/inhiber une activité protéasique ou peptidasique donnée. La transcription des gènes *prtP* est influencée par la composition du milieu, la production de la protéine PrtP est induite par la présence de caséine dans le milieu et est réprimée par une concentration élevée de peptides (**Herbert *et al.*, 2000**). Il a été démontré chez *L. lactis*, que l'expression des gènes de plusieurs peptidases (PepX, PepN, PepC), de la protéase de paroi PrtP ainsi que de l'opéron Opp-PepO était dépendant du contenu en peptides du milieu de culture, ces gènes sont réprimés par des dipeptides contenant des acides aminés à chaîne latérale ramifiée (valine, isoleucine et leucine) (**Figure 8**). Après leur internalisation et leur hydrolyse, ces dipeptides exercent leur effet répresseur. En effet, les mutants *pepQ* incapables de dégrader les dipeptides de type X-Pro, ne présentent

plus de signal de répression en présence des peptides Leu-Pro et ValPro (**Guedon et al., 2001b**).



**Figure 8** : Modèle présentant la régulation de l'expression de certains gènes du régulon protéolytique de *Lc. lactis* (**Guédon et al., 2001a et b**).

La protéine CodY est un régulateur transcriptionnel qui possède un motif de fixation à l'ADN hélice-tour-hélice dans sa région C-terminale. Il a été démontré qu'elle interagissait directement avec la région promotrice de l'opéron *opp-pepO* pour exercer son action répressive (**Den Hengst et al., 2005b**). Des analyses transcriptomiques du mutant *codY* - de *L. lactis* ont démontré que ce régulateur agissait sur l'expression de nombreux gènes, principalement ceux impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés.

Le régulon CodY permet donc d'adapter la synthèse de nombreuses protéines en fonction de la disponibilité en nutriments azotés. Dans ce contexte, la fixation d'acides aminés à chaîne latérale ramifiée sur CodY, serait perçue comme un indicateur d'une concentration en acides aminés suffisante pour la croissance, induisant la répression des gènes du régulon dont l'activité n'est plus requise. Il est intéressant de constater que les systèmes Opp et Opt sont tous deux régulés par CodY (**Den Hengst et al., 2005a; Guedon et al., 2005**). Chez un mutant *codY*, les activités peptidolytique et protéolytique ne sont plus réprimées par les peptides issus des caséines. Ces souches pourraient être un avantage lors de la fabrication fromagère. L'augmentation des activités peptidolytiques et protéolytiques d'une

souche pourrait permettre d'améliorer l'affinage de certains fromages et ainsi de modifier leur saveur et leur flaveur (**Guedon et al., 2001a**).

### **1.9. Intérêt de l'activité protéolytique des bactéries lactiques**

Le système protéolytique joue un rôle clé dans la fermentation du lait et permet l'obtention d'acides aminés à partir des caséines, les protéines les plus abondantes dans le lait. Les bactéries lactiques provoquent une augmentation des protéines solubles dans le milieu et l'apparition de peptides et d'acides aminés qui outre le fait qu'ils stimulent la croissance des microorganismes, interviennent dans la formation de certains composés aromatiques (**Savijoki et al., 2006**). Ce microorganisme est responsable d'une activité protéolytique qui est le phénomène dominant lors de l'affinage et qui contribue dans l'apparition des courts peptides et acides aminés, précurseurs de nombreuses molécules riches en arômes et en saveurs.

Or la dégradation de la caséine durant ce processus participe également à la modification de la texture et la flaveur des fromages. A ce stade les aminopeptidases ont l'activité la plus forte en hydrolysant pratiquement la totalité des courts peptides hydrophobes responsables de l'apparition du goût des fromages (**Desmazeaud, 1998**). Une fraction de ces peptides est susceptible d'exercer des effets désirables chez le consommateur après l'ingestion de ce lait fermenté. Ces peptides sont désignés peptides fonctionnels ou encore peptides bioactifs. Il y a quatre domaines principaux dans lesquels l'effet observé lors de la consommation des produits laitiers, peut être attribué à ces peptides, qui sont respectivement, le système digestif, les défenses de l'organisme, le système cardio-vasculaire et le système nerveux (**Tomé, 1998**).

Certains *Lactobacillus*, notamment *Lb. curvatus* et *Lb. plantarum* sont dotés des enzymes leucine et valine amino-peptidases, contribuant ainsi à la formation de la flaveur du produit par les acides aminés et les petits peptides produits.

De nombreux travaux ont été réalisés pour l'élaboration des gammes de produits hypoallergéniques à base de lait de vache qui représentent une part importante dans les allergies alimentaires, en augmentant l'hydrolyse des protéines du lait de vache en utilisant les systèmes protéolytiques des bactéries lactiques.



### **1.10. Peptides générés par la caséinolyse et leurs activités biologiques**

Les peptides présentent des compositions en acides aminés, des propriétés physicochimiques, des séquences ou des structures particulières qui permettent un éventail très large de fonctionnalités qui vont intéresser divers secteurs d'applications industrielles. La composition en acides aminés et la digestibilité de certains hydrolysats ou de fractions peptidiques vont conférer d'excellentes propriétés nutritionnelles avec des applications dans le secteur de l'alimentation, voire de la santé. Les propriétés physico-chimiques des peptides dues à la variété de fonctions chimiques des chaînes latérales exposées sont à l'origine des propriétés de texturation de produits agroalimentaires (propriétés dites fonctionnelles) ou cosmétiques. Enfin, les activités biologiques portées par de nombreux peptides permettent d'envisager des applications dans le secteur de la santé ou des nutraceutiques.

Les peptides bioactifs sont des séquences protéiques de deux à vingt acides aminés, inactives au sein des molécules précurseurs, mais qui présentent des activités régulatrices des fonctions biologiques après leur libération (**Autelitano *et al.*, 2006**).

A ce jour, les protéines laitières constituent la source la mieux caractérisée de tels peptides. Les effets de ces peptides ont fait l'objet d'études cliniques, à l'origine de l'apparition récente sur le marché européen de produits tels qu'un lait fermenté à activité antihypertensive (*Evolus, Valio Ltd, Finlande*) ou un hydrolysat de caséines à activité anxiolytique (*LactiumTM, Ingredia, France*) (**Seppo *et al.*, 2003**). Outre le développement de ces produits innovants, la présence naturelle de peptides bioactifs dans des produits laitiers traditionnels comme les fromages a été mise en évidence (**Saito *et al.*, 2000; Meisel *et al.*, 2003 ; Rizzello *et al.*, 2005; Büetikofer *et al.*, 2007**). Or, des données convergentes indiquent que parmi les protéines laitières, les caséines constituent probablement la source potentielle la plus intéressante de peptides bioactifs (**Dziuba *et al.*, 2003 ; Sofia *et al.*, 2005**).

Les peptides bioactifs sont présents dans les caséines de toutes les espèces laitières (vache, bufflesse, chèvre, brebis, chamelle, humain) y compris dans celles du lait humain. Ils sont généralement formés de 2 à 20 acides aminés, mais des peptides bioactifs de plus longue taille tel que le glyco-caséinomacropéptide (GMP, séquence 106-169 de la caséine  $\kappa$ ) de 64 acides aminés existent également (**Ayyash *et al.*, 2017**).



Les différentes formes de caséines ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ) constituent des produits intermédiaires pour l'obtention de dérivés à haute valeur ajoutée. Au niveau de la caséine  $\beta$ , 4 groupes de fragments peptidiques, ont été reconnus comme ayant des activités biologiques :

- Trois segments comportant des résidus phosphorylés agissent comme vecteur de minéraux (**Dimitrov, 2009**).
- Le segment appelé  $\beta$ -casomorphine, riche en proline, ayant une activité morphinomimétique.
- Le segment 177-183 ayant une activité anti- hypertensive par action antagoniste de l'angiotensine (**Wakai et Yamamoto, 2012**).
- Trois segments présentant un rôle d'immuno-modulateur (**Leblanc et al., 2004**).

Au niveau de la caséine  $\kappa$ , des peptides issus du glycomacropéptide ont des activités anti-thrombotiques et anti-gastriques.

Au niveau de la caséine  $\alpha$ , une activité opiacée ( $\alpha$ -casomorphine) et une autre activité immuno-modulatrice ont été mises en évidence (**Mahaut et al., 2000**).

Un certain nombre de bases de données répertorient les peptides d'origine laitière dont la base libre d'accès BIOPEP [www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep](http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep).

La libération des peptides bioactifs dérivés du lait se fait lors du passage des aliments au niveau de l'appareil gastro-intestinal, une fois assimilés par l'organisme, des bénéfices biologiques s'opèrent. (**Léonil, 2013 ; De castro et al., 2015 ; Ayyash et al., 2017**).

Les peptides bioactifs agissent sur différentes cibles physiologiques et peuvent moduler des mécanismes reliés à de grandes fonctions de l'organisme. Les domaines d'action des peptides bioactifs issus des caséines sont les systèmes nerveux, cardiovasculaires, immunitaires et digestifs (**Silva et Malacata, 2005**). Ils présentent ainsi un profil d'activité large.

#### **1.10.1. Peptides à activité antihypertensive**

L'hypertension artérielle est un problème de santé publique qui affecte environ 25% de la population adulte dans le monde et devrait atteindre 29% de la population d'ici 2025, soit un total de 1,56 milliard de personnes (**Ngo et al., 2015**). En Algérie, selon les dernières

statistiques communiquées et rendues publiques par la société algérienne d'hypertension artérielle (**SAHA, 2014**), 35% des algériens âgés de plus de 20 ans souffrent d'hypertension. Bien qu'il s'agisse d'une maladie contrôlable, l'hypertension est associée à plusieurs maladies cardiovasculaires.

Le système rénine-angiotensine participe à la régulation de la pression artérielle. La rénine agit sur l'angiotensinogène et libère l'angiotensine I qui est transformée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II, un peptide vasoconstricteur augmentant la pression artérielle. L'ECA hydrolyse également la bradykinine, un peptide vasorelaxant, et le rend inactif (**Alemán et al., 2011**).

Des peptides inhibiteurs de l'ECA issus des caséines, les casokinines, sont générés par hydrolyse de la CN- $\alpha_{s1}$ , de la CN- $\beta$  et de la CN- $\alpha_{s2}$  bovines (**Maruyama et Suzuki, 1982 ; Maruyama et al., 1987 ; Schlimme et Meisel, 1995; Maeno et al., 1996 ; Meisel et Schlimme, 1997; Tauzin et al., 2002**). D'autres séquences ont été mises en évidence dans les structures primaires des CN- $\alpha_{s1}$  et CN- $\kappa$  humaines et pourraient présenter une activité inhibitrice de l'ECA une fois les peptides correspondants libérés (**Kohmura et al., 1990 ; Shah, 2000**). L'hydrolyse des caséines humaines par la pepsine et la pancréatine a permis d'identifier un peptide de la CN- $\beta$ , HLPLP ([125-129]), qui a une forte activité inhibitrice de l'ECA (IC<sub>50</sub>= 21  $\mu$ M) (**Hernandez-Ledesma et al., 2007**). Des peptides inhibiteurs de l'ECA ont été mis en évidence dans certains fromages comme le parmesan, le gouda ou le gorgonzola (**Hernandez-Ledesma et al., 2014 ; De Castro et al., 2015 ; Ibrahim et al., 2017 ; Sánchez et Vázquez, 2017**).

### **1.10.2. Peptides à activité antithrombotique**

Les mécanismes impliqués dans la coagulation du lait par l'action de la chymosine sur la CN- $\kappa$  et dans la coagulation du sang par l'action de la thrombine sur le fibrinogène présentent des similitudes. Les casoplatélines, fragments CN- $\kappa$  (f106-116), CN- $\kappa$  (f106-112), CN- $\kappa$  (f113-116) sont des peptides inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Ils empêchent la fixation de la chaîne  $\gamma$  du fibrinogène sur son récepteur spécifique localisé à la surface des plaquettes. En limitant le risque de thrombose, ces peptides pourraient réduire le risque d'accidents vasculaires cérébraux (**Jollès et Henschen, 1982 ; Fiat et al., 1993**).

### 1.10.3. Peptides à activité antimicrobienne

Les casécidines sont issues de l'hydrolyse par la chymosine des caséines du lait bovin après chauffage. Il s'agit de peptides polycationiques de faible masse moléculaire, elles font partie des peptides antimicrobiens les plus purifiés actuellement et elles montrent une activité *in-vitro* contre *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (**Lahov et Regelson, 1996**). La casocidine-I est un peptide cationique issu de la CN- $\alpha_{s2}$  bovine (CN- $\alpha_{s2}$ -[165- 203]), ce peptide inhibe la croissance d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus carnosus* (**Zucht et al., 1995**). Un autre peptide antibactérien (bactériostatique) issu de l'hydrolyse de la CN- $\alpha_{s2}$  bovine (CN- $\alpha_{s2}$ -[f183-207]), appelé Cp2, est actif contre *Escherichia coli* (**Recio et Visser, 1999 ; McCann et al., 2006**). L'isracidine (CN- $\alpha_{s1}$ -[1-23]), appelé Cp1, issu de l'hydrolyse de la CN- $\alpha_{s1}$  bovine par la chymosine et la chymotrypsine protège les souris contre *Staphylococcus aureus* après injection par voie sous-cutanée et contre *Candida albicans* après injection par voie intraveineuse mais protège également les brebis et les vaches contre les mammites quand il est injecté dans la mamelle à des niveaux comparables à ceux utilisés lors d'un traitement antibiotique standard (**Lahov et Regelson, 1996**). Un autre peptide issu de l'hydrolyse de la CN- $\alpha_{s1}$  (CN- $\alpha_{s1}$ -[99-109]) a été identifié après hydrolyse de caséinate de sodium bovin par des enzymes du tractus gastro-intestinal (pepsine, trypsine,  $\alpha$ -chymotrypsine). Ce peptide a une action bactériostatique contre les bactéries Gram+ et les bactéries Gram- (**McCann et al., 2006**).

### 1.10.4. Peptides à activité antioxydante

Les antioxydants sont largement utilisés comme additifs par l'industrie alimentaire pour empêcher ou retarder l'altération des aliments, en inhibant notamment l'oxydation lipidique. Parallèlement, leur rôle préventif vis-à-vis du stress oxydatif a fait l'objet de nombreuses études, dans le but de freiner l'apparition de maladies graves comme certains cancers, maladies cardiovasculaires ou maladies dégénératives liées au vieillissement. Les problèmes de sécurité liés à l'utilisation d'antioxydants de synthèse, tout comme la préférence du consommateur pour des produits d'origine naturelle, amène à rechercher des peptides d'origine alimentaire aux propriétés antioxydantes. C'est le cas des peptides antioxydants du lait qui, à faible concentration, peuvent retarder ou inhiber l'oxydation d'un substrat et protéger l'organisme contre les dommages causés par les radicaux libres (**Hernández-Ledesma et al., 2014 ; Ibrahim et al., 2018**).

Les caséinophosphopeptides (CPP) ont une activité antioxydante primaire par piégeage de radicaux libres OH (via les résidus Lys, His, Pro et Tyr) mais également une activité antioxydante secondaire due à la chélation de métaux pro-oxydants (**Díaz et Decker, 2004 ; Kitts et Nakamura, 2006**). La présence de CPP dans le tractus gastro-intestinal mise en évidence après la digestion de produits laitiers par les enzymes digestives pourrait avoir un effet bénéfique pour la santé en contribuant à la réduction du stress oxydatif intestinal et au maintien du bon fonctionnement de l'intestin (**Kitts, 2005**).

#### **1.10.5. Peptides à activité antidiabétique**

Le diabète de type 2 est un trouble métabolique chronique considéré comme l'un des principaux problèmes de santé mondiaux en raison de son incidence et de sa prévalence croissantes. La prévalence mondiale du diabète chez les adultes de plus de 18 ans est passée de 4,7% en 1980 à 8,5% en 2014. Les statistiques de l'OMS estiment que le nombre de cas à l'échelle mondiale atteindra la barre de 366 millions à l'horizon 2030 (**OMS, 2016**). En Algérie, le nombre des diabétiques a doublé en l'espace de 15 ans, selon le ministère de la santé. En 2004, la prévalence de cette maladie chronique a été estimée à 8,9% chez la population âgée de 25 à 64 ans. Elle est passée à 14,4% en 2017 chez la population âgée de 18 à 69 ans.

Lors de l'ingestion de nourriture, les cellules K et L de l'intestin grêle libèrent les hormones peptidiques gastric inhibitory peptide (GIP) et glucagon like peptide (GLP-1), respectivement. Le GIP et le GLP-1 favorisent la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  du pancréas, ce qui favorise l'absorption du glucose par les cellules insulino-dépendantes telles que les myocytes (cellules musculaires). Le GLP-1 diminue la sécrétion du glucagon par les cellules  $\alpha$  du pancréas, ce qui réduit la glyconéogenèse au niveau du foie. Ainsi, ces hormones favorisent la diminution de la glycémie. Cependant, l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) clive et désactive le GIP et le GLP-1, ce qui réduit la biodisponibilité de ces hormones. Les inhibiteurs de DPP-IV réduisent son activité et augmentent la demi-vie du GIP et du GLP-1, ce qui favorise les activités hypoglycémiantes de ces deux hormones (**Pro et al., 2004 ; Wesley et al., 2005 ; Masur et al., 2006 ; Rohrborn et al., 2015 ; Bastien, 2017**). De nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme DPP-IV naturels provenant de l'hydrolyse de protéines alimentaires, comme les caséines (**Lacroix et al., 2012a ; Mirmiran et al., 2017**), ont été rapportés dans la littérature. Les peptides inhibiteurs de la DPP-IV sont apparus

comme des agents oraux nouveaux et prometteurs pour le traitement du diabète du type 2 (Silveira *et al.*, 2013). Les inhibiteurs de la DPP-IV sont une nouvelle classe de médicaments anti-diabète (Barnett *et al.*, 2006). La plupart des études ont montré un effet bénéfique des hydrolysats de caséines sur la réduction du glucose sérique chez les sujets diabétiques du type 2 (Manders *et al.*, 2006; Geerts *et al.*, 2011; Manders *et al.*, 2014).

#### **1.10.6. Peptides à activité opiacée**

Des peptides ayant une activité opiacée ont été identifiés dans plusieurs fractions de caséines hydrolysées par des enzymes du tractus digestif. Ces peptides sont des ligands pour les récepteurs opiacés et ont une activité agoniste ou antagoniste. Ces récepteurs opiacés (types  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ ) ont généralement un rôle dans les systèmes immunitaires, nerveux et endocrinien mais également au niveau du tractus gastro-intestinal des mammifères. Des ligands endogènes ou des ligands exogènes agonistes ou antagonistes peuvent interagir avec ces récepteurs (Teschemacher, 2003).

L'administration orale de peptides opiacés pourrait moduler le phénomène d'absorption intestinale et influencer la fonction gastro-intestinale de deux façons : en stimulant les muscles lisses ce qui réduit la durée du transit intestinal, en affectant le transport intestinal des électrolytes ce qui explique les propriétés anti-sécrétoires de ces peptides (Phelan *et al.*, 2009; Léonil, 2013).

Des peptides opiacés issus de la CN- $\beta$ , appelés  $\beta$ -casomorphines, ainsi que leurs précurseurs ont été détectés dans le chyme duodénal de cochon nain (Meisel et Frister, 1989), dans le plasma de nouveaux-nés (Umbach *et al.*, 1985) et dans l'intestin grêle d'adultes humains (Svedberg *et al.*, 1985) après l'ingestion orale de caséines ou de lait. Chez les mammifères adultes, de la  $\beta$ -casomorphine a été retrouvée dans le plasma de femmes enceintes ou postpartum, cependant aucun peptide n'est détecté dans le plasma chez l'homme ou la femme non-enceinte (Koch *et al.*, 1988). L'hydrolyse des CN- $\alpha_{s1}$ , CN- $\kappa$  et CN- $\gamma$  produit également des peptides opiacés (Perpetuo *et al.*, 2003). Des peptides opiacés, appelés casoxines, exercent une activité antagoniste en supprimant l'activité agoniste de l'enképhaline (Yoshikawa *et al.*, 1994). Les casoxines A et B sont issues de CN- $\kappa$  bovine et humaine, la casoxine C dérive de la CN- $\kappa$  bovine (Chiba *et al.*, 1989) tandis que la casoxine D est issue de la CN- $\alpha_{s1}$  humaine (Yoshikawa *et al.*, 1994).

### 1.11. Méthodes d'obtention de peptides bioactifs

La voie de production de ces peptides la plus commune est la protéolyse des caséines par une ou plusieurs enzymes digestives (telles que la pepsine ou la trypsine ; **Korhonen et Pihlanto, 2006**). De nombreux peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) sont obtenus par ce procédé d'hydrolyse (**FitzGerald et al., 2004 ; Gobbetti et al., 2004 ; Vermeirssen et al., 2004**). D'autres enzymes, d'origine végétale, microbienne, ou combinaisons d'enzymes (pepsine, trypsine, chymotrypsine, thermolysine) sont également employées (**Korhonen et Pihlanto, 2003**).

La voie fermentaire est une autre voie de production des peptides bioactifs. Certaines bactéries lactiques telles que *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* génèrent ces peptides à partir de protéines laitières lors des processus de fermentation grâce à leurs protéases membranaires ou intracellulaires (**Christensen et al., 1999**) (Tableau 4).

**Tableau 4** : Peptides bioactifs libérés par certains micro-organismes et enzymes bactériennes à partir des caséines (**Korhonen et Pihlanto, 2006**).

Bactéries/levures	Protéines précurseurs	Séquences peptidiques et peptides	Activités
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Caséines $\beta$ et $\kappa$	VPP,	Inhibiteur de l'ECA
		IPP	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Dérives de CN $\beta$	anti hypertensive
		IPP	
		Dérives de CN $\kappa$	
Enzyme De <i>Lactobacillus GG</i> + pepsine et trypsine	Caséines $\beta$ et $\alpha_{s1}$	1-YPFP 2-AVPYPQR 3-TTMPLW	1-opiacé 2-inhibiteur de l'ECA 3-immuno-stimulant
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus</i> IFO 13953	Caséines $\kappa$	ARHPHPLSFM	antioxydant
<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Subsp lactis</i> <i>biovar diacetylactis</i>	Caséines $\beta$	SKVYP	inhibiteur de l'ECA

ECA : enzyme de conversation de l'angiotensine

Divers types de peptides bioactifs ont été trouvés dans les produits laitiers fermentés (**Fitzgerald et Meisel, 2004; Silva et Malcata, 2005**). Le système protéolytique des bactéries lactiques est la voie principale pour générer des peptides bioactifs au cours de la fermentation du lait et la maturation du fromage.

Les bactéries lactiques possèdent des modèles variables de protéinases, de peptidases et de systèmes de transport de peptides qui affectent la libération et l'ingestion de peptides bioactifs dans le lait d'une manière spécifique à l'espèce et à la souche (**Liu et al., 2010**). Les protéases de la paroi cellulaire dégradent les protéines dans les milieux de croissance en peptides d'environ 5-30 acides aminés qui sont transportés dans la cellule et en outre hydrolysés par les endopeptidases en peptides plus petits et acides aminés pour la synthèse protéique microbienne. Les endopeptidases PepI, PepP, PepQ, PepR, et PepX ont des activités hydrolytiques spécifiques de la proline qui compte pour la libération principale de peptides bioactifs à partir des caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  riches en proline (**Settanni et Moschetti, 2010**).

Le rôle de lactobacilles starter dans la libération de peptides bioactifs pendant la fermentation du lait est bien documenté (**Gobbetti et al., 2004; Fitzgerald et Murray, 2006**). Parmi les bactéries lactique non-starter les souches *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* ont été largement étudiées pour leur activité protéolytique et spécifique dans le lait qui entraîne la libération de plus grandes quantités de peptides actifs par rapport aux autres lactobacilles (**Sadat-Mekmene et al., 2011**).

### **1.12. Fractionnement, purification et identification des peptides bioactifs**

Les techniques chromatographiques sont parmi les plus utilisées pour la purification et l'identification des peptides bioactifs, telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie liquide à ultra haute pression. (UHPLC) (**Singh et al., 2014**). UHPLC a montré un grand potentiel dans la séparation de peptides bioactifs. Les principaux avantages de cette méthode comprennent l'augmentation du débit, la résolution et la sensibilité. La phase inverse de HPLC (RP-HPLC) peut être utilisée pour séparer les peptides par hydrophobicité (**Pownall et al., 2010**). La chromatographie liquide à interaction hydrophile (HILIC) s'est avérée être une méthode utile pour la séparation des substances hydrophiles. Cette méthode est basée sur l'augmentation de la rétention avec une augmentation de la polarité de la phase stationnaire et des solutés et la diminution de la



polarité du système de solvant à prédominance organique utilisée pour l'élution (**Yoshida, 2004**).

**Maux *et al.*, (2015)** ont rapporté que la méthode HLIC est un outil précieux pour améliorer la séparation des peptides courts et la différenciation des peptides avec des séquences homologues par spectrométrie de masse.

Des techniques d'électrophorèse sur gel et d'ultrafiltration ont également été utilisées comme méthodes auxiliaires pour l'analyse de la composition chimique et structurale de peptides (**Roblet *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2014**).

La spectrométrie de masse a considérablement amélioré le processus d'identification des séquences peptidiques et l'étude des profils protéiques et des produits d'hydrolyse. En particulier, des interfaces ont été développées pour permettre aux ions d'être générés à partir de molécules d'analyte sensibles à la température et / ou ne sont pas très volatiles (**Contreras *et al.*, 2008**).

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est couramment utilisée pour identifier les séquences peptidiques (**Chiaradia *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014**).

De plus, une approche intéressante a été proposée par **Maux *et al.*, (2015)**. Ces auteurs ont affirmé que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS / MS) fournit les données nécessaires pour le séquençage des peptides. Cependant, bien que cette stratégie ait été utilisée pour des peptides plus longs, l'identification de peptides courts peut être plus difficile, en raison de la présence de peptides avec la même composition en acides aminés mais avec différentes séquences. La méthode HLIC-MS / MS pourrait être un outil précieux pour améliorer la séparation des peptides courts et la différenciation des peptides avec séquences homologues (**De Castro *et al.*, 2015**).

### **1.13. Applications commerciales des peptides bioactifs**

Des aliments enrichis en peptides bioactifs pourraient être utilisés dans la prévention de pathologies ou en complément d'un traitement médicamenteux. Des produits laitiers contenant des peptides bioactifs pour lesquels des effets bénéfiques pour la santé sont



revendiqués sont commercialisés dans de nombreux pays. Des exemples de ces produits sont énumérés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5 : Ingrédients et produits laitiers commercialisés ayant des effets revendiqués sur la santé basés sur des peptides bioactifs issus du lait (d'après Korhonen et Pihlanto, 2006).**

Nom de marque	Type de produit	Bioactifs peptides fonctionnels	Allégation revendiquée	Producteurs
Calpis	Lait fermenté	VPP Ipp Derive de CN $\beta$ Ipp Derive de CN $\kappa$	Réduction de la pression artérielle	Calpis co. ; Japan
Evolus	Lait fermenté enrichi en calcium	VPP Ipp Dérivé de CN $\beta$ Ipp Dérivé de CN $\kappa$	Réduction de la pression artérielle	Valio oy, Finlande
Biozate	Hydrolysats de protéines du lactosérum	Fragment de $\beta$ -lactoglobuline	Réduction de la pression artérielle	Davisco, Etats- unis
BIOPURE-GMP	Hydrolysats de CN $\kappa$	CN $\kappa$ (f106-169) glycomaclopeptide	Prévient les caries, protège contre les infections virales et bactériennes	Davisco, Etats- unis
Lactium	Hydrolysats de CN $\alpha_{s1}$	CN $\alpha_{s1}$ (f91-100)	Réduits les effets tensionels du stress	Ingredia, France
Festivo	Fromage	CN $\alpha_{s1}$ (f1-9) CN $\alpha_{s1}$ (f1-7) CN $\alpha_{s1}$ (f1-6)	Réduction de la pression artérielle	MTT Agrifood research Finlande
Cystéine peptide	Hydrolysats	Peptides dérivés de protéines du lait	Energisant et aide au sommeil	DMV international Pays-bas
C 12	Hydrolysats	Peptides dérivés de la caséine	Réduction de la pression sanguine	DMV international pays-bas
capolac	Hydrolysats	Peptides dérivés de la caséine	Favorise l'absorption du calcium	ARLA Foods, ingrediets Suisse
peptopro	Hydrolysats	Peptides dérivés de la caséine	Améliore les performances athlétiques et capacité musculaire	DSM Foods, spécialités Pays-bas

\*Allégation approuvée par la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes).

Les peptides bioactifs ont suscité un intérêt croissant en tant que candidats de choix pour divers aliments fonctionnels favorisant la santé. Aujourd'hui, les protéines de lait sont la source la plus connue de ces ingrédients. Les techniques de nanofiltration et d'ultrafiltration sont maintenant employées industriellement pour produire des ingrédients qui contiennent des peptides bioactifs spécifiques à base de caséine ou d'hydrolysats de protéines de lactosérum. De telles préparations sont disponibles dans le commerce et sont introduites dans différents produits de consommation, tels que les boissons à base de produits laitiers et à base de fruits, confiseries, pastilles et gélules. De nouvelles technologies, telles que les techniques chromatographiques et de séparation par membrane, semblent fournir la meilleure technique disponible pour enrichir les fractions peptidiques actives à partir des hydrolysats de diverses protéines alimentaires avec une gamme de poids moléculaire spécifique (**Kitts et Weiler, 200; Korhonen et Pihlanto, 2007**).

La production de peptides bioactifs à partir de matières premières riches en protéines peut être étendue au niveau industriel en utilisant une fermentation contrôlée dans des bioréacteurs avec des bactéries lactiques connues. A cette fin, la technique des enzymes recombinées et des souches de production spécifiques ou des peptidases isolées à partir de microorganismes appropriés sont susceptibles d'être employées industriellement. En plus de l'hydrolyse enzymatique, la fermentation microbienne fournit une technique naturelle applicable à la production de peptides bioactifs. Le potentiel de cette approche est déjà bien démontré par la présence de peptides bioactifs dans les produits laitiers fermentés. La formation et la stabilité de tels peptides ne sont cependant pas contrôlées dans les produits laitiers traditionnels et, par conséquent, certains avantages pour la santé ne peuvent pas être garantis. De nouvelles techniques de fabrication telles que l'addition au lait fermenté des peptides bioactifs spécifiques concentrés à partir d'hydrolysats de protéines du lait semblent constituer une solution pratique (**Korhonen et Pihlanto, 2007**).

La stabilité des structures chimiques et l'activité biologique des peptides dans différentes matrices alimentaires et le devenir ultérieur au cours du processus de digestion doivent être pris en compte dans la formulation de produits contenant des peptides bioactifs. De nouvelles technologies telles que la nanoencapsulation peuvent offrir des solutions réalisables pour améliorer la stabilité des peptides dans divers produits alimentaires et pendant la digestion (**De Castro et al., 2015**).

## *2. Matériel et méthodes*

### **2.1. Souches bactériennes utilisées**

Les trois souches de bactéries lactiques utilisées dans ce travail font partie de la collection du laboratoire LBMB (Université Oran1). Elles sont issues de laits crus de chèvres collectés dans deux régions différentes du sud algérien, Tindouf pour *Lactobacillus brevis* CHTD27 et Illizi pour *Lactobacillus plantarum* BH14 et une souche *Lactococcus lactis* LCL issue de lait cru de vache. Ces souches ont été sélectionnées pour leur caractère protéolytique.

### **2.2. Milieux de culture**

En raison des exigences nutritionnelles des bactéries lactiques, il est nécessaire d'utiliser des milieux riches en nutriments indispensables pour leur croissance, pour cette raison, les milieux de culture utilisés sont le milieu MRS (**Man, Rogosa et Sharpe, 1960**), pH 5,7 pour les lactobacilles et le milieu M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**), pH 7,2 pour le lactocoque. Ces milieux sont utilisés sous forme liquide (bouillon) ou solide par addition de 1.5% d'agar, ils sont stérilisés par autoclavage à 1 bar de pression pendant 20 min à 120°C. La composition des milieux de culture utilisés dans ce travail est donnée en annexe 1.

Les ingrédients des milieux peuvent, si nécessaire, être dissous dans du tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M pH 7) pour obtenir un milieu de culture tamponné.

Pour l'étude du caractère protéolytique des souches, la poudre de lait écrémé (Régilait UCA, St-Martin, Belle-Roche, France) est reconstituée à 10% (w/v) dans de l'eau distillée et autoclavée à 120°C pendant 10 min. Le lait écrémé est stérilement ajouté aux milieux de culture liquides ou solides (2%).

### **2.3. Conditions de culture**

L'incubation des cultures bactériennes en milieux MRS et M17 est réalisée à l'étuve à 30°C sans agitation pendant 24 heures.

## **2.4. Vérification de la pureté des souches et leur appartenance au groupe des bactéries lactiques**

Les souches bactériennes conservées à -20°C sont ré-isolées sur milieux MRS ou M17 solides selon le genre par la technique des quadrants, et incubées à 30°C pendant 24 heures à 48 heures, suivies d'une étude des caractères macroscopiques (aspect et couleur des colonies) et microscopiques par coloration de Gram (forme, mode d'association, caractère Gram positif ou négatif). Le caractère catalase négatif des souches de bactéries lactiques est également recherché.

## **2.5. Conservation des souches pures**

Les bactéries en phase exponentielle peuvent être conservées à 4°C sur milieu solide incliné pendant une à deux semaines selon la souche. Des repiquages sont effectués périodiquement.

Pour des conservations à plus long terme, les bactéries sont conservées -20°C dans du lait écrémé stérile reconstitué (10%) ou dans leurs milieux de culture dilués par 20% de glycérol stérile.

## **2.6. Préparation des caséines à partir du lait cru**

La caséine est l'une des protéines que l'on retrouve en plus grande quantité dans le lait. Il existe plusieurs types de caséines ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ) qui précipitent au même pH (environ 4,6).

Les caséines des laits de chamelle (Hassi R'mel - Algérie) et de brebis (Mascara - Algérie) utilisées dans ce travail sont préparées au laboratoire par précipitation acide selon la méthode décrite par **Farah et Farah-Riesen, (1985)**. Le lait écrémé est acidifié (pH 4,6) avec une solution de HCl 1N et chauffé à 35°C pendant 20 min. Le précipité de caséine est récupéré par centrifugation (5000 x g pendant 10 min à 4°C), puis lavé deux fois et mis en suspension dans l'eau distillée (pH maintenu à 4,6). Le pH de la suspension de caséine est alors ajusté à 7 à l'aide d'une solution de NaOH 1N, puis de nouveau acidifié à 4,6 pour re-précipiter les caséines. L'opération est répétée 3 fois afin d'éliminer les protéines du lactosérum. Les préparations de caséine ainsi obtenues sont lyophilisées et conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation. Leur pureté a été vérifiée par électrophorèse SDS- PAGE comparativement à une caséine commerciale d'origine bovine (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France).

## **2.7. Confirmation de l'aptitude des bactéries à la protéolyse**

### **2.7.1. Recherche de l'activité protéolytique en milieu solide**

- **En milieu de culture additionné de lait MRS-lait et M17-lait**

Les cultures bactériennes ( $DO_{600} = 1$ ) ont étéensemencées en touches à la surface des milieux agar-MRS ou agar-M17 tamponnés et additionnés de 2% (v/v) de lait écrémé stérile selon la méthode décrite par **Van Den Berg *et al.*, (1993)**. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. L'activité protéolytique se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des touches, elle est évaluée par la mesure du rapport diamètre du halo (H) / diamètre de la colonie (C) (H/C).

- **En milieu Agar-lait (Milk-Agar ou M-A)**

Le milieu est constitué de gélose additionnée de 2 % (v/v) de lait écrémé stérile reconstitué. Les cultures bactériennes ( $DO_{600} = 1$ ) ont été déposées par touches à la surface de la gélose. Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les boîtes ont été placées à 4°C pendant trois jours pour révéler l'activité protéolytique (**Fransen *et al.*, 1997**).

### **2.7.2. Recherche des protéases dans le surnageant de culture**

#### **2.7.2.1. Préparation des surnageants de culture**

##### **2.7.2.1.1. En absence du lait**

Les bouillons MRS et M17 tamponnés ( $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$  0.1 M) ont été inoculés à 1% (v/v) avec les pré-cultures bactériennes fraîches ( $DO_{600nm} = 1$ ). Après incubation à 30°C pendant 48 heures, la phase claire (surnageant de culture) a été récupérée puis centrifugée à 4°C pendant 10 min à 10000 x g. Les surnageants ainsi obtenus représentent la fraction extracellulaire.

##### **2.7.2.1.2. En présence du lait**

Le test a été réalisé comme décrit précédemment, sauf que les bouillons de culture dans ce cas ont été additionnés stérilement de 2% (v/v) de lait écrémé reconstitué.

### **2.7.2.1.3. En présence de caséines**

Les pré-cultures bactériennes ( $DO_{600nm}=1$ ) ont été centrifugées, les culots cellulaires ont été lavés stérilement dans le tampon Tris-HCl (0,1 M, pH 7) puis mis en suspension dans un milieu de culture additionné de 1% (w/v) de caséines bovines commerciales (composition du milieu est donnée en annexe). Ces suspensions bactériennes ont servi à inoculer à 0,2% (v/v) le milieu de culture. Après incubation à 37°C au bain-marie pendant 48 heures, les surnageants de culture ont été récupérés par centrifugation à 4°C pendant 10 min à 10000 x g.

Les fractions obtenues (en absence et en présence du lait, en présence de caséines) par chacune des souches ont été testées pour leurs activités protéolytiques extracellulaires par la méthode de puits sur milieu agar-lait 1% (v/v) contenant 0.02% de l'azide de sodium  $NaN_3$ . L'activité des protéases extracellulaires a été révélée après 24 heures d'incubation à 37°C, elle se manifeste par l'apparition d'une clarification autour des puits. Les diamètres des halos clairs ont été mesurés puis rapportés au carré  $D^2$  (Chantawanackul *et al.*, 2002).

### **2.7.2.2. Extraction des protéases**

#### **2.7.2.2.1. Incubation des cellules en absence d'ions calcium**

Les milieux de culture inoculés (1%) par les pré-cultures bactériennes ( $DO_{600nm}=1$ ) ont été incubés à 30°C pendant 24 heures. Après incubation et centrifugation des cultures bactériennes, les culots bactériens ont été lavés deux fois dans le tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7) stérile contenant des ions calcium ( $CaCl_2$  50 mM). Les cellules reprises en suspension dans le même tampon mais en absence d'ions calcium, ont été de nouveau incubées à 37°C pendant 1 heure au bain-marie. Les surnageants de cultures ont été récupérés par centrifugation (10000 x g pendant 10 min à 4°C) puis testés pour l'activité protéasique sur gélose au lait 1%.

#### **2.7.2.2.2. Incubation des cellules en présence d'un chélateur d'ions EDTA 15 mM**

Les cellules ont été incubées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, après l'étape de lavage en présence d'ions calcium  $CaCl_2$ , les cellules ont été reprises en suspension dans le tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7) contenant 15 mM d'EDTA et ré-incubées au bain-marie à 37°C pendant 1 heure. Les surnageants récupérés par centrifugation ont été testés pour l'activité protéasique.

## **2.8. Techniques utilisées pour l'étude des protéases**

### **2.8.1. Précipitation des protéases au sulfate d'ammonium**

Cette méthode utilise la solubilité différentielle des protéines. Comme chaque protéine est plus ou moins soluble en solution selon sa composition, on peut en séparer plusieurs en fonction de leur tendance à précipiter plus ou moins vite quand on change la force ionique de la solution qui les contient.

Une force ionique élevée peut avoir deux effets sur la solubilité: neutraliser certaines charges ioniques requises en surface pour le maintien de la solubilité, et compétition avec les protéines pour les molécules d'eau disponibles en solution. Quand la concentration en sel est élevée, la protéine est privée des molécules d'eau qui l'hydratent et précipite.

Les protéases en solution ont été précipitées en ajoutant graduellement le sulfate d'ammonium cristallisé de manière à obtenir une saturation en sel de 80%. La précipitation a été effectuée à 4°C pendant 4 heures sous agitation modérée. Le précipité récupéré par centrifugation à 8000 x g pendant 20 minutes à 4°C a été repris en suspension dans un minimum de tampon Tris-HCl (0.1 M, pH 7). Les fractions enzymatiques ainsi obtenues ont été dialysées contre de l'eau distillée pour éliminer les molécules de sel. Les fractions dialysées ont été concentrées puis testées pour leur activité protéolytique par la méthode des puits sur milieu agar-lait.

### **2.8.2. Dialyse**

La dialyse est la technique la plus utilisée pour éliminer les sels d'une solution protéique, elle consiste à utiliser une membrane poreuse semi-perméable qui retient les macromolécules (protéines) alors que les particules de faible poids moléculaire (sels, eau) peuvent passer à travers ces membranes.

Les fractions protéiques ont été dialysées pour éliminer les sels contre de l'eau distillée pendant une nuit à 4°C sous agitation constante, le milieu de contre dialyse est changé régulièrement par intervalle de 30 minutes durant les trois premières heures puis laissé toute la nuit dans les mêmes conditions.



La dialyse a été également utilisée pour concentrer les fractions enzymatiques. Dans ce cas, la membrane de dialyse contenant les protéines en solution a été placée à 4°C dans un cristallisateur rempli de saccharose en cristaux, pendant un temps variable selon le volume de l'échantillon.

### **2.8.3. Dosages des protéines par la méthode de Bradford (1976)**

Cette technique permet de doser des microquantités de protéines solubles. Le principe de cette méthode développée par Bradford (1976) repose sur l'utilisation du bleu brillant de Coomassie G250. En milieu acide, les protéines forment avec le bleu de Coomassie G250 un complexe coloré présentant un maximum d'absorption à 595 nm. L'analyse des protéines est basée sur le changement de couleur en fonction de concentrations en protéines qui passe du brun orangé au bleu. Ainsi, plus il y a de protéines dans la solution, plus la coloration bleue est intense, et plus l'absorption à 595 nm est élevée. La correspondance entre la valeur de la D.O à 595 nm et la concentration en protéines de la solution est donnée par l'établissement d'une gamme d'étalonnage qui consiste à faire réagir le réactif de coloration avec des solutions de protéines (BSA) de concentrations connues et croissantes.

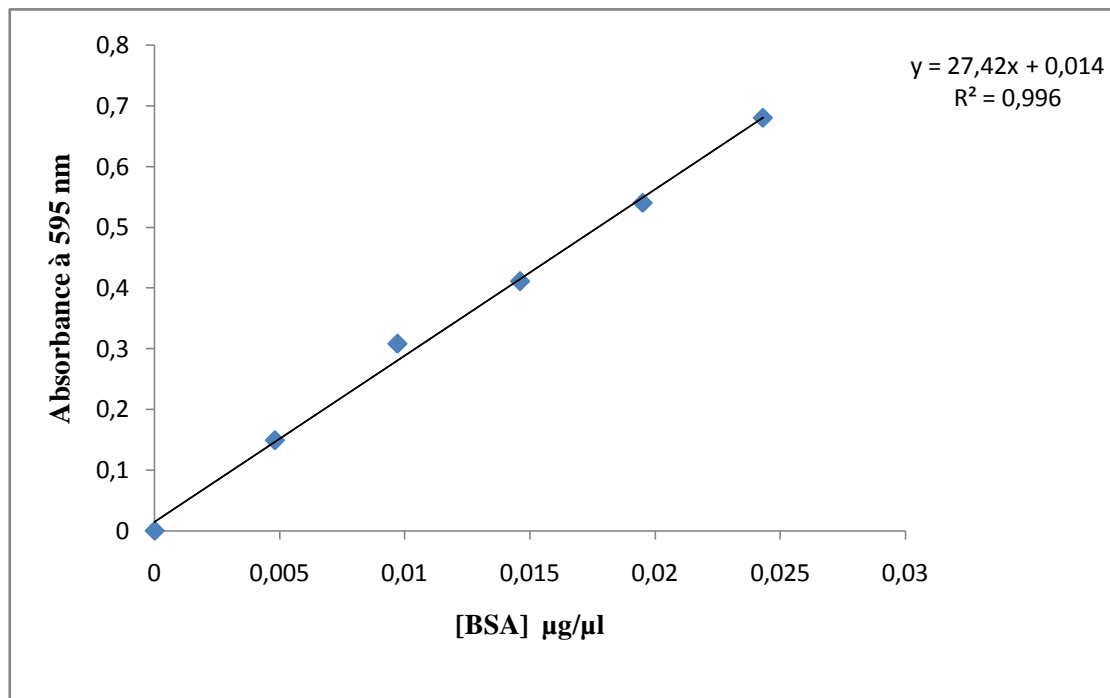
Nous avons utilisé cette méthode pour doser le contenu en protéines des fractions enzymatiques.

Le réactif de Bradford a été préparé avec 100 mg de bleu de Coomassie G250 (Merck) dissout dans 50 ml d'éthanol 96°, 100 ml d'acide phosphorique 85%, le mélange est ajusté à un litre avec de l'eau distillée. La concentration en protéines a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec des quantités croissantes d'albumine sérique bovine ou BSA (1 mg/ml d'eau distillée) allant de 10 à 50 µg diluées avec de l'eau distillée. Le volume final est égal à 50µl, 2ml de réactif sont ajoutés dans chaque tube, le **tableau 6** présente la préparation de la gamme étalon. Les tubes sont agités au vortex puis incubés à l'obscurité, à température ambiante pendant 15 min avant de procéder à la lecture de la densité optique à 595 nm. Ces valeurs permettent l'établissement d'une courbe étalon (**Figure 9**).

**Tableau 6 :** Préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des protéines totales.

Tube	1	2	3	4	5	6
BSA solution mère 1 mg/ml (µl)	0	10	20	30	40	50
Quantité de BSA (µg)	0	10	20	30	40	50
Eau distillée (µl)	50	40	30	20	10	0
Réactif de Bradford (ml)	2	2	2	2	2	2
Concentration de BSA (µg/µl)	0	0.0048	0.0097	0.0146	0.0195	0.0243

La concentration en protéines des échantillons étudiés est alors déterminée graphiquement sur la courbe étalon et la concentration de protéines est exprimée en µg de protéine / µl d'extrait enzymatique.



**Figure 9:** Courbe étalon établie avec la solution de BSA 1 mg/ml (méthode de Bradford).

## 2.9. Préparation des hydrolysats de caséines

### 2.9.1. Par les fractions enzymatiques

La fraction contenant les protéases ou la trypsine en solution (0,1 mg/ml) a été mélangée à volume égal avec le tampon Tris-HCL (0.1 M, pH 7) et les caséines en solution (2.5% w/v). Le mélange réactionnel a été incubé au bain marie à 37°C sous agitation

(150 rpm orbital shaker). L'hydrolyse des caséines par les protéases bactériennes et par la trypsine a été suivie à des temps variables (0h, 24 h et 48h).

La réaction d'hydrolyse a été stoppée par chauffage à 80°C pendant 15 min. Le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 15 min à 6000 x g et les surnageants ont été récupérés pour subir une analyse par électrophorèse SDS-PAGE, une identification des séquences peptidiques par RP-HPLC-MS/MS et une recherche d'activités biologiques.

Pour le dosage des produits d'hydrolyse, la réaction a été arrêtée par addition d'un volume d'une solution de TCA 15% (m/v) égal au volume du mélange réactionnel. Après 30 min à température ambiante, le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 15 min à 10.000 x g et les surnageants contenant les produits solubles dans le TCA sont récupérés et dosés par le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les hydrolysats obtenus ont été conservés à - 20°C jusqu'à leur caractérisation.

### **2.9.2. Hydrolyse acide des caséines**

L'hydrolyse acide des caséines (hydrolyse totale) par l'acide chlorhydrique permet de libérer tous les acides aminés qui constituent la protéine. Elle a été effectuée pour calculer le degré d'hydrolyse DH qui est un paramètre de caractérisation de l'hydrolyse des protéines.

0.5 g de caséines ont été hydrolysées par 50 ml d'une solution de HCL 6 M, la réaction a été réalisée à 110°C dans un montage à reflux relié à un réfrigérant sous agitation pendant une nuit, puis les hydrolysats acides des caséines ont été neutralisés par une solution de NaOH 4 N (**Baek et Cadwallader, 1995**).

Cette technique a été réalisée au niveau du laboratoire de synthèse organique appliquée (Département de chimie – Université Oran 1- Ahmed Ben Bella).

## 2.10. Evaluation de la protéolyse par méthodes biochimiques

### 2.10.1. Dosage des produits de dégradation

#### 2.10.1.1. Méthode de Folin et Ciocalteu (1927)

Nous avons utilisé cette technique pour quantifier l'activité enzymatique des protéases extracellulaires sur les caséines.

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ). Il est réduit par le noyau phénolique des acides aminés libres ou engagés dans les peptides, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

La coloration bleue produite permet un dosage colorimétrique à 750 nm. Elle est proportionnelle à la quantité des phénols présents dans les hydrolysats.

La tyrosine est un acide aminé présent dans toutes les protéines, elle est utilisée comme standard pour établir la courbe d'étalonnage pour ce type de dosage.

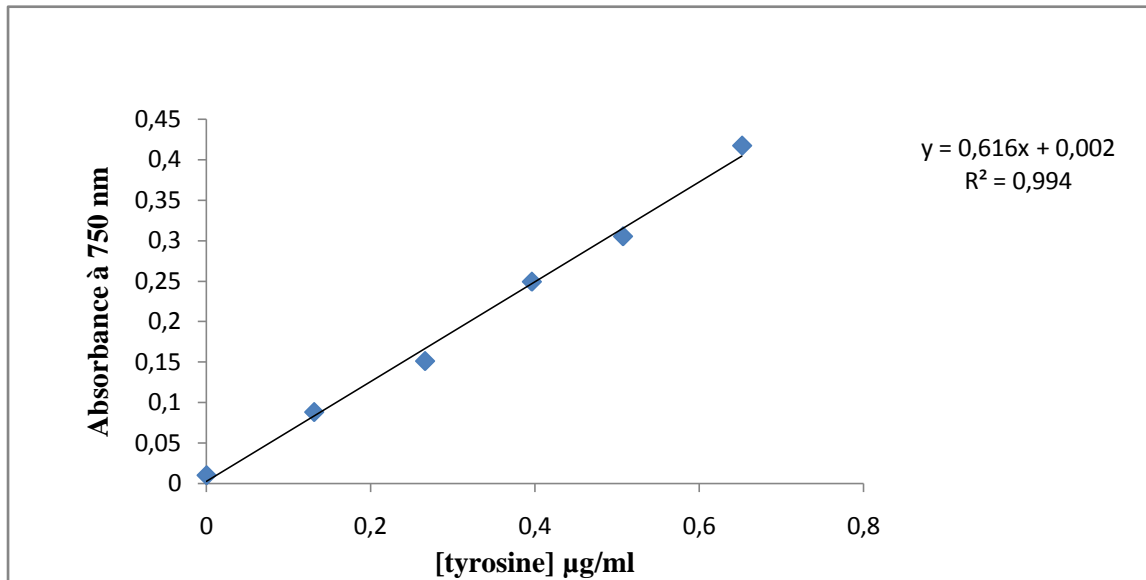
La gamme étalon a été établie avec des concentrations croissantes de tyrosine (50 mg/ml de HCl 0.2 M) allant de 0 à 50 mg/ml sous un volume final de 500  $\mu\text{l}$  en utilisant la solution HCl 0.2 M comme diluant en présence de 2500  $\mu\text{l}$  de NaOH 0.2 N. Le réactif Folin-Ciocalteu (PROLABO) a été ajouté dilué au  $\frac{1}{2}$  dans l'eau distillée au moment de l'emploi (**Tableau 7**). La mesure de l'absorbance au spectrophotomètre a été réalisée après 30 min à la température ambiante et à l'obscurité. La courbe d'étalonnage est représentée par la variation de l'absorbance en fonction des concentrations en tyrosine.

**Tableau 7 :** Préparation de la gamme étalon pour le dosage au Folin-Ciocalteu.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Tyrosine à 50 mg/ml ( $\mu\text{l}$ )	0	100	200	300	400	500
HCl 0.2 M ( $\mu\text{l}$ )	500	400	300	200	100	0
NaOH 0.2 M ( $\mu\text{l}$ )	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Réactif de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{l}$ )	250	250	250	250	250	250
Concentration de tyrosine ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0.131	0.266	0.396	0.507	0.652

Le blanc a été préparé de la même manière, dans ce cas, le TCA a été rajouté avant le substrat (caséines). Le dosage a été effectué en triple pour chaque échantillon.

L'activité protéolytique est déterminée directement sur la courbe étalon (**figure 10**) et les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de tyrosine / ml.



**Figure 10 :** Courbe étalon représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en tyrosine.

#### 2.10.1.2. Méthode de BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay)

Le dosage colorimétrique des protéines par la méthode BCA (**Bicinchoninic Acid Protein Assay**) est basé sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique. La méthode repose sur la formation d'un complexe  $\text{Cu}^{2+}$ - protéines en milieu alcalin, suivie par la réduction de  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^{1+}$  par les protéines. L'acide bicinchoninique, réactif très spécifique de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$ , forme alors un complexe pourpre ayant une absorbance optique maximale à 562 nm. Cette absorbance est directement proportionnelle à la concentration de protéines et peut-être estimée par comparaison avec une protéine standard telle que l'albumine sérique bovine (**Smith et al., 1985**).

Le dosage a été effectué au laboratoire de BIOPEP Actividades Biológicas - Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM - Université d'Autonoma- Madrid- Espagne). Ce dosage a été réalisé en microplaque 96 puits (**SIGMA-ALDRICH**). Le réactif BCA (WR : Working Reagent) a été préparé en mélangeant 50

volumes du réactif A (solution commerciale standard composée d'acide Bicinchoninique, de carbonate de sodium et de tartrate de sodium, Sigma B9643) avec 1 volume du réactif B (solution contenant  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  à 4%).

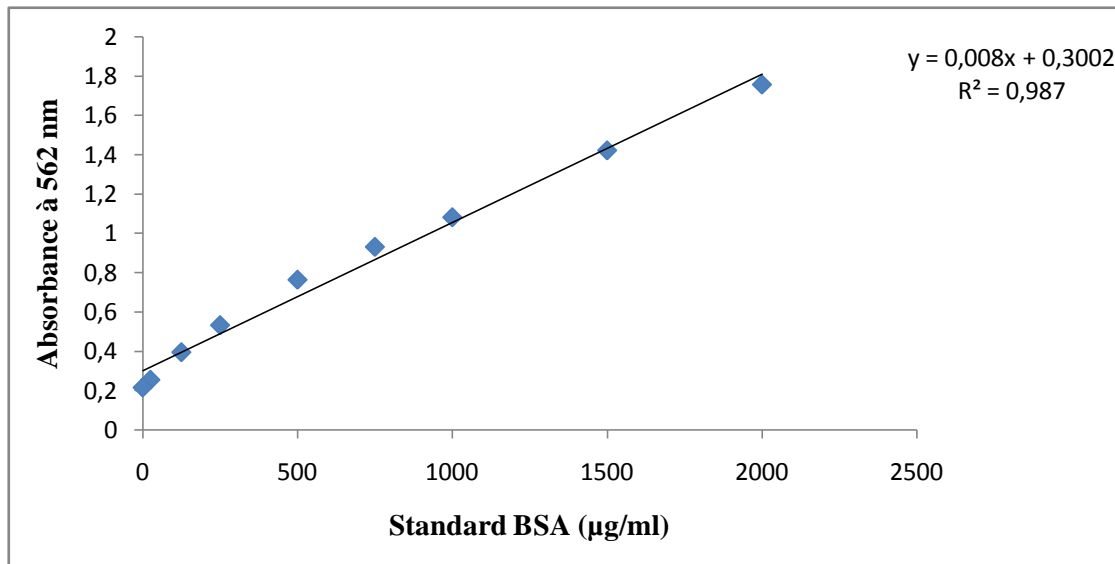
La gamme d'étalonnage a été réalisée avec la protéine d'albumine sérique bovine (BSA) à différentes concentrations, une série de dilutions a été effectuée à partir d'une solution mère de BSA (2 mg/ml en NaCl 0.9% contenant de l'azide de sodium). La préparation de la gamme étalon est indiquée dans le **tableau 8**.

**Tableau 8:** Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines au BCA.

Dilutions	Volume de diluent (eau désionisée) $\mu\text{l}$	Volume de la solution de BSA $\mu\text{l}$	Concentration finale de BSA $\mu\text{g/ml}$
1	0	150	2000
2	40	120 de la dilution 1	1500
3	50	100 de la dilution 2	1000
4	37.5	112.5 de la dilution 3	750
5	50	100 de la dilution 4	500
6	75	75 de la dilution 5	250
7	75	75 de la dilution 6	125
8	120	30 de la dilution 7	25
9	150	0	0 Blanc

20  $\mu\text{l}$  de chaque dilution de BSA et des échantillons à doser ont été déposés dans les puits de la microplaque, 200  $\mu\text{l}$  de BCA WR ont été alors ajoutés dans chaque puits. La plaque a été placée à l'intérieur de spectrophotomètre (FLUOstar optima – BMG labtech – offenburg- Allemagne) à une température de 37°C pendant 30 min avant la lecture des D.O à la longueur d'onde de 562 nm.

La concentration en protéines présentes dans chaque échantillon a été déterminée graphiquement sur la courbe étalon (régression linéaire) (**figure11**).



**Figure 11 :** Courbe étalon représentant la variation de l'absorbance en fonction de la concentration en BSA (méthode de BCA).

### 2.10.2. Calcul du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH %) des caséines a été calculé en utilisant une modification de la méthode décrite par **Boudrant et Cheftel, (1976)** par l'équation suivante :

$$DH = [(D_{\text{au temps } t} - D_0) / (D_{\text{max}} - D_0)]$$

Où :  $D_0$  représente le blanc, il correspond à la quantité des peptides solubles dans le TCA des protéines non hydrolysées, exprimée comme concentration en tyrosine.

$D_{\text{max}}$  correspond à la quantité des peptides solubles dans le TCA exprimée comme concentration en tyrosine, et déterminée après l'hydrolyse acide des caséines (**Baek et Cadwallader, 1995**).

## 2.11. Techniques d'étude des hydrolysats

### 2.11.1. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'analyse des différentes fractions peptidiques contenues dans les hydrolysats de caséines a été réalisée par électrophorèse en conditions dénaturantes en présence d'un détergent anionique le n-dodecyl sulfate de sodium (SDS) et d'un réducteur le  $\beta$  mercapto-éthanol selon la technique de **Laemmli, (1970)**.

La présence du SDS dans le gel et dans le tampon de charge ou tampon Laemmli, provoque la dénaturation des liaisons non covalentes des protéines en enveloppant la structure primaire des polypeptides et les transforme en polyanions (1 molécule de SDS pour 2 résidus d'acides aminés). De ce fait, il leur confère une charge négative proportionnelle à leur longueur dans le rapport d'environ une molécule de SDS pour deux résidus d'acides aminés. La charge globale négative entraîne ainsi la migration des protéines vers l'anode, la séparation se fait alors en fonction de leurs masses moléculaires. Le mercaptoéthanol est ajouté afin de réduire les liaisons disulfures (S-S).

L'électrophorèse a été réalisée sur un diapositif *BIO-RAD*. La séparation a été réalisée sur un gel commercialisé **Criterion™ XT Bis-Tris Precast Gels** (12% Bis-Tris, *BIO-RAD*). Les échantillons (1mg/ml) ont été dilués (V/V) par le tampon Laemmli contenant 2 % de  $\beta$  mercaptoéthanol et chauffés à 95°C pendant 5 min. Après avoir placé le gel dans la cuve d'électrophorèse et enlevé le peigne, le tampon de migration a été ajouté (**XT MES Running Buffer**). 30  $\mu$ l d'échantillons (hydrolysats et caséines non dégradées et 15  $\mu$ l de protéines marqueurs de taille (**Precision Plus Protein™ Unstained Standards**) ont été déposés au fond des puits du gel. La composition des solutions et tampons utilisés est donnée en annexe 3.

La migration des protéines a été réalisée à température ambiante dans les conditions suivantes : 150 Volts pendant 20 min puis 200 Volts jusqu'à la fin de la migration.

Après migration, le gel est séparé des plaques et immergé 10 min dans la solution fixatrice de TCA 10% pour fixer les protéines. Il est rincé 1 min dans l'eau mili-Q puis placé pendant 30-40 min sous agitation dans une solution de coloration contenant le Bleu de Coomassie (**Protein staining reagent. BioSafe NZYTech**). Le gel est par la suite décoloré pendant 1 heure puis toute la nuit dans une solution de décoloration (60 % Eau ; 30 % Méthanol ; 10 % Acide acétique). Le gel est lavé plusieurs fois et conservé à 4°C dans une solution de conservation (acide acétique 10 % v/v).



### **2.11.2. Identification des séquences peptidiques des hydrolysats par Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse tandem Spectrométrie de Masse (RP-HPLC-MS/MS)**

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier les substances analysées.

Les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines vont dans un premier temps être séparés par chromatographie liquide en phase inverse suivant leur hydrophobicité. Les peptides arrivent séquentiellement dans la source du spectromètre de masse (nanospray) et vont être ionisés.-

Dans un deuxième temps, les peptides vont être analysés dans le spectromètre de masse qui permet de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines (MS simple) et de fragmenter ces mêmes peptides (spectres MS-MS) pour accéder à leur structure.

Cette technique a été effectuée au laboratoire de BIOPEP Actividades Biológicas- (Universidad Autónoma- Madrid- Espagne).

Les hydrolysats ultrafiltrés (dans des tubes d'ultrafiltration : membrane 0.45 nm Agilent Spin Concentrators for Proteins cut-off 5 kDa MWCO 4 ml) ont été analysés par RP-HPLC-MS/MS sur un système HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) suivis par une analyse en ligne MS/MS sur un instrument qui piège les ions (Esquire 3000, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) selon le protocole décrit par **Sánchez-Rivera *et al.*, (2014)**.

La distribution de la taille des peptides contenus dans les hydrolysats a été étudiée par chromatographie sur une colonne Mediterranea Sea<sub>18</sub> 150 mm x 2.1 mm (Teknokroma, Barcelona, Spain). Les échantillons ont été injectés (50 µl) à une concentration protéique de 3 mg/ml. Le débit était de 0.2 ml/min. les peptides ont été élués avec un gradient linéaire de (10% - 55%) d'une phase mobile B (acétonitrile / acide formique 0.1%) et 45% d'une phase mobile A (eau / acide formique 0.1%) en 95 min.

Une analyse de données (Data Analysis Bruker Daltoniks ; version 4.0) a été utilisée pour traiter et transformer les spectres. Le séquençage des peptides a été effectué par MASCOT [matrixscience.com](http://matrixscience.com) en utilisant une base de données qui inclut les caséines de laits de chamelle, de brebis et de vache (séquences primaires données en annexe 4). Les tolérances d'erreur utilisées étaient de 0.1 % pour les masses de précurseurs (différentes caséines introduites) et 0.5 Da pour les masses des fragments peptidiques. Les spectres MS/MS correspondants ont été interprétés en utilisant le logiciel Biotoools Version 3.2 (Bruker).

Pour comparer les listes des séquences peptidiques résultant de l'analyse des hydrolysats par RP-HPLC-MS/MS, des diagrammes ont été réalisés en ligne en par Venny 2.1, *Venn's diagrams* <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

Les séquences peptidiques ainsi obtenues ont été comparées aux séquences peptidiques à activités biologiques répertoriées en employant une base de données BIOPEP [www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep](http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep)

## **2.12. Recherche d'activités biologiques liées aux peptides générés**

Les tests de recherche des activités biologiques ont été réalisés au laboratoire de BIOPEP Actividades Biológicas - Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM Université d'Autonoma - Madrid - Espagne) à l'exception du test de l'activité antibactérienne qui a été effectué au laboratoire LBMB de l'université Oran 1- Algérie.

### **2.12.1. Recherche *in-vitro* de l'activité inhibitrice sur l'enzyme ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine)**

L'activité inhibitrice de l'enzyme ECA par les hydrolysats ultrafiltrés (PM<5kDa) a été déterminée par fluorescence selon la méthode décrite par **Sentandreu et Toldrá, (2006)** et modifiée par **Quirós *et al.*, (2007)**.

Les solutions et les réactifs utilisés dans ce test sont présentés en annexe 6.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, peptidyl-dipeptidase A: EC3.4.15.1) a été obtenue auprès de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le substrat fluoresçant synthétique utilisé est o-aminobenzoylglycyl-p- nitro-L- phenylalanyl - Lproline (Abz-Gly-p-Phe (NO<sub>2</sub>)-Pro-OH) (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland).

L'enzyme (5 U), a été dissoute dans 5 ml de Glycérol 50%. Des aliquots de la solution enzymatique sont stockés à -20°C jusqu'à son utilisation (la conservation dure jusqu'à 1 an).

Des microplaques de 96 puits ont été utilisées. 40 µl / puits de H<sub>2</sub>O milli-Q ont été déposés dans les 6 premiers puits (A1-A6) correspondants aux contrôles (C : présence de l'enzyme) et Blanc (B : absence de l'enzyme). A partir de chaque échantillon (hydrolysats ultrafiltrés ayant un poids moléculaire inférieur à 5 kDa), six à sept dilutions ont été réalisées afin d'obtenir plusieurs points sur le graphe. Les trois dilutions les plus concentrées pour chaque échantillon représentent les blancs d'échantillon (BS), ils ont été déposés en double et les échantillons (S) en triple (à raison de 40 µl / puits). 40 µl de la solution enzymatique E (Enzyme diluée dans la solution C (tampon Tris-HCl 150 mM et ZnCl<sub>2</sub> 1125 mM)) ont été ajoutés aux contrôles (C) et aux échantillons (S), parallèlement, 40 µl de la solution C sont ajoutés aux blancs (B) et aux blancs d'échantillon (BS).

La réaction est déclenchée par addition du substrat fluoresçant (160 µl / puits). La fluorescence des échantillons a été mesurée dans un fluorimètre multiscan de microplaque (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne) avec le système de contrôle FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) pour le traitement des données. La mesure de la fluorescence dure 1 heure à 37°C.

L'activité inhibitrice de l'enzyme ECA est exprimée par la concentration d'échantillon inhibant 50% de l'activité enzymatique (IC<sub>50</sub>).

Le pourcentage d'inhibition de ECA a été calculé selon la formule suivante:

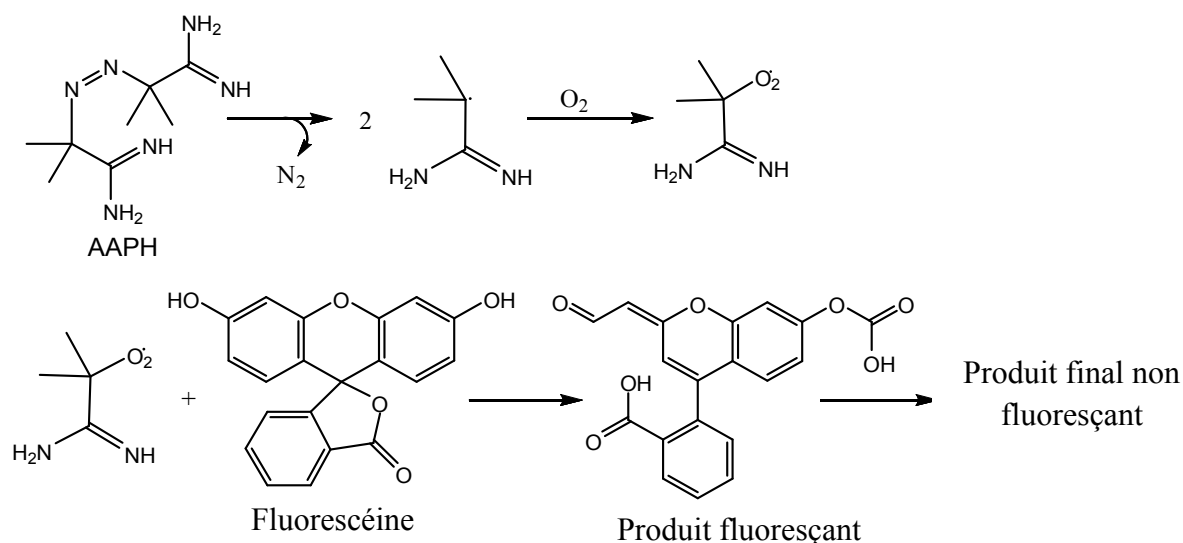
$$100 \times (C - S)/(C - B)$$

C : contrôle, S : échantillon, B : blanc

Ce paramètre est tracé en fonction de la concentration de protéines et un ajustement non linéaire est effectué pour estimer les valeurs IC<sub>50</sub> en utilisant le logiciel Prism 4 pour Windows (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA) (**Quirós *et al.*, (2007).**

### 2.12.2. Détermination *in-vitro* de l'activité antioxydante par le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

La méthode est basée sur la capacité à générer des radicaux peroxydes par décomposition thermique d'un radical peroxyde libre stable AAPH (2,2'-azobis(2-méthylpropionamidine) dihydrochloride). Les radicaux générés oxydent la fluorescéine. Lorsque celle-ci se dégrade, l'intensité du signal d'émission de fluorescence diminue (**Figure 12**). La présence d'antioxydants dans un échantillon protège la fluorescéine et retarde sa dégradation. Il possède alors un pouvoir antioxydant.



**Figure 12:** Schéma simplifié du processus d'oxydation de la fluorescéine par les radicaux peroxydes produits par décomposition thermique d'AAPH (**Ou *et al.*, 2001**).

La méthode utilisée est adaptée à la méthode décrite par **Dávalos *et al.*, (2004)** et modifiée par **Hernandez- Iedesma *et al.*, (2005)**.

La réaction a été standardisée par rapport à des concentrations connues d'un antioxydant de référence le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchromane-2-carboxylic acid), qui est un analogue de la vitamine E et un antioxydant bien connu.

Les solutions et les réactifs utilisés dans ce test sont présentés en annexe 6.

1 mg de chaque hydrolysats ultrafiltrés (poids moléculaire inférieur à 5 kDa) a été dissout dans 1 ml de tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4), puis une série de dilutions a été effectuée.

Des microplaques de 96 puits avec fond noir et plat ont été utilisées. 80 µl de tampon phosphate (contrôle C), 20 µl de tampon phosphate (blanc B), 20 µl de la solution de Trolox à

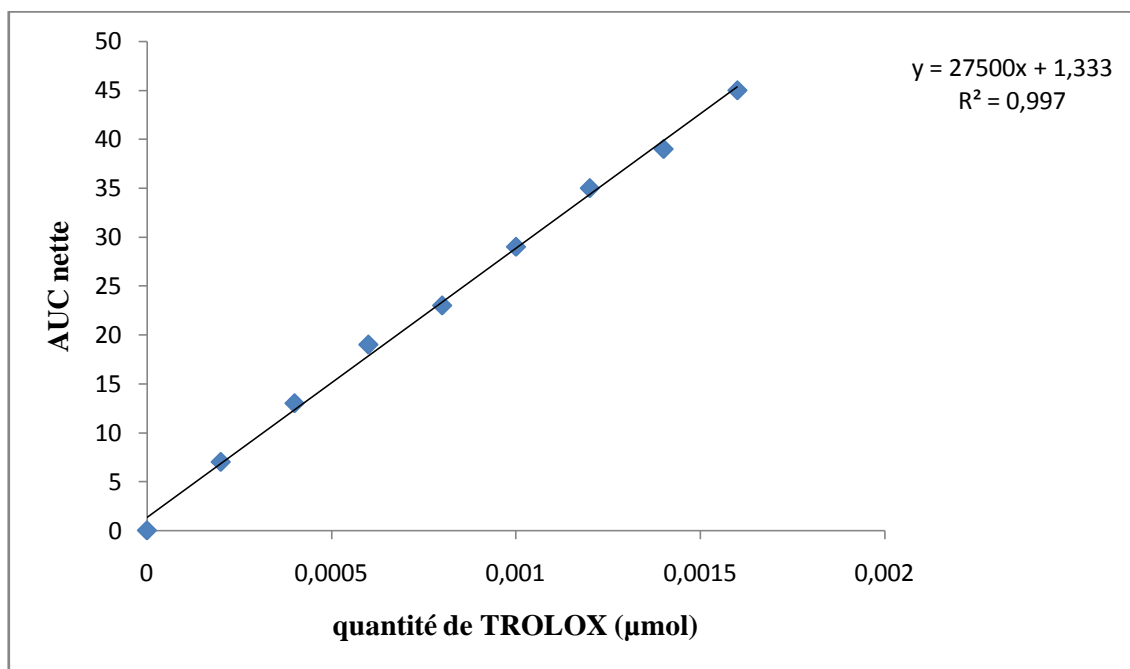
des concentrations variables et 20  $\mu$ l des dilutions de l'échantillon ont été déposés en triple dans les puits.

120  $\mu$ l de la solution de fluorescéine (116,61 nM) ont été ajoutés dans tous les puits. La microplaque a été pré-incubée à 37°C pendant 15 min dans le fluorimètre multiscan de microplaque (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne) avec le système de contrôle FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) pour le traitement des données.

Après incubation, la réaction a été initiée en ajoutant simultanément 60  $\mu$ l de la solution d'AAPH dans tous les puits à l'exception des puits contenant le contrôle (C), la microplaque a été ré-incubée dans le fluorimètre. La lecture de la réaction dure 1h35min. Trois essais indépendants ont été réalisés pour chaque échantillon.

Une droite d'étalonnage a été tracée à partir de différentes concentrations de Trolox (**Figure 13**).

Le calcul de l'activité antioxydante d'un hydrolysate à une concentration donnée est basé sur la détermination de son AUC nette (Area Under the Curve) qui est donné automatiquement par le logiciel. En extrapolant cette AUC nette sur la courbe d'étalonnage du Trolox, le résultat est exprimé en  $\mu$ mol d'équivalent Trolox par gramme d'hydrolysate.



**Figure 13:** Courbe d'étalonnage Trolox dans le test ORAC.

### 2.12.3. Détermination *in-vitro* de l'activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV)

La présente méthode permet d'évaluer l'inhibition de l'activité de l'enzyme dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), en mesurant par spectrophotométrie la formation du produit résultant de l'action de l'enzyme sur un substrat synthétique chromogène.

L'enzyme DPP-IV hydrolyse le substrat chromogène H-Gly-Pro-p-nitroanilide dans les conditions de pH 7,5 et de température 37°C. Le développement de la réaction et la formation de couleur consécutive, provoqués par l'apparition de la p-nitroaniline, peuvent être suivis au spectrophotomètre à 405 nm. Les produits de l'hydrolyse du substrat chromogène par l'enzyme DPP-IV sont présentés ci-dessous:



Le test a été réalisé en suivant les instructions du manuel DPPIV Drug Discovery Kit, élaboré par Enzo Life Sciences, modifié par **Silveira *et al.*, (2013)**.

Les solutions et les réactifs utilisés dans ce test sont présentés en annexe 6.

L'enzyme DPP-IV (Human, recombinant ; Sigma Aldrich D3446), le substrat Gly-Pro-*p*-nitroanilide et les échantillons à tester (hydrolysats ultrafiltrés PM inférieur à 5 kDa) ont été dilués par le tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

Le test a été réalisé sur une microplaque de 96 puits avec un fond transparent. Les échantillons précédemment solubilisés dans le tampon Tris-HCl ont été déposés en triple, l'enzyme a été ajoutée sauf dans les puits qui correspondent aux blancs. Le volume final est de 50 µl par puits. La microplaque a été gardée 10 min à température ambiante. La réaction a été initiée en ajoutant le substrat (H-Gly-Pro-*p*-Nitroaniline) dans tous les puits (**Tableau 9**).

**Tableau 9 :** Répartition des réactifs nécessaires pour le test de l'inhibition *in vitro*- de la DPP-IV.

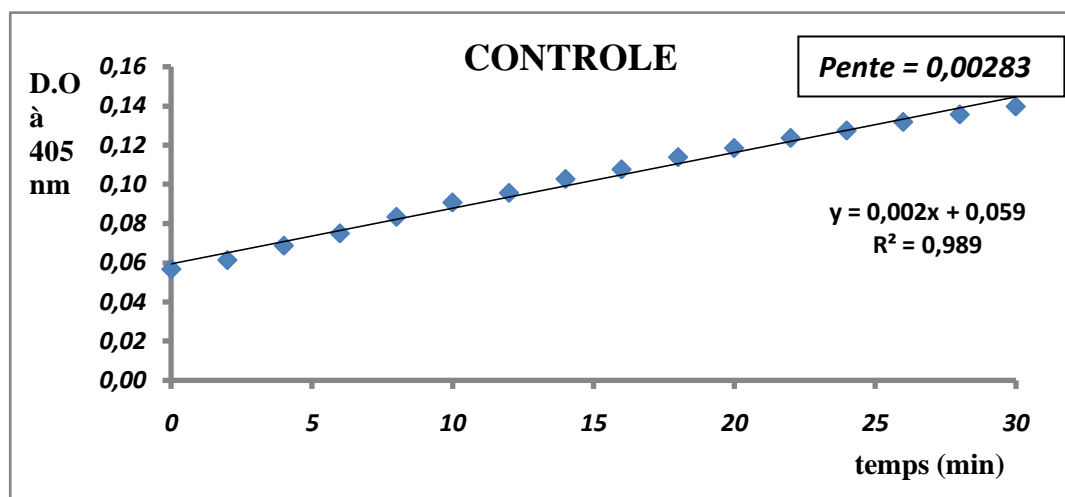
	Blanc	Contrôle	Echantillon
<b>Tampon (µl)</b>	50	35	25
<b>Enzyme DPP-IV (µl)</b>	0	15	15
<b>Echantillon (µl)</b>	0	0	10
<b>Substrat (µl)</b>	50	50	50

Les plaques ont été lues à 405 nm dans un spectrophotomètre (FLUOstar optima, BMG Labtech, Offenburg, Allemagne) avec le système de contrôle FLUOstar (version 1.32 R2, BMG Labtech) pour le traitement des données à des intervalles de temps de 2 min, (0 jusqu'à 30 min) à 37°C. Pour chaque échantillon, trois dosages différents ont été effectués

Les graphes absorbance (DO<sub>405</sub>) en fonction du temps de réaction permettent de calculer la pente (**Figure 14**). L'activité inhibitrice a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\% \text{ Activité résiduelle} = \frac{\text{Pente de la ligne d'échantillon}}{\text{Pente de la ligne du contrôle}} \times 100$$

L'activité inhibitrice est exprimée en IC<sub>50</sub>: valeur ou concentration des échantillons nécessaires pour inhiber 50% de l'activité de la DPP-IV.



**Figure 14 :** Courbe contrôle du test de l'inhibition de la DPP-IV en fonction du temps de réaction.

#### 2.12.4. Recherche de l'activité antibactérienne des hydrolysats

La souche indicatrice utilisée est *Escherichia coli* HB4 isolée à partir d'échantillon biologique humain (Lazreg, 2015). Elle a été cultivée sur bouillon MRS à 37°C pendant une nuit.

L'activité antibactérienne des hydrolysats a été déterminée par la méthode de diffusion en puits en adoptant la méthode de Tagg et McGiven, (1971). Une couche du milieu MRS gélosé (1,5%) a été versée stérilement dans une boîte de Pétri, le milieu MRS gélosé à 0,75% (gélose molle) inoculé à 4% par la pré-culture bactérienne (*E. coli*) a été déposé à la surface de la première couche. Après refroidissement et solidification de la deuxième couche, des puits ont été creusés dans la gélose à l'aide de cloche Durham stérile. 40 µl d'hydrolysats à tester filtrés (0,22 micron) ont été déposés dans les puits. Après 1 heure de diffusion à température ambiante, les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

La présence d'une zone claire d'inhibition de croissance de la souche *E. coli* autour du puits est considérée comme une réaction positive. Le milieu MRS seul a été utilisé comme témoin négatif et la nisine a été utilisée comme témoin positif de l'inhibition de la croissance de la souche indicatrice.



### **2.13. Analyse statistique**

Les expériences (tests *in-vitro* des activités biologiques) ont été réalisées en triplicatas. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard ou écart type.

Pour évaluer les différences entre les concentrations des hydrolysats et les valeurs IC<sub>50</sub> et comparer les moyennes, une analyse de variance (ANOVA) suivie par Bonferroni post test a été appliquée en utilisant Statgraphics Centurion XV version 15.2 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA, [www.statgraphics.com](http://www.statgraphics.com)). La valeur  $p < 0.05$  a été considérée comme statistiquement significative).

Le logiciel GraphPad Prism4 software program (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) a été utilisé.

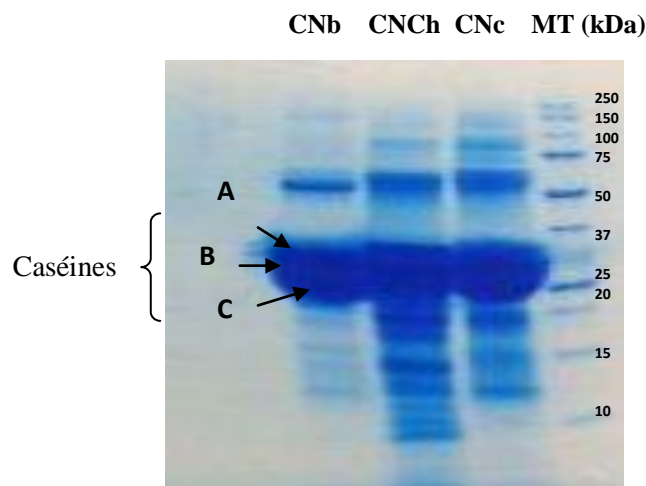
### *3. Résultats et discussion*

### 3.1. Vérification de la pureté des caséines totales préparées au laboratoire

Les caséines utilisées dans ce travail ont été préparées à partir des échantillons de laits crus de chamelle et de brebis. Elles ont été obtenues par précipitation au pH isoélectrique (4,6). Une caséine commerciale d'origine bovine a été également utilisée. Leur pureté a été vérifiée par électrophorèse (SDS- PAGE).

Les profils des caséines de brebis en comparaison au profil des caséines bovines commerciales présentent 3 bandes majeures A, B et C correspondantes selon l'ordre décroissant de leur migration aux caséines  $\alpha_s$ ,  $\beta$  et  $\kappa$  (**Figure 15**). La bande A, dont la mobilité 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 30 kDa et 40 kDa. Les bandes B et C présentent des poids moléculaires compris entre 30 kDa et 20 kDa.

Le profil des caséines camelines présente aussi le même nombre de bandes majeures. En revanche, les proportions des fractions caséiniques sont différentes (bandes de faible intensité). Ceci est conforme aux proportions rapportées par la littérature où la caséine  $\alpha_{s1}$  de PM 24.7 kDa représente 22%, la caséine  $\alpha_{s2}$  de PM 22 kDa représente 9.5%, la caséine  $\beta$  de PM 25 kDa représente 65% et enfin la caséine  $\kappa$  de PM 22.6 kDa ne représente que 3.5% (**Farah et Farah-Riesen, 1985**).



**Figure 15:** Profil électrophorétique des caséines de chamelle, de brebis et caséine bovine commerciale. Séparation sur un gel de polyacrylamide 12% en conditions dénaturante.

**CNb:** caséine de brebis. **CNch:** caséine de chamelle. **CNc:** caséine bovine commerciale.  
**MT:** marqueur de taille.

**Siboukeur (2006)** a estimé les poids moléculaires des fractions caséiniques, par analyse électrophorétique en conditions dénaturantes. Selon cet auteur les caséines  $\alpha_{S1}$  et  $\alpha_{S2}$  présentent un poids moléculaire de 37.4 kDa et 28.7 kDa respectivement. Alors que la caséine  $\beta$  migre sous forme d'un doublet de poids moléculaire égal à 30.7 kDa et 31.7 kDa, correspondant aux deux variantes génétiques de cette fraction. Les PM des bandes de caséines, observées dans la présente étude, se rapprochent des valeurs obtenues par cet auteur.

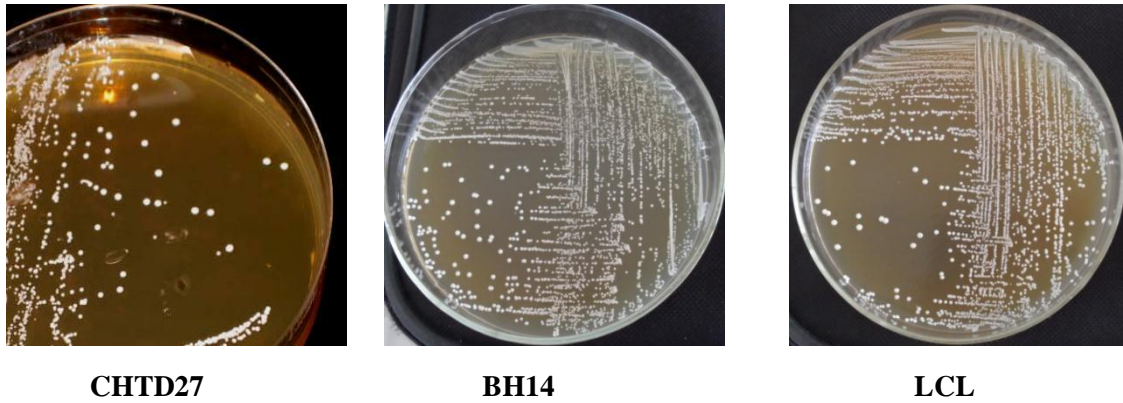
**Alim et al., (2005)** en analysant les caséines camelines par LC-MS, ont identifié trois fractions, de PM égale à 24,76 kDa, 22,03 kDa et 24,97 kDa. Ces masses ont été attribuées aux caséines  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  et la caséine  $\beta$ , respectivement.

Selon **ADOUI (2014)**, le spectre de masse de la caséine cameline entière, obtenu par MALDI-TOF, indique la présence de fractions de masses égales à 38,076 kDa, 27,89 kDa, 30.84 kDa et 23.061 kDa. En comparant ces masses au profil électrophorétique obtenu, ces dernières peuvent être attribuées aux fractions  $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ , respectivement.

La précipitation des caséines au pH acide à partir de laits crus n'a pas permis de séparer les caséines des autres protéines de lait. En effet, on note l'apparition de bandes correspondant à des protéines de poids moléculaire inférieur à 20 kDa, qui peuvent être les protéines  $\alpha$  lactalbumine et  $\beta$  lactoglobuline, et des bandes de poids moléculaire supérieur à 60 kDa qui peuvent correspondre à l'immunoglobuline, lactoferrine ou sérum albumine. Ces fractions protéiques sont également observées pour la caséine commerciale utilisée comme témoin.

### **3.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes**

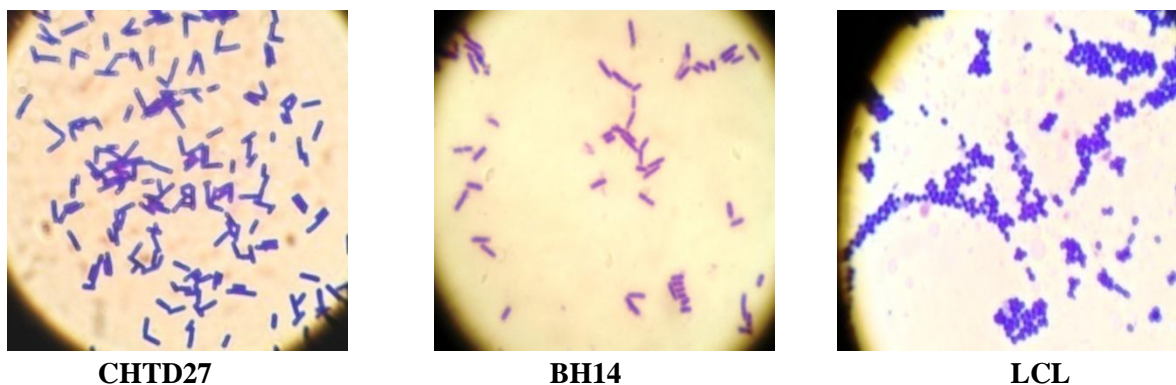
L'examen macroscopique des cultures bactériennes sur milieux solides MRS et M17 a révélé des colonies caractéristiques, sous forme arrondie de couleur blanchâtre, d'aspect crémeux, de surface lisse et bombée, et à contour régulier, à l'exception de la souche CHTD27 qui a donné des colonies à contour non régulier (**Figure 16**).



**Figure 16:** Aspect des colonies des souches cultivées sur milieu MRS et M17 solides.

L'observation microscopique des frottis préparés à partir de colonies bien isolées après coloration de Gram a montré que les trois souches sont à Gram positif, de différentes formes et modes d'association (**Figure 17**) :

- Pour la souche CHTD27 : des bacilles à bouts carrés, associés par paires ou en chainettes.
- Pour la souche BH14 : des bacilles à bouts arrondis, associés par paires ou en chainettes.
- Pour la souche LCL : des coques regroupés par paires ou en chainettes.



**Figure 17 :** Aspect microscopique des souches après coloration de Gram (G10x100).

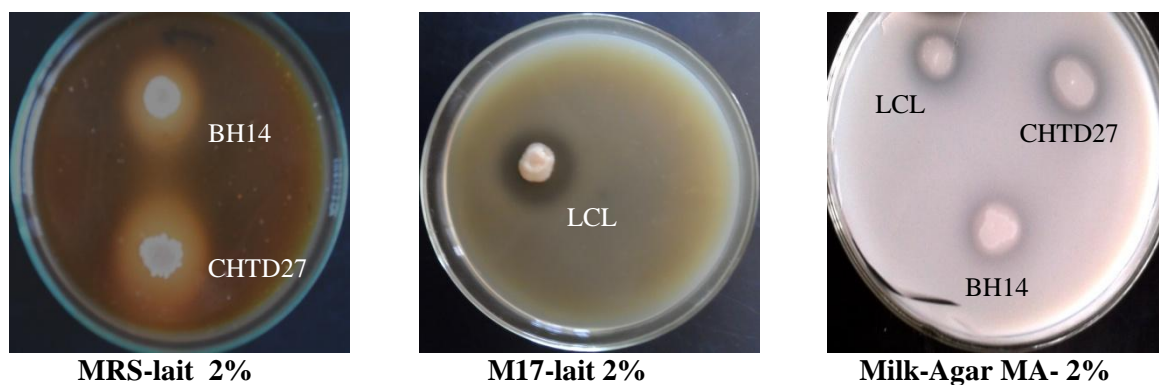
Le test catalase a montré que les trois souches sont à catalase négative. Ces résultats confirment la pureté des souches ainsi que leur appartenance au groupe des bactéries lactiques.

### 3.3. Confirmation du caractère protéolytique des souches

Différentes méthodes ont été utilisées pour mettre en évidence le caractère protéolytique des souches utilisées.

#### 3.3.1. Activité protéolytique en milieu solide

Le caractère protéolytique des bactéries cultivées en milieu solide est confirmé par l'apparition de halos clairs de protéolyse, correspondant à la dégradation des protéines du lait, autour des colonies ensemencées par touches sur milieu de culture additionné de 2% de lait écrémé ou en milieux MA 2% (**Figure 18**).

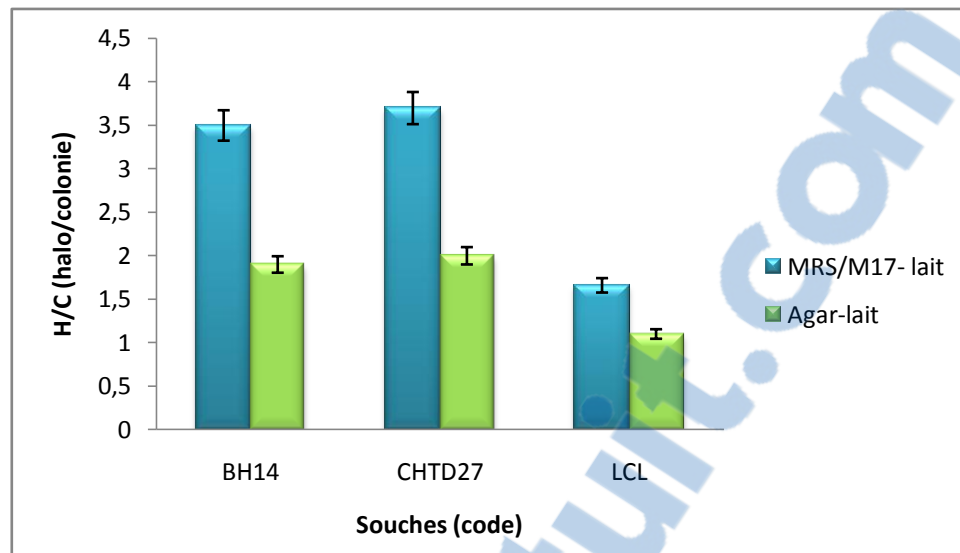


**Figure 18** : Aspect des halos de protéolyse par les bactéries déposées en touche.

Les résultats obtenus montrent que les deux souches de lactobacilles BH14 et CHTD27, expriment une activité protéolytique plus élevée comparativement au lactocoque LCL.

Sur milieu solide additionné de lait, les rapports de protéolyse H/C sont de 3.5 et 3.7 pour les souches BH14 et CHTD27 respectivement et de 1.66 pour la souche LCL. En milieu MA 2%, les cellules bactériennes dégradent les protéines du lait et clarifient le milieu, c'est la souche CHTD27 qui est la plus protéolytique ( $H/C = 2$ ) (**Figure 19**). Ces valeurs rejoignent celles rapportées au laboratoire pour les trois souches. En effet les valeurs obtenues pour les deux souches de lactobacilles concordent avec les valeurs obtenues par **Djellouli (2010)**, **Roudj (2010)** et **Messaoui (2013)** qui avaient trouvé des valeurs de rapports H/C allant de 2 à 3.6. Les valeurs obtenues avec la souche LCL rejoignent les résultats des travaux de **Messaoui (2013)** qui a trouvé une valeur de 1.5.

Ces résultats indiquent que les souches bactériennes utilisées ont gardé leur potentiel de protéolyse durant leur conservation.



**Figure 19 :** Activité protéolytique des trois souches bactériennes en milieux solides: MRS-lait 2% (BH14, CHTD27), M17-lait 2% (LCL) et MA 2%. Les écarts types ( $\pm$  ET) issus des différents essais sont représentés par les barres d'erreur.

A la suite des résultats obtenus, on observe que les deux souches de lactobacilles (BH14 et CHTD27) expriment une activité protéolytique plus élevée comparativement au lactocoque LCL. en effet, les lactobacilles montrent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques (Marilley *et al.*, 2004). Toutefois, si les mécanismes enzymatiques empruntés par les deux genres bactériens semblent relativement proches, les enzymes rapportées chez les lactobacilles sont plus diversifiées, en particulier les peptidases.

Ces résultats montrent ainsi que l'activité protéolytique dépend de la souche et qu'il existe une relation entre la composition du milieu de croissance et l'expression de l'activité protéolytique. La présence de peptone et l'extrait de levure dans les milieux MRS et M17 apportent les acides aminés et les peptides nécessaires à la croissance optimale des bactéries lactiques, ces remarques pourraient expliquer en partie la différence entre les rapports H/C dans les milieux de culture additionnés de lait qui sont plus importants que ceux obtenus dans le milieu agar-lait. En effet, les concentrations en acides aminés libres et peptides dans le lait sont trop faibles pour permettre aux bactéries lactiques de croître abondamment ce qui les oblige à développer leurs systèmes protéolytiques (Auclair, 1990 ; Juillard *et al.*, 1995). Le milieu agar-lait a souvent été utilisé pour sélectionner les bactéries lactiques à activité protéolytique (Pailin *et al.*, 2001; Swearingen *et al.*, 2001; Deirder *et al.*, 2004).



### 3.3.2. Détection des protéases extracellulaires dans les surnageants de culture

Nous avons recherché les enzymes protéolytiques dans les surnageants issus de culture réalisée en milieu liquide dans des conditions différentes (en présence et en absence du lait, en présence de caséine), et après incubation en absence de  $\text{CaCl}_2$  et en présence d'EDTA. Après centrifugation, les surnageants de culture ont été récupérés, dosés pour leurs contenus protéiques puis examinés pour leur activité protéolytique. Une même quantité de protéines a été déposée dans des puits creusés sur une boîte d'agar contenant du lait 1 %.

#### 3.3.2.1. Mise en évidence de l'activité protéolytique sur milieu MA

Après incubation, l'activité protéolytique est révélée par l'apparition de halos clairs autour des puits. Les diamètres des halos élevés au carré ( $D^2$ ) nous permettent d'estimer l'activité protéolytique extracellulaire des souches (**Figure 20**).



Surnageants obtenus en absence de lait

surnageants obtenus en présence de lait 2%

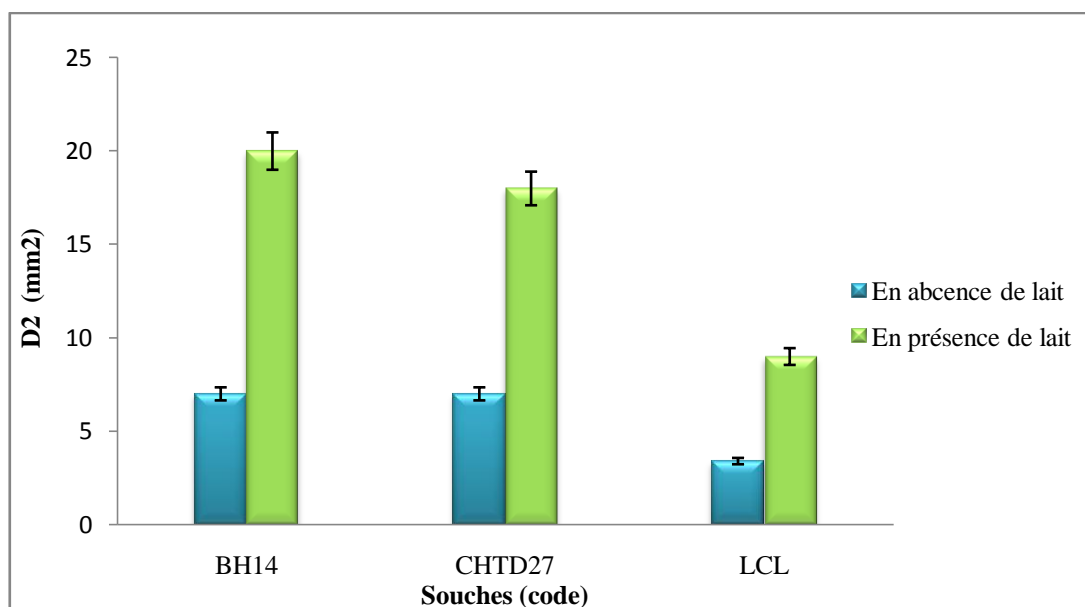
**Figure 20 :** Activité protéolytique extracellulaire des souches sur milieu agar- lait 1%.

T-MRS et T-M17 : Surnageants issus de MRS-Lait et M17-lait nonensemencés.

Les deux souches de lactobacilles révèlent une activité protéolytique extracellulaire plus élevée que l'activité retrouvée dans les surnageants de culture du lactocoque en absence ou en présence de lait. Les valeurs des diamètres des halos  $D^2$  obtenues après culture en absence de lait sont  $7 \text{ mm}^2$  pour les souches BH14 et CHTD27 et  $3.4 \text{ mm}^2$  pour la souche LCL. La présence du lait 2% dans le milieu de culture a favorisé l'expression de l'activité protéolytique dans les surnageants de culture. En effet, les diamètres  $D^2$  des halos sont dans ce cas  $20 \text{ mm}^2$  pour la souche BH14,  $18 \text{ mm}^2$  pour la souche CHTD27 et un diamètre de  $9 \text{ mm}^2$  pour la souche LCL (**Figure 21**).

Aucune activité protéolytique n'a été révélée dans les surnageants de culture dans le milieu qui contient la caséine comme seule source d'azote.





**Figure 21 :** Activité protéolytique dans les surnageants de culture en présence et en absence du lait 2%. Les écarts types ( $\pm$  ET) issus des différents essais sont représentés par les barres d'erreur.

Nos résultats concordent avec ceux observés pour les activités liées aux protéinases de la souche *Lc lactis* MG1363, qui ont été trouvées particulièrement élevées lorsque les cellules sont cultivées dans le lait (Meijer et Hugenholtz, 1997 ; Simova et Beshkova, 2007; Smeianov *et al.*, 2007).

De même, il a été montré que la production de protéinases chez *Lactococcus* et *Lactobacillus* est réprimée durant la croissance dans un milieu riche en peptides et en acides aminés tel que le MRS ou le M17 (Marugg *et al.*, 1995 ; Meijer *et al.*, 1996; Gilbert *et al.*, 1997; Hebert *et al.*, 2000), alors que dans le milieu de culture contenant du lait, ces enzymes sont fortement synthétisées (Kenny *et al.*, 2003).

Toutes ces remarques laissent suggérer que la régulation de la biosynthèse de ces enzymes protéolytiques est sous le contrôle du contenu en peptides et acides aminés du milieu de culture.

Les bactéries lactiques sont utilisées sous forme de ferments concentrés dans l'industrie alimentaire (conservation et transformation). Ces bactéries doivent être adaptées au milieu lait, donc elles sont capables d'utiliser le lactose et hydrolyser les protéines du lait. Les bactéries lactiques ne peuvent absorber et utiliser que des acides aminés libres, peu abondants dans le lait, ou des peptides courts (composés seulement de quelques acides aminés). Leur nutrition azotée exige donc l'hydrolyse des protéines du lait y compris les caséines, par des

enzymes protéolytiques. La plupart de ces bactéries possèdent des protéinases liées à leur paroi, la synthèse de ces protéases dépend de la composition du milieu, notamment une concentration faible en peptides et en acides aminés (**Chopard et al., 2001**).

Les résultats obtenus nous ont permis de confirmer que le lait reste le meilleur inducteur de la production des protéases dans le milieu de culture. De par leur taille, les protéines et les oligopeptides du lait ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique des bactéries, de ce fait, leur hydrolyse nécessite la présence de protéases bactériennes extracellulaires ou liées à l'enveloppe bactérienne.

Due à leur importance dans le processus de fermentation, les protéases des lactocoques ont fait l'objet de nombreuses études biochimiques (**Buist et al., 1998 ; Drouault et al., 2002**). Ce sont des enzymes monomériques à serine qui ressemblent aux subtilases de paroi, ayant des poids moléculaires élevés entre 180 et 190 kDa (**Kunji et al., 1996**), assez différents du poids moléculaire de 145 kDa estimé pour une protéase de paroi purifiée à partir de *Lactobacillus acidophilus* (**Kojic et al., 1991**).

### 3.3.2.2. Influence des ions calcium et de l'EDTA sur les protéases liées à la paroi

L'influence des ions calcium sur la stabilité des protéases ancrées à la paroi bactérienne a été recherchée. Après croissance sur milieu de culture, les cellules ont été lavées en tampon Tris-HCl pH 7 en absence d'ions calcium. La présence de protéases dans les surnageants de lavage a été recherchée sur le milieu agar-lait ; après incubation, nous n'avons observé aucune zone de protéolyse autour des dépôts. Ce résultat laisse supposer que les protéases des souches utilisées sont calcium indépendantes, les ions calcium ne jouent aucun rôle dans le maintien des protéases à la paroi cellulaire.

Chez les lactocoques, il a été bien établi que la stabilité des protéases dans la paroi bactérienne est assurée par la présence des ions calcium. La diffusion de ces derniers dans le milieu de culture entraîne une autoprotéolyse de l'enzyme qui est alors libérée dans le milieu de croissance (**Exterkate et al., 1987; Laan et Konings, 1991**). Cependant, la souche LCL utilisée dans ce travail ne répond pas à ce caractère, elle ne relargue pas ses protéases après incubation en absence d'ions calcium, cela a été montré chez d'autres lactocoques (**Galia, 2011; Léonard, 2013**).

Les protéases liées à la paroi des lactobacilles sont rapportées, pour la plupart, calcium indépendantes, donc résistantes à l'autoprotéolyse (Kojic *et al.*, 1995; Fira *et al.*, 2001). Cependant une protéase liée à la paroi bactérienne de *Lb. plantarum* NCIM 2083 a été extraite en absence des ions calcium (Marathe et Ghosh, 2009).

L'activité protéolytique extracellulaire est également absente après incubation en présence de l'EDTA qui est un chélateur non spécifique des ions. Ce caractère a été décrit chez de nombreux lactobacilles (Shin *et al.*, 2004).

Ces résultats ont déjà été observés au laboratoire pour les souches CHTD27 et BH14, les cellules des deux souches sécrètent les protéases dans le milieu de culture et les protéases pariétales sont  $\text{Ca}^{2+}$  et EDTA indépendantes (Roudj, 2010).

Les méthodes utilisées dans cette étude ont montré que les trois souches de bactéries lactiques sont dotées de potentiel protéolytique. Les zones de clarification observées autour des colonies sont le résultat de la dégradation des caséines (protéines majeures du lait) par les protéases. Ces dernières pourraient être liées à la surface de la paroi bactérienne, ou diffuser dans le milieu.

### **3.4. Purification partielle des protéases extracellulaires par précipitation au sulfate d'ammonium**

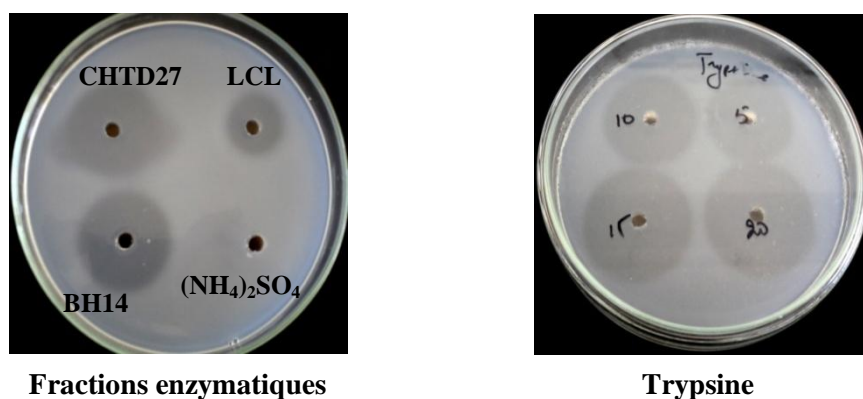
La purification des protéases par concentration au sulfate d'ammonium a été entreprise en vue de leur utilisation pour préparer des hydrolysats de caséines dans le but de déterminer et d'identifier les fractions peptidiques générées. La purification a été effectuée sur les protéases extracellulaires produites par des bactéries cultivées en milieu de culture supplémenté de lait 2%.

Les protéases en suspension dans le surnageant de culture sont précipitées au sulfate d'ammonium à 80% de saturation, l'activité des protéases dans les précipités après dialyse contre de l'eau distillée a été recherchée sur le milieu agar au lait 1%. La trypsine (enzyme digestive) a été utilisée comme témoin de l'activité protéolytique.

Les fractions enzymatiques ont révélé une activité protéolytique avec un diamètre de clarification égal à 18 mm<sup>2</sup> pour la fraction liée à la souche BH14, 17.7 mm<sup>2</sup> pour la fraction liée à la souche CHTD27 et 8.5 mm<sup>2</sup> pour la fraction liée à la souche LCL (**Figure 22**). Il est à noter que ces valeurs sont sensiblement identiques à celles obtenues avec les fractions brutes

(19.8 mm<sup>2</sup> pour la souche BH14, 18 mm<sup>2</sup> pour la souche CHTD27 et un diamètre de 9 mm<sup>2</sup> pour la souche LCL). Ceci indique que la précipitation par le sulfate d'ammonium n'a pas conduit à une perte de l'activité des protéases.

Les diamètres de clarification les plus élevés sont obtenus avec la solution de trypsine testée à différentes concentrations.



**Figure 22 :** Activité protéolytique des fractions enzymatiques après précipitation au sulfate d'ammonium à 80% et dialyse.

### **3.5. Mise en évidence et caractérisation des peptides dans les hydrolysats de caséines**

L'hydrolyse des protéines est une approche qui permet d'obtenir à partir de celles-ci des produits pouvant présenter de nouvelles propriétés fonctionnelles et/ou biologiques. C'est dans ce cadre que nous avons examiné l'activité des protéases exocellulaires des souches (BH14, CHTD27 et LCL) sur une famille protéique importante du lait qui est la caséine totale (caséines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\kappa$ ) en comparaison à la trypsine connue pour sa capacité, après hydrolyse des caséines, à générer des peptides bioactifs. Nous avons cherché à mettre en évidence l'effet de ces enzymes protéolytiques sur les différentes caséines en recherchant les peptides libérés.

L'hydrolyse des caséines par les protéases extracellulaires préparées ainsi que par la trypsine a été réalisée à pH 7 (tampon Tris-HCl 0.1M), à 37°C pendant 48 heures. Le contenu en peptides des hydrolysats a été dosé par le réactif de Folin-Ciocalteu et par la méthode de BCA.

### **3.5.1. Mise en évidence des produits d'hydrolyse des caséines par dosage au réactif de Folin-ciocalteu**

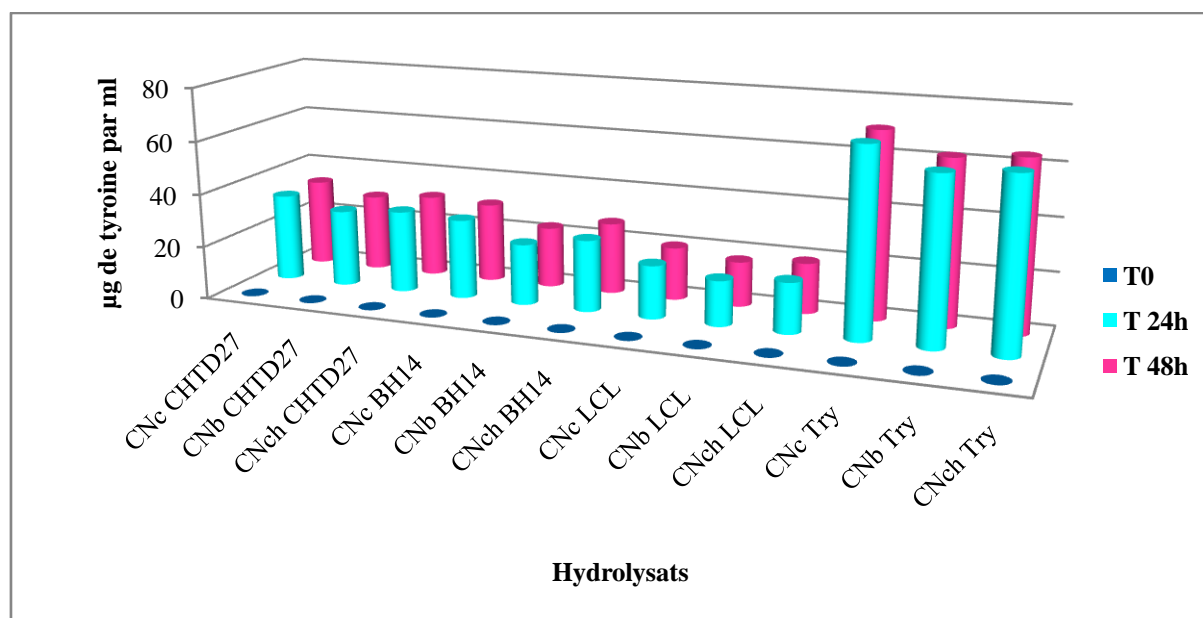
La mesure de cette activité est fondée sur l'intensité de la protéolyse des caséines sous l'action enzymatique qui aboutit à la libération de peptides de faible poids moléculaire, et qui sont séparés des caséines non dégradées par addition d'acide trichloracétique (TCA) à 15 %. L'activité enzymatique est exprimée en  $\mu\text{g}$  de tyrosine/ml.

Les résultats présentés sur la **figure 23** montrent que la quantité de peptides générés est faible sous l'action des protéases extracellulaires (les valeurs varient entre 17  $\mu\text{g.tyr/ml}$  et 33  $\mu\text{g.tyr/ml}$ ), alors que les valeurs sous l'action de la trypsine varient de 62-70  $\mu\text{g.tyr/ml}$ . On note que l'activité des protéases extracellulaires issues des lactobacilles (CHTD27, BH14) est plus importante comparativement à l'hydrolyse par les protéases issues du lactocoque LCL. Les différentes caséines ont montré une sensibilité plus grande à la trypsine notamment les caséines bovines (70  $\mu\text{g.tyr/ml}$ ). La réaction d'hydrolyse des caséines par les différentes enzymes est maximale à 24 heures d'incubation, ceci peut être expliqué par la saturation des enzymes avant 24 heures.

A la suite de ces résultats, nous avons observé que les caséines bovines sont plus sensibles à l'hydrolyse aussi bien par la trypsine que par les protéases bactériennes.

Ces résultats ont été observés au laboratoire, l'enzyme digestive trypsine est plus efficace sur les caséines que les protéases bactériennes et que les caséines bovines sont plus facilement hydrolysées que les caséines de chamelle et de brebis.

Ce résultat peut être expliqué par la composition en acide aminé des protéines. En effet, la trypsine coupe avec spécificité les liaisons peptidiques liées à la lysine et l'arginine, le rapport lys/arg dans la caséine est de 2,05 (**Dermas, 2011**), ce qui pourrait expliquer une meilleure accessibilité de l'enzyme au substrat.



**Figure 23:** Dosage au réactif de Folin-Ciocalteu des peptides dans les hydrolysats de caséines.

**CNc CHTD27** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNb CHTD27** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNch CHTD27** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de CHTD27.

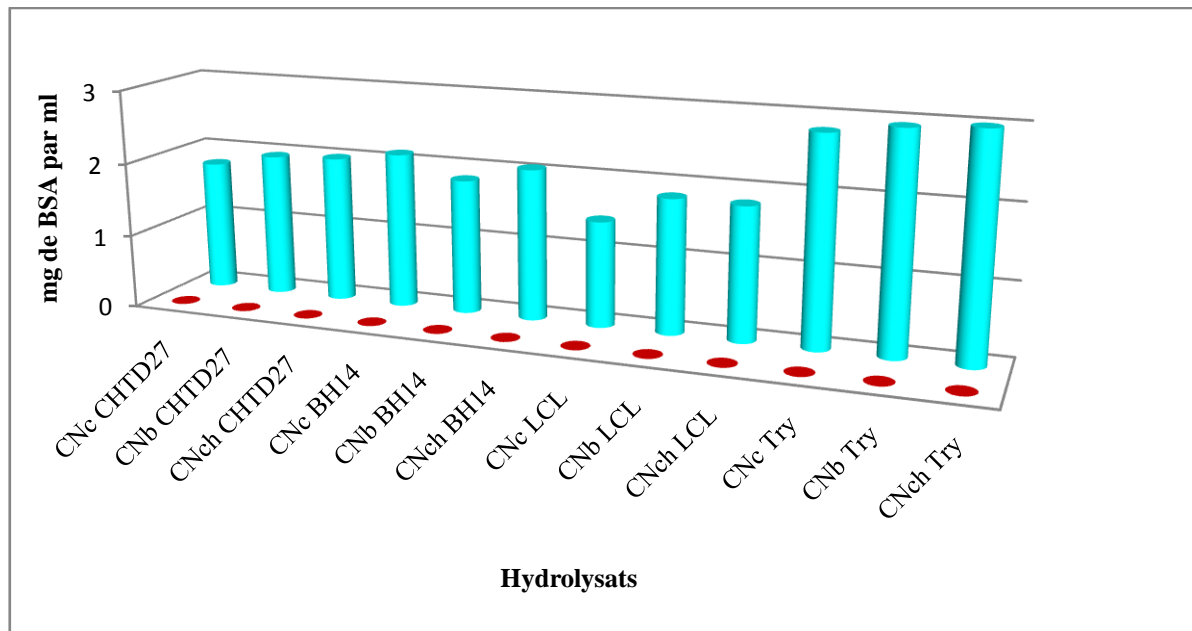
**CNc BH14** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNb BH14** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNch BH14** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de BH14.

**CNc LCL** : caséine bovine commerciale hydrolysée les protéases issues de LCL. **CNb LCL** : caséine de brebis hydrolysée les protéases issues de LCL. **CNch LCL** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de LCL.

**CNc Try** : caséine bovine commerciale hydrolysée par la trypsine. **CNb Try** : caséine de brebis hydrolysée par la trypsine. **CNch Try** : caséine de chamelle hydrolysée par la trypsine.

### 3.5.2. Mise en évidence des produits d'hydrolyse des caséines par dosage au BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay)

Le contenu en peptides a également été dosé par la méthode de BCA. Dans ce cas aussi, l'hydrolyse des caséines par les protéases bactériennes donne des valeurs faibles (1,4 mg/ml à 2 mg/ml) comparativement à la trypsine (2,99 mg/ml à 2,81 mg/ml) (**Figure 24**).



**Figure 24:** Dosage des hydrolysats de caséines par la méthode de BCA.

**CNc CHTD27** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNb CHTD27** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNch CHTD27** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de CHTD27.

**CNc BH14** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNb BH14** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNch BH14** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de BH14.

**CNc LCL** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de LCL. **CNb LCL** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de LCL. **CNch LCL** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de LCL.

**CNc Try** : caséine bovine commerciale hydrolysée par la trypsine. **CNb Try** : caséine de brebis hydrolysée par la trypsine. **CNch Try** : caséine de chamelle hydrolysée par la trypsine.

Les protéases issues des souches CHTD27 et LCL semblent plus actives sur les caséines de chamelle et de brebis, contrairement aux protéases de la souche BH14 qui semblent plus actives sur la caséine bovine commerciale.

A la suite des résultats obtenus, on retrouve une corrélation entre les deux méthodes de dosage. Il apparaît que les protéases des lactobacilles sont plus actives sur les caséines (quelle que soit leur source) que les protéases du lactocoque.

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases. Ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique. Dans l'hydrolyse enzymatique, le taux de clivage des liaisons peptidiques dépend principalement de deux facteurs : la spécificité de l'enzyme et l'accessibilité aux liaisons peptidiques (Adler-Nissen, 1986 ; Kumar *et al.*, 2008).

La pepsine, la chymotrypsine et la trypsine sont capables de faire subir aux protéines une hydrolyse totale ou sub-totale. L'action de la trypsine est en relation avec le rapport Lys/Arg, qui est élevé dans les caséines, étant donné que la trypsine possède une affinité pour la lysine et l'arginine (**Adler-Nissen, 1986**). Cependant, les quantités protéiques dans les hydrolysats obtenus avec les protéases extracellulaires sont faibles, ce qui pourrait expliquer la faible accessibilité des protéases bactériennes aux sites d'attaque présents au niveau des caséines à l'état natif. L'utilisation des protéines dénaturées par traitement mécanique ou thermique peut entraîner de modifications de structure moléculaire (dépliage, réarrangement) ayant pour effet une meilleure accessibilité des liaisons peptidiques, ce qui permet d'obtenir une hydrolyse enzymatique plus prononcée.

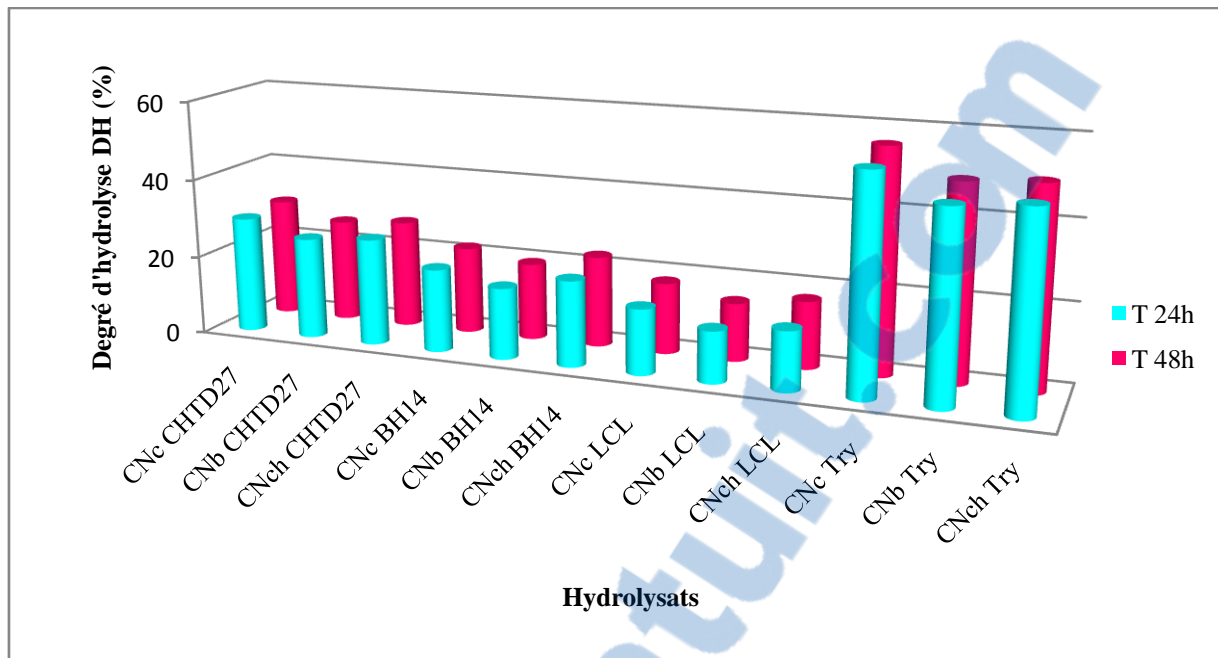
### 3.5.3. Caractérisation des hydrolysats par le degré d'hydrolyse DH

Le DH est défini comme étant le pourcentage du nombre de liaisons peptidiques clivées sur le nombre de liaisons peptidiques total (**Mahmoud, 1992**). Il permet de caractériser l'étendue de la dégradation hydrolytique des protéines. Le DH est considéré comme étant l'indicateur le plus pratique et le plus convenable pour le contrôle des procédés d'hydrolyse (**Adler-Nissen, 1986 ; Mahmoud, 1992**).

Après une hydrolyse acide des caséines (chamelle, brebis et bovine) évaluée par dosage au folin-ciocalteu, le degré d'hydrolyse est déterminé pour les différentes fractions enzymatiques. Les résultats obtenus indiquent que le DH des caséines par les protéases des lactobacilles (20% jusqu'à 30%) est plus élevé que celui obtenu par les protéases du lactoque (14% à 18%). Le DH obtenu par la trypsine (47.2% à 54%) est nettement plus important que celui obtenu par les protéases bactériennes (**Figure 25**).

Les valeurs de DH sont maximales au temps 24h de réaction, ce qui laisse dire que l'hydrolyse des caséines dans les conditions réalisées est achevée avant 24 heures de réaction. Le calcul du paramètre DH confirme les résultats obtenus par le dosage des hydrolysats.





**Figure 25:** Degré d'hydrolyse (DH) des caséines.

**CNc CHTD27** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNb CHTD27** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de CHTD27. **CNch CHTD27** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de CHTD27.

**CNc BH14** : caséine bovine commerciale hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNb BH14** : caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de BH14. **CNch BH14** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de BH14.

**CNc LCL** : caséine bovine commerciale hydrolysée les protéases issues de LCL. **CNb LCL** : caséine de brebis hydrolysée les protéases issues de LCL. **CNch LCL** : caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de LCL.

**CNc Try** : caséine bovine commerciale hydrolysée par la trypsine. **CNb Try** : caséine de brebis hydrolysée par la trypsine. **CNch Try** : caséine de chamelle hydrolysée par la trypsine.

Le DH de la caséine bovine par la trypsine (56%) est proche de la valeur obtenue par **Boughellout (2010)** dans les mêmes conditions (caséine bovine sous l'action de la trypsine) après 4h d'hydrolyse (53%). Cette valeur est aussi équivalente au DH (40.7%) déterminé au laboratoire par **Messaoui (2013)**.

**El-zahar, (2004)** a utilisé quatre types de levains pour la fabrication de yaourts à partir de laits de brebis ayant subi un prétraitement thermique différent. Il a trouvé que le degré d'hydrolyse des caséines et des protéines du lactosérum dépendait des ferments lactiques utilisés.

Toutefois, l'essentiel lors d'une hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires est la qualité des peptides engendrés et non pas leur quantité. Afin de compléter cette caractérisation, un fractionnement électrophorétique ou chromatographique des hydrolysats

protéiques est nécessaire et les profils peptidiques ainsi obtenus permettront de comparer l'action de ces enzymes sur un même substrat.

#### **3.5.4. Analyse des hydrolysats par électrophorèse SDS-PAGE**

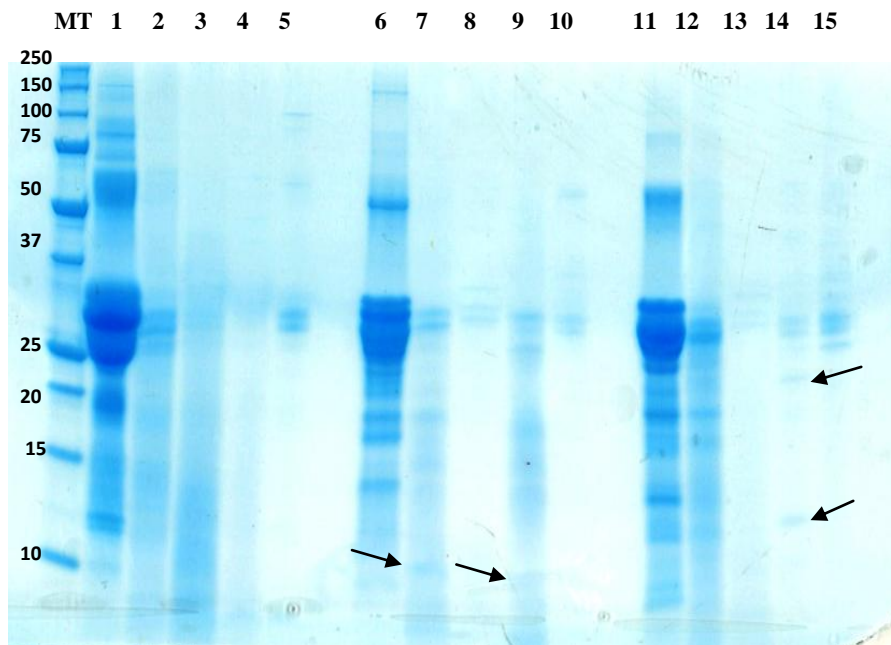
La méthode électrophorétique est très utilisée pour mettre en évidence l'activité protéolytique, elle nous permet d'évaluer qualitativement l'hydrolyse des caséines, et de déterminer les poids moléculaires des fractions peptidiques qui en résultent.

L'hydrolyse des caséines par les protéases bactériennes et la trypsine a été révélée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (12%) en présence de SDS suivant la méthode de **Laemmli (1970)**.

Les profils d'hydrolyse des caséines sont comparés au profil des caséines non hydrolysées. Par référence à la mobilité électrophorétique des caséines, les trois bandes correspondent, par ordre, aux : caséine  $\alpha$ , caséine  $\beta$  et caséine  $\kappa$  (**Figure 26**). L'intensité de la coloration des bandes correspondant aux caséines est très faible sinon absente après 24 heures de réaction comparativement aux caséines totales non hydrolysées. Ces résultats sont cohérents avec le résultat obtenu par caractérisation quantitative de l'hydrolyse des caséines qui ont montré un maximum d'hydrolyse atteint à 24h de réaction.

Cette étude a également montré une spécificité de substrat. On constate que la fraction enzymatique de la souche CHTD27 est plus active sur la caséine bovine (ligne 3) que sur les deux autres types de caséines (lignes 9 et 14) alors que les fractions enzymatiques des souches BH14 et LCL, dégradent les trois types de caséines de la même manière. Les protéases de *Lactobacillus brevis* CHTD27 hydrolysent préférentiellement la caséine bovine. On remarque que les caséines sont totalement hydrolysées par la trypsine après 24h de réaction car les bandes correspondant aux (CN- $\alpha$ , CN- $\beta$  et CN- $\kappa$ ) sont complètement disparues.

Les lignes 07 et 09 montrent l'apparition d'une bande d'un poids moléculaire de 10 kDa correspondant à un nouveau fragment peptidique. De la même manière, on observe sur la ligne 14 qu'il y a apparition de deux bandes qui correspondent aux nouveaux fragments peptidiques de poids moléculaires (20 kDa et 12 kDa) inférieurs au PM des caséines.



**Figure 26:** Profil électrophorétique SDS-PAGE sur un gel polyacrylamide 12% des produits de dégradation des caséines totales par les fractions enzymatiques et par la trypsine après 24 heures de réaction.

**MT :** marqueur de taille, **1 :** CN bovine commerciale, **2 :** hydrolysats de la CN bovine commerciale par les protéases issues de la souche BH14, **3 :** hydrolysats de la CN bovine commerciale par la trypsine, **4 :** hydrolysats de la CN bovine commerciale par les protéases issues de la souche CHTD27, **5 :** hydrolysats de la CN bovine commerciale par les protéases issues de la souche LCL, **6 :** CN totale de brebis, **7 :** hydrolysats de la CN totale de brebis par les protéases issues de la souche BH14, **8 :** hydrolysats de la CN totale de brebis par la trypsine, **9 :** hydrolysats de la CN totale de brebis par les protéases issues de la souche CHTD27, **10 :** hydrolysats de la CN totale de brebis par les protéases issues de la souche LCL, **11 :** CN totale de chamelle, **12 :** hydrolysats de la CN totale de chamelle par les protéases issues de la souche BH14, **13 :** hydrolysats de la CN totale de chamelle par la trypsine, **14 :** hydrolysats de la CN totale de chamelle par les protéases issues de la souche CHTD27, **15 :** hydrolysats de la CN totale de chamelle par les protéases issues de la souche LCL. → bandes correspondantes aux nouveaux fragments peptidiques.

L'activité des différentes fractions enzymatiques se traduit par la dégradation des caséines donnant naissance à de nouveaux fragments peptidiques. Néanmoins le bleu de Coomassie R250 est peu sensible pour détecter les entités protéiques dont le poids moléculaire est très faible.

De nombreux auteurs ont utilisé l'électrophorèse SDS-PAGE pour révéler l'hydrolyse enzymatique des caséines. Une hydrolyse dominante des caséines  $\beta$  et  $\alpha$  a été notée alors que l'hydrolyse des caséines totales reste faible (Shin *et al.*, 2004).

Chez *Lc. lactis*, la protéase PrtP liée à la paroi est capable d'hydrolyser 40 % des liaisons peptidiques de la caséine  $\beta$ , libérant ainsi plus de cent oligopeptides différents (Juillard *et al.*, 1995 ; Pescuma *et al.*, 2008).

Chez le genre *Lactobacillus*, la spécificité des protéases pour les caséines diffère d'une espèce à l'autre, les caséines peuvent être dégradées sans aucune spécificité ou une préférence pour la caséine  $\beta$ , observée chez *Lb. helveticus* CNRZ32 ou les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\kappa$  chez *Lb. plantarum* et *Lb. casei* (Khalid et Marth, 1990 ; Ahmadova *et al.*, 2011).

A cette étape de notre étude nous avons montré que les préparations de protéases extracellulaires provenant des souches de *Lb. plantarum* BH14, *Lb. brevis* CHTD27 et *Lc. lactis* LCL se sont révélées appropriées pour hydrolyser *in-vitro* les caséines totales en raison de leur activité protéolytique notable.

On retrouve une corrélation des résultats obtenus entre les différentes méthodes d'évaluation qualitative et quantitative de la protéolyse des caséines. En effet, on déduit que les deux lactobacilles utilisés sont plus protéolytiques que le lactocoque. Leurs protéases sont capables d'hydrolyser *in-vitro* les caséines sans spécificité.

### **3.6. Identification et caractérisation des peptides issus de l'hydrolyse des caséines par Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse couplée à la Spectrométrie de Masse (RP-HPLC-MS/MS)**

Les peptides (PM <5 kDa) présents dans les hydrolysats, ont été analysés par RP-HPLC-MS/MS. Les séquences peptidiques correspondantes aux masses obtenues ont été déterminées en employant le logiciel Biotoools Version 3.2 (Bruker). Les principaux composants peptidiques de chaque hydrolysats ont été identifiés et les résultats obtenus sont regroupés dans les **tableaux (10 à 21)**. Les chromatogrammes obtenus par HPLC et correspondants aux différents hydrolysats sont donnés en annexe 5.

### 3.6.1. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de brebis

Plusieurs fragments peptidiques ont été identifiés dans les hydrolysats de la caséine de brebis, 44 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases issues des cellules de la souche *Lb. brevis* CHTD27 (**Tableau 10**), 38 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lb. plantarum* BH14 (**Tableau 11**) et 40 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lc. Lactis* LCL (**Tableau 12**). Cependant, un plus grand nombre de peptides a été identifié dans les hydrolysats tryptiques (**Tableau 13**). A la suite de ces résultats, on constate que la caséine de brebis est plus sensible à l'action des protéases de la souche *Lb. brevis* et la souche *Lc. Lactis*, tandis que les protéases de la souche *Lb. plantarum* sont moins actives sur ce type de caséine.

Le lait de brebis est plus riche en caséine  $\alpha$  (environ 48%), que les autres laits animaux, il contient également 36% de la caséine  $\beta$  et 10 % de la caséine  $\kappa$  (**Farell et al., 2004**), cela explique la faible quantité de peptides issus de la caséine  $\kappa$  identifiés dans les différents hydrolysats, alors que la plupart des séquences identifiées dérivent de la caséine  $\alpha_{s1}$  et de la caséine  $\beta$ .

La spécificité d'hydrolyse des protéases vis-à-vis des caséines est variable chez les lactocoques et les lactobacilles (**Atlan et al., 2000**). En général, les protéases liées à la paroi bactérienne étudiées chez *Lactococcus* sont de type PI ou de type PIII selon leur spécificité pour le substrat (**Visser et al, 1986 ; Khalid et Marth, 1990**) : les protéases de type PI s'attaquent fortement à la caséine  $\beta$ , mais faiblement à la caséine  $\alpha_{s1}$ , alors que les protéases de type PIII dégradent les 3 types de caséines : la caséine  $\alpha_{s1}$ , la caséine  $\beta$  et la caséine  $\kappa$ . D'autres protéases ont été isolées à partir d'autres souches de lactocoques et posséderaient des spécificités intermédiaires entre les enzymes de type PI et PIII (**Kabadjova-Hristova et al., 2006 ; EL-Ghaish et al., 2010**).

Les hydrolysats des caséines de brebis révèlent des séquences peptiques au même nombre pour les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$ , cependant les hydrolysats obtenus par les protéases issues des bactéries de la souche *Lb. brevis* CHTD27 montrent une hydrolyse dominante de la caséine  $\beta$ . Ce qui laisse suggérer que les protéases de la souche *Lb. brevis* sont de type PI, et les protéases des souches *Lb. plantarum* BH14 et *Lc. lactis* LCL sont de types PIII.

**Tableau 10 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de brebis produits par les protéases extracellulaires de *Lb. brevis* CHTD27.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
805.2	805.4	$\beta$ -CN f (155 - 161)	VMFPQSQ		
817.3	817.5	$\beta$ -CN f (127 - 133)	LTDVEKL		
1197.4	1197.7	$\beta$ -CN f (77 - 87)	LTQTPVVVPPF		
1015.4	1015.5	$\beta$ -CN f (190 - 198)	<b>LYQEPVLGP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
780.3	780.5	$\beta$ -CN f (170 - 176)	<b>VLPVPQK</b>	Antioxydante	Rival <i>et al.</i> , (2001)
714.7	1428.7	$\beta$ -CN f (143 - 154)	WMHQPPQPLPPT		
689.3	689.4	$\beta$ -CN f (133 - 138)	<b>LHLPLP</b>	ECA-inhibitrice	Quirós <i>et al.</i> , (2007)
632.2	632.3	$\beta$ -CN f (44 - 48)	ELQDK		
657.2	657.4	$\beta$ -CN f (82 - 87)	<b>VVVPPE</b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
902.3	902.5	$\beta$ -CN f (191 - 198)	<b>YQEPVLGP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
762.2	762.4	$\beta$ -CN f (189 - 194)	<b>LLYQEP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
891.4	1782.0	$\beta$ -CN f (189 - 204)	<b>LLYQEPVLGPVVRGPFPP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
1128.4	1128.6	$\beta$ -CN f (189 - 198)	<b>LLYQEPVLGP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
785.3	785.5	$\beta$ -CN f (199 - 205)	<b>VRGPFPI</b>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
742.3	742.4	$\beta$ -CN f (201 - 207)	GPFPILV		
745.2	745.4	$\beta$ -CN f (62 - 68)	FTGPIPN		
1084.4	1084.6	$\beta$ -CN f (78 - 87)	TQTPVVVPPF		
751.2	751.4	$\beta$ -CN f (114 - 119)	<b>YPVEPE</b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
557.9	558.3	$\beta$ -CN f (68 - 72)	<b>NSLPQ</b>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
572.0	572.3	$\beta$ -CN f (165 - 169)	LSQPK		
747.3	747.4	$\beta$ -CN f (43 - 48)	DELQDK		
997.2	997.6	$\beta$ -CN f (199 - 207)	VRGPFPILV		
748.3	748.4	$\beta$ -CN f (108 - 113)	<b>EMPFPIK</b>	ECA-inhibitrice	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , (1998)
871.3	871.5	$\beta$ -CN f (162 - 169)	VLSLSQPK		
758.3	758.4	$\alpha$ s1-CN f (24 - 30)	VVAPFPE		
1014.3	1014.5	$\alpha$ s1-CN f (11 - 19)	LSPEVLNEN		
1055.3	1055.5	$\alpha$ s1-CN f (181 - 190)	<b>DIPNPIGSE</b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
735.2	735.4	$\alpha$ s1-CN f (41 - 47)	SKDIGSE		
905.3	905.5	$\alpha$ s1-CN f (23 - 30)	FVVAPFPE		
854.3	854.4	$\alpha$ s1-CN f (164 - 169)	WYYLPL		
941.3	941.5	$\alpha$ s1-CN f (181 - 189)	<b>DIPNPIGSE</b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
887.2	887.4	$\alpha$ s1-CN f (173 - 180)	YTDAPSFS		
702.2	702.3	$\alpha$ s1-CN f (85 - 90)	DVPSEK		
724.1	724.3	$\alpha$ s1-CN f (174 - 180)	YTDAPSFS		
653.2	653.3	$\alpha$ s1-CN f (173 - 178)	YTDAPS		
771.2	771.4	$\alpha$ s1-CN f (11 - 17)	LSPEVLN		
791.2	791.4	$\alpha$ s1-CN f (186 - 193)	IGSENSGK		
678.3	678.4	$\alpha$ s1-CN f (31 - 35)	VFRKE		
1186.4	1186.6	$\alpha$ s2-CN f (101 - 110)	YQGPIVLNPW		
973.3	973.5	$\alpha$ s2-CN f (90 - 96)	YQKFPQY		
1299.5	1299.7	$\alpha$ s2-CN f (100 - 110)	LYQGPIVLNPW		
962.3	962.5	K-CN f (55 - 61)	FLPYPPY		
742.2	742.4	k-CN f (34 - 39)	RYPSYG		
799.2	799.4	K-CN f (55 - 60)	FLPYPY		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

**Tableau 11 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de brebis produits par les protéases s extracellulaires de *Lb. plantarum* BH14.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
947.8	1895.1	β-CN f (190 – 206)	LYQEPVLGPVRGPFPIIL		
891.3	1782.0	β-CN f (191 – 206)	YQEPVLGPVRGPFPIIL		
997.8	1994.1	β-CN f (190 – 207)	LYQEPVLGPVRGPFPIIV		
1015.4	1015.5	β-CN f (190 – 198)	<b>LYQEPVLGP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
1242.4	1242.6	β-CN f (144 – 154)	MHQPPQPLPPT		
657.1	657.4	β-CN f (82 – 87)	<b>VVVVPE</b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
940.8	1881.1	β-CN f (191 – 207)	YQEPVLGPVRGPFPIIV		
805.2	805.4	β-CN f (155 – 161)	VMFPQPS		
817.3	817.5	β-CN f (127 – 133)	LTDVEKL		
747.1	747.4	β-CN f (43 – 48)	DELQDK		
1128.3	1128.6	β-CN f (189 – 198)	<b>LLYQEPVLGP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
745.2	745.4	β-CN f (62 – 68)	FTGPIPN		
715.1	1428.7	β-CN f (143 – 154)	WMHQPPQPLPPT		
649.1	649.3	β-CN f (190 – 194)	<b>LYQEP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
632.2	632.3	β-CN f (44 – 48)	ELQDK		
762.2	762.4	β-CN f (189 – 194)	<b>LLYQEP</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
1084.4	1084.6	β-CN f (78 – 87)	TQTPVVVPPF		
905.3	905.5	αs1-CN f (23 – 30)	FVVAPFPE		
758.2	758.4	αs1-CN f (24 – 30)	VVAPFPE		
1151.4	1151.6	αs1-CN f (23 – 32)	FVVAPFPEVF		
1014.3	1014.5	αs1-CN f (11 – 19)	LSPEVLNEN		
865.2	865.4	αs1-CN f (85 – 91)	DVPSERY		
1055.3	1055.5	αs1-CN f (181 – 190)	<b>DIPNPIGSEN</b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
665.1	665.3	αs1-CN f (156 – 161)	LDAYPS		
752.1	752.3	αs1-CN f (125 – 131)	EGNPAHQ		
724.2	724.3	αs1-CN f (174 – 180)	TDAPSFS		
887.1	887.4	αs1-CN f (173 – 180)	YTDAPSFS		
678.2	678.4	αs1-CN f (31 – 35)	VFRKE		
771.2	771.4	αs1-CN f (11 – 17)	LSPEVLN		
680.2	680.4	αs1-CN f (80 – 84)	YIQKE		
602.2	602.3	αs1-CN f (16 – 20)	<b>LNENL</b>	Anticancéreuse	Juillerat-Jeanneret <i>et al.</i> , (2011)
791.3	791.4	αs1-CN f (186 – 193)	IGSENSGK		
1186.4	1186.6	αs2-CN f (101 – 110)	YQGPIVLNPW		
973.3	973.5	αs2-CN f (90 – 96)	YQKFPQY		
1197.1	3588.8	αs2-CN f (123 – 153)	TVNREQLSTSEENSKKTIDMESTEVFTKTKT		
690.2	690.3	αs2-CN f (117 – 123)	AGPFTPT		
962.2	962.5	K-CN f (55 – 61)	FLPYPPY		
799.2	799.4	K-CN f (55 – 60)	FLPYPY		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.



**Tableau 12 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de brebis produits par les protéases extracellulaires de *Lc. lactis* LCL.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
859.3	1718.0	β-CN f (192 – 207)	QEPVLGPVRGPFPILV		
821.2	821.4	β-CN f (182 – 188)	DMPQAF		
704.2	704.4	β-CN f (100 – 105)	ETMVPK		
802.4	802.5	β-CN f (133 – 139)	<b>LHLPLPL</b>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
947.8	1895.1	β-CN f (189 – 205)	<b>LLYQEPVLGPVRGPFPI</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
941.2	1881.1	β-CN f (191 – 207)	YQEPVLGPVRGPFPILV		
780.3	780.5	β-CN f (170 – 176)	<b>VLPVPQK</b>	Antioxydante	Rival <i>et al.</i> , (2001)
879.3	879.5	β-CN f (113 – 119)	<b>KYPVEPF</b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
748.2	748.4	β-CN f (108 – 113)	<b>EMPFPK</b>	ECA-inhibitrice	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , (1998)
742.3	742.4	β-CN f (201 – 207)	GPFPILV		
650.2	650.3	β-CN f (140 – 144)	VQSWM		
745.1	745.4	β-CN f (62 – 68)	FTGPIN		
725.1	725.4	β-CN f (57 – 62)	SLVYPF		
866.3	866.5	β-CN f (193 – 200)	<b>EPVLGPVR</b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
751.2	751.4	β-CN f (114 – 119)	<b>YPVEPF</b>	ECA-inhibitrice et DPPIV inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> (2007 ; Nongonierma <i>et al.</i> , (2016a)
905.3	905.5	αs1-CN f (23 – 30)	FVVPFPE		
885.3	885.4	αs1-CN f (91 – 97)	YLGYLEQ		
1151.4	1151.6	αs1-CN f (23 – 32)	FVVPFPEVF		
1270.3	1270.6	αs1-CN f (155 – 165)	QLDAYPSGAWY		
776.3	776.4	αs1-CN f (23 – 29)	FVVPFP		
954.3	954.5	αs1-CN f (166 – 173)	YLPLGTQY		
946.3	946.5	αs1-CN f (35 – 42)	ENINELSK		
823.3	823.4	αs1-CN f (146 – 151)	YPQLFR		
831.3	831.4	αs1-CN f (84 – 90)	EDVPSE		
760.3	760.4	αs1-CN f (194 – 199)	ITMPLW		
793.2	793.4	αs1-CN f (155 – 161)	QLDAYPS		
664.2	664.3	αs1-CN f (53 – 58)	AMEDAK		
1142.3	1142.5	αs1-CN f (156 – 165)	LDAYPSGAWY		
791.2	791.4	αs1-CN f (167 – 173)	LPLGTQY		
923.3	923.6	αs1-CN f (107 – 114)	PQLEIVPK		
861.3	861.5	αs1-CN f (103 – 109)	KYNVPQL		
758.2	758.4	αs1-CN f (17 – 22)	<b>NENLLR</b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
678.2	678.3	αs2-CN f (199 – 204)	<b>TNAIPY</b>	Antibactérienne	Lopez-Exposito <i>et al.</i> , (2006)
1074.5	1074.5	αs2-CN f (7 – 16)	VSSSEEPINI		
811.2	811.4	αs2-CN f (175 – 180)	<b>FAWPOY</b>	Antibactérienne	Lopez-Exposito <i>et al.</i> , (2006)
929.3	929.5	αs2-CN f (168 – 174)	<b>ISQYYQK</b>	Antibactérienne	Lopez-Exposito <i>et al.</i> , (2006)
948.2	948.5	αs2-CN f (82 – 89)	ALNEINQF		
667.2	667.3	αs2-CN f (93 – 97)	FPQYL		
796.2	796.4	K-CN f (25 – 30)	<b>YIPIQY</b>	ECA-inhibitrice	Gomez-Ruiz <i>et al.</i> , (2007)
904.3	904.5	K-CN f (134 – 142)	STPTTEAVV		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.



**Tableau 13 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de brebis produits par la trypsine.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
855.3	855.5	β-CN f (80 – 87)	<b><u>TPVVVPPE</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
805.2	805.4	β-CN f (155 - 161)	VMFPQSQ		
861.3	861.5	β-CN f (190 – 196)	<b><u>LYQEPVL</u></b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
714.7	1428.7	β-CN f (143 – 154)	WMHQPPQPLPPT		
968.4	968.6	β-CN f (80 – 88)	<b><u>TPVVVPPEFL</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
751.2	751.4	β-CN f (114 – 119)	<b><u>YPVEPE</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
780.4	780.5	β-CN f (170 – 176)	<b><u>VLPVPQK</u></b>	antioxydante	Rival <i>et al.</i> , (2001)
689.3	689.4	β-CN f (133 – 138)	<b><u>LHLPLP</u></b>	ECA-inhibitrice	Quirós <i>et al.</i> , (2007)
745.2	745.4	β-CN f (62 – 68)	FTGPIPN		
821.2	821.4	β-CN f (182 – 188)	DMPQAF		
704.2	704.4	β-CN f (100 – 105)	ETMVPK		
643.2	643.4	β-CN f (201 – 206)	GPFPIL		
604.2	604.3	β-CN f (114 – 118)	<b><u>YPVEP</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
884.3	884.5	β-CN f (46 – 52)	QDKHPF		
748.2	748.4	β-CN f (108 – 113)	<b><u>EMFPK</u></b>	ECA-inhibitrice	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , (1998)
994.4	994.6	β-CN f (192 – 200)	<b><u>QEPVLGPVR</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
770.3	770.5	β-CN f (82 – 88)	<b><u>VVVPPEFL</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
742.3	742.4	β-CN f (201 – 207)	GPFPILV		
598.1	598.3	β-CN f (63 – 68)	TGPIPN		
1124.4	1124.6	β-CN f (82 – 91)	VVVPPEFLQPE		
832.2	832.4	β-CN f (62 – 69)	FTGPIPN		
640.3	640.4	β-CN f (195 – 200)	<b><u>VLGPVR</u></b>	ECA-inhibitrice	Meisel., (1993)
585.2	585.4	αs1-CN f (110 – 114)	EIVPK		
1004.3	1004.5	αs1-CN f (24 – 32)	VVAPFPEVF		
923.4	923.6	αs1-CN f (107 – 114)	PQLEIVPK		
905.3	905.5	αs1-CN f (23 – 30)	FVAPFPE		
885.2	885.4	αs1-CN f (91 – 97)	YLGYLEQ		
946.3	946.5	αs1-CN f (35 – 42)	ENINELSK		
1151.4	1151.6	αs1-CN f (23 – 32)	FVAPFPEVF		
905.3	905.5	αs1-CN f (25 – 32)	<b><u>VAPFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice	Tauzin <i>et al.</i> , (2002)
831.2	831.4	αs1-CN f (84 – 90)	EDVPSER		
806.3	806.4	αs1-CN f (26 – 32)	<b><u>APFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice	Tauzin <i>et al.</i> , (2002)
862.2	862.4	αs1-CN f (104 – 110)	YNVPQLE		
758.3	758.4	αs1-CN f (17 – 22)	<b><u>NENLLR</u></b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
698.2	698.4	αs1-CN f (152 – 156)	QFYQL		
787.2	787.4	αs1-CN f (12 – 18)	SPEVLNE		
891.3	891.5	αs1-CN f (27 – 33)	PFPEVFR		
638.2	638.3	αs1-CN f (28 – 32)	<b><u>FPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice	Van der Ven, (2002)
664.2	664.3	αs1-CN f (53 – 58)	AMEDAK		
1029.2	1029.4	αs1-CN f (157 – 165)	DAYPSGAWY		
793.2	793.4	αs1-CN f (155 – 161)	QLDAYPS		
665.3	665.4	αs1-CN f (94 – 98)	YLEQL		
939.2	939.4	αs1-CN f (170 – 178)	GTQYTDAPS		
733.2	733.4	αs1-CN f (104 – 109)	YNVPQL		
731.2	731.4	αs1-CN f (35 – 40)	ENINEL		
758.2	758.4	αs1-CN f (24 – 30)	VVAPFPE		
776.2	776.4	αs1-CN f (23 – 29)	FVAPFP		
757.2	757.4	αs1-CN f (91 – 96)	<b><u>YLGYLE</u></b>	Opioïde	Meisel, (1998)
588.2	588.3	αs1-CN f (27 – 31)	PFPEV		
835.4	835.5	αs1-CN f (92 - 98)	LGYLEQL		
652.2	652.3	αs2-CN f (56 – 60)	<b><u>LPYPY</u></b>	ECA-inhibitrice	Gomez-Ruiz <i>et al.</i> , (2007)
1139.3	1139.5	αs2-CN f (35 – 43)	YPSYGLNYY		
799.3	799.4	αs2-CN f (55 – 60)	FLPYPY		
780.4	780.5	αs2-CN f (78 – 85)	VLPNAVPA		
664.2	664.3	αs2-CN f (165 – 170)	<b><u>QVTSTE</u></b>	Antithrombotique	Quian <i>et al.</i> , (1995)
884.3	884.5	K-CN f (192 – 198)	<b><u>KPWTPQK</u></b>	Antibactérienne	Lopez-Exposito <i>et al.</i> , (2006)
747.3	1493.8	K-CN f (102 – 114)	QGPVLPNPWDQVK		
672.3	672.4	K-CN f (66 – 71)	APEEVK		
804.2	804.4	K-CN f (116 – 123)	NAGPFTPT		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

### 3.6.2. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine bovine

Le nombre de séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine bovine est moins important que celui dans les hydrolysats de la caséine de brebis. 32 séquences ont été identifiées dans les hydrolysats obtenus par les protéases issues des bactéries de la souche *Lc. Lactis* LCL (**Tableau 14**), 26 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases de *Lb. brevis* CHTD27 (**Tableau 15**), seulement 11 séquences ont été identifiées dans les hydrolysats obtenus par les protéases de *Lb. plantarum* BH14 (**Tableau 16**) et 40 séquences peptidiques ont été identifiées dans les hydrolysats tryptiques (**Tableau 17**). D'après les résultats obtenus, on remarque que la caséine bovine est plus accessible aux protéases issues du lactocoque LCL que les protéases des deux lactobacilles CHTD27 et BH14.

Selon **Farell et al., (2004)**, la caséine bovine contient 36% de la caséine  $\alpha_{s1}$ , 10% de la caséine  $\alpha_{s2}$ , 34% de la caséine  $\beta$  et 13% de la caséine  $\kappa$ . ce qui explique la faible proportion des séquences peptidiques correspondantes à la caséine  $\kappa$  identifiées dans les différents hydrolysats, alors que la plupart des séquences identifiées dérivent de la caséine  $\alpha_{s1}$  et de la caséine  $\beta$ .

Il semble que les protéases issues des bactéries de la souche *Lb. brevis* CHTD27 hydrolysent préférentiellement la caséine  $\beta$ , les protéases de *Lc. lactis* LCL hydrolysent avec la même efficacité les caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\beta$  alors que les protéases de *Lb. plantarum* BH14 sont moins actives sur ces caséines. Cela confirme que les protéases de la souche *Lb. brevis* sont de type PI, et les protéases des souches *Lb. plantarum* et *Lc. lactis* sont de type PIII.

**Tableau 14:** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de *Lb. brevis* CHTD27.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
1015.5	1015.5	$\beta$ -CN f (192 – 200)	<u>LYQEPVLGP</u>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
1104.6	1104.6	$\beta$ -CN f (155 – 164)	VMFPPQSVLS		
908.6	908.6	$\beta$ -CN f (169 – 176)	<u>KVLPVPQK</u>	Antioxydante	Rival <i>et al.</i> , (2001)
773.2	773.4	$\beta$ -CN f (88 – 94)	LQPEVMG		
1213.6	1213.7	$\beta$ -CN f (58 – 68)	<u>LVYFPFGPIPN</u>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
1100.5	1100.6	$\beta$ -CN f (59 – 68)	<u>VYFPFGPIPN</u>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
762.2	762.4	$\beta$ -CN f (191 – 196)	<u>LLYQEP</u>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
743.2	743.4	$\beta$ -CN f (181 – 186)	<u>PORDMP</u>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
802.5	802.5	$\beta$ -CN f (133 – 139)	<u>LHLPLPL</u>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
649.1	649.3	$\beta$ -CN f (192 – 196)	<u>LYQEP</u>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
788.4	788.4	$\beta$ -CN f (1 – 6)	<u>RELEEL</u>	Immunomodulatrice	Coste <i>et al.</i> , (1992)
805.4	805.4	$\beta$ -CN f (155 – 161)	VMFPPQS		
1128.6	1128.6	$\beta$ -CN f (191 – 200)	<u>LLYQEPVLGP</u>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
806.3	806.4	$\alpha$ s1-CN f (24 – 30)	<u>FVAPFPE</u>	ECA-inhibitrice	Karaki <i>et al.</i> , (1990)
866.3	866.4	$\alpha$ s1-CN f (157 – 164)	<u>DAYPSGAW</u>	ECA-inhibitrice	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , (1998)
979.4	979.5	$\alpha$ s1-CN f (156 – 164)	LDAYPSGAW		
940.5	940.5	$\alpha$ s1-CN f (165 – 172)	YYVPLGTQ		
865.4	865.4	$\alpha$ s1-CN f (85 – 91)	DVPSERY		
762.2	762.5	$\alpha$ s1-CN f (102 – 107)	KKYKVP		
701.2	701.4	$\alpha$ s1-CN f (15 – 20)	<u>VLNENL</u>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
869.5	869.5	$\alpha$ s1-CN f (10 – 17)	<u>GLPQEVLN</u>	Antibactérienne et immuno-modulatrice	Lahov <i>et al.</i> , (1996) ; Hayes <i>et al.</i> , (2007)
962.4	962.5	K-CN f (55 – 61)	FLPYPPY		
1041.5	1041.5	K-CN f (31 – 39)	VLSRYPSYG		
942.5	942.5	K-CN f (32 – 39)	LSRYPSYG		
742.2	742.4	K-CN f (34 – 39)	RYPSYG		
728.3	728.4	K-CN f (66 – 72)	<u>AVRSPAQ</u>	Antibactérienne	Lopez-Exposito <i>et al.</i> , (2006)

**Tableau 15 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de *Lb. plantarum* BH14.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
1100.3	1100.6	$\beta$ -CN f (59 – 68)	<u>VYFPFGPIPN</u>	ECA-inhibitrice	Pihlanto <i>et al.</i> , (2010)
889.4	889.5	$\beta$ -CN f (59 – 66)	<u>VYFPFGPI</u>	ECA-inhibitrice	Van der Ven, (1992)
788.3	788.4	$\beta$ -CN f (1 – 6)	<u>RELEEL</u>	Immunomodulatrice	Coste <i>et al.</i> , (1992)
568.1	568.3	$\beta$ -CN f (72 – 76)	<u>QNIPP</u>	ECA et DPPIV inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006) ; Ojeda <i>et al.</i> , (2014)
1019.3	2037.1	$\beta$ -CN f (18 – 34)	SSEESITRINKKIEKFQ		
806.2	806.4	$\alpha$ s1-CN f (26 – 32)	<u>APFPEVF</u>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Tauzin <i>et al.</i> , (2002) ; Juillerat-Jeanneret <i>et al.</i> , (2011)
845.2	1689.8	$\alpha$ s1-CN f (185 – 199)	PIGSENSEKTTMPLW		
679.2	679.4	$\alpha$ s1-CN f (5 – 10)	<u>PIKHQG</u>	Antibactérienne	Lahov <i>et al.</i> , (1996)
679.6	1358.6	$\alpha$ s1-CN f (180 – 192)	<u>SDIPNPIGSENSE</u>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
886.3	886.4	$\alpha$ s2-CN f (107 – 113)	NPWDQVK		
754.1	754.3	$\alpha$ s2-CN f (47 – 52)	ANELEY		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

**Tableau 16:** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine bovine produits par les protéases extracellulaires de *Lc. lactis* LCL.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
968.4	968.6	$\beta$ -CN f (80 – 88)	<b><u>TPVVVPPFL</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
937.3	937.5	$\beta$ -CN f (103 – 110)	APKHKEMP		
855.3	855.5	$\beta$ -CN f (80 – 87)	<b><u>TPVVVPPF</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
976.3	976.5	$\beta$ -CN f (111 – 118)	FPKYPVEP		
805.1	805.4	$\beta$ -CN f (155 – 161)	VMFPQSQS		
780.3	780.5	$\beta$ -CN f (170 – 176)	<b><u>VLPVPQK</u></b>	Antioxydante	Rival <i>et al.</i> , (2011)
698.2	698.3	$\beta$ -CN f (119 – 124)	FTESQS		
652.2	652.4	$\beta$ -CN f (149 – 154)	QPLPPT		
1036.4	1036.5	$\beta$ -CN f (64 – 73)	<b><u>GPIPNSLPON</u></b>	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
742.3	742.4	$\beta$ -CN f (203 – 209)	GPFPPIV		
879.2	879.4	$\beta$ -CN f (109 – 115)	MPFPKYP		
604.1	604.3	$\beta$ -CN f (114 – 118)	<b><u>YPVEP</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
732.1	732.4	$\beta$ -CN f (113 – 118)	<b><u>KYPVEP</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
553.0	553.3	$\beta$ -CN f (73 – 77)	<b><u>NIPPL</u></b>	ECA-inhibitrice	Van der Ven, (2002)
806.2	806.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (24 – 30)	<b><u>FVAPFPE</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Karaki <i>et al.</i> , (1990) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
831.2	831.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (144 – 149)	<b><u>YFYPEL</u></b>	ECA-inhibitrice et antioxydante	De Gobba <i>et al.</i> , (2014) ; Suetsuna <i>et al.</i> , (2000)
950.4	950.5	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (32 – 39)	FGKEKVNE		
777.2	777.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (167 – 173)	VPLGTQY		
638.2	638.3	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (28 – 32)	<b><u>FPEVE</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Van der Ven, (2002) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
806.2	806.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (26 – 32)	<b><u>APFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Karaki <i>et al.</i> , (1990) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
905.3	905.5	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (25 – 32)	<b><u>VAPFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Karaki <i>et al.</i> , (1990) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
746.2	746.3	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (161 – 166)	SGAWYY		
962.3	962.5	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (25 – 33)	<b><u>VAPFPEVFG</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Karaki <i>et al.</i> , (1990) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
789.2	789.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (179 – 185)	FSDIPNP		
835.2	835.5	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (92 – 98)	LGYLEQL		
659.2	659.3	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (25 – 30)	<b><u>VAPFPE</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Karaki <i>et al.</i> , (1990) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
793.2	793.4	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (156 – 163)	LDAYPSGA		
730.2	730.3	$\alpha$ s <sub>1</sub> -CN f (184 – 190)	<b><u>NPIGSEN</u></b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
659.2	659.3	$\alpha$ s <sub>2</sub> -CN f (107 – 111)	NPWDQ		
589.2	589.3	$\alpha$ s <sub>2</sub> -CN f (14 – 18)	<b><u>IISQE</u></b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
962.3	962.5	K-CN f (55 – 61)	FLPYPPY		
815.2	815.4	K-CN f (56 – 61)	LPYPY		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

**Tableau 17 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de caséine bovine produits par la trypsine.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
968.6	968.6	$\beta$ -CN f (80 – 88)	<b><u>TPVVVPFL</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
748.4	748.4	$\beta$ -CN f (108 – 113)	<b><u>EMPPFK</u></b>	ECA-inhibitrice	Pihlanto-Leppala <i>et al.</i> , (1998)
770.5	770.5	$\beta$ -CN f (82 – 88)	<b><u>VVVPPFL</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
855.5	855.5	$\beta$ -CN f (80 – 87)	<b><u>TPVVVPF</u></b>	ECA-inhibitrice	Abubakar <i>et al.</i> , (1998)
746.4	746.4	$\beta$ -CN f (2 – 7)	<b><u>ELEELN</u></b>	Immunomodulatrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
747.3	747.4	$\beta$ -CN f (43 – 48)	DELQDK		
588.4	588.3	$\beta$ -CN f (115 – 119)	<b><u>PVEPF</u></b>	DPP-IV- inhibitrice	Nongonierma <i>et al.</i> , (2016)
742.5	742.4	$\beta$ -CN f (203 – 209)	<b><u>GPFPPIV</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
751.4	751.4	$\beta$ -CN f (114 – 119)	<b><u>YPVEPF</u></b>	DPP-IV- inhibitrice	Nongonierma <i>et al.</i> , (2016)
759.3	759.4	$\beta$ -CN f (183 – 188)	<b><u>RDMPIQ</u></b>	Antioxydante	De Gobba <i>et al.</i> , (2014)
649.4	649.4	$\beta$ -CN f (164 – 169)	<b><u>SLSQSK</u></b>	ECA-inhibitrice	Hayes <i>et al.</i> , (2007)
685.4	685.4	$\beta$ -CN f (204 – 209)	PFPIIV		
741.4	741.4	$\beta$ -CN f (62 – 68)	<b><u>FPGPIP</u></b>	DPP-IV- inhibitrice	Ojeda <i>et al.</i> , (2014)
742.4	742.4	$\beta$ -CN f (8 – 14)	<b><u>VPGEIVE</u></b>	ECA-inhibitrice	Van der Ven, (2002)
754.4	754.4	$\beta$ -CN f (150 – 156)	PLPPTVM		
791.4	791.4	$\beta$ -CN f (126 – 132)	TLTDVEN		
708.4	708.4	$\beta$ -CN f (80 – 86)	TPVVVP		
808.4	808.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (8 – 14)	<b><u>HQGLPQE</u></b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
579.3	579.3	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (30 – 34)	<b><u>EVFGK</u></b>	ECA-inhibitrice	Van der Ven, (2002)
806.4	806.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (26 – 32)	<b><u>APFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Tauzin <i>et al.</i> , (2002) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
638.3	638.3	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (28 – 32)	<b><u>FPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Tauzin <i>et al.</i> , (2002) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
905.4	905.5	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (25 – 32)	<b><u>VAPFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anticancéreuse	Tauzin <i>et al.</i> , (2002) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
654.3	654.3	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (125 – 130)	EGIIHAQ		
831.4	831.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (84 – 90)	EDVPSEK		
642.3	642.3	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (180 – 185)	<b><u>SDIPNP</u></b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
706.4	706.3	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (53 – 58)	AMEDIK		
759.3	759.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (133 – 139)	EPMIGVN		
758.5	758.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (17 – 22)	<b><u>NENLLR</u></b>	Antibactérienne	Hayes <i>et al.</i> , (2006)
735.4	735.4	$\alpha$ <sub>1</sub> -CN f (27 – 32)	<b><u>PFPEVF</u></b>	ECA-inhibitrice et anti cancéreuse	Tauzin <i>et al.</i> , (2002) ; Juillerat-J <i>et al.</i> , (2011)
886.4	886.4	$\alpha$ <sub>2</sub> -CN f (107 – 113)	NPWDQVK		
627.4	627.4	$\alpha$ <sub>2</sub> -CN f (117 – 122)	<b><u>VPITPT</u></b>	DPP-IV- inhibitrice	Ojeda <i>et al.</i> , (2014)
758.2	758.4	$\alpha$ <sub>2</sub> -CN f (27 – 33)	AINPSKE		
812.4	812.5	$\alpha$ <sub>2</sub> -CN f (115 – 122)	NAVPIPT		
868.3	868.3	$\alpha$ <sub>2</sub> -CN f (46 – 52)	NANEEY		
962.5	962.5	K-CN f (55 – 61)	FLPYPPY		
673.4	673.3	K-CN f (149 – 154)	<b><u>SPEVIE</u></b>	Antibactérienne	Malkoski <i>et al.</i> , (2001)
856.4	856.4	K-CN f (155 – 162)	<b><u>SPPEINTV</u></b>	Antibactérienne	Malkoski <i>et al.</i> , (2001)

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

### 3.6.3. Séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de chamelle

Les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine cameline varient selon la fraction enzymatique: seulement 16 séquences ont été identifiées dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lb. brevis* CHTD27 (**Tableau 18**), 35 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lb. plantarum* BH14 (**Tableau 19**) et 31 séquences dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lc. lactis* LCL (**Tableau 20**). L'hydrolyse de la caséine de chamelle par la trypsine a généré 42 séquences peptidiques (**Tableau 21**). Il en résulte que les protéases des souches *Lb. plantarum* et *Lc. lactis* sont les plus actives sur les caséines de lait de chamelle.

La caséine totale de lait de chamelle contient 22-38% de la caséine  $\alpha_{s1}$ , 9.5-21% de la caséine  $\alpha_{s2}$ , 28-65% de la caséine  $\beta$  et 3.5-5% de la caséine  $\kappa$  (Farell *et al.*, 2004), ce qui explique la faible proportion sinon l'absence des séquences peptidiques correspondantes à la caséine  $\kappa$  dans les différents hydrolysats. La majorité des séquences identifiées dérivent de la caséine  $\beta$  car la proportion de cette dernière est plus élevée dans la caséine de lait de chamelle, elle peut aller jusqu'à 65%.

**Tableau 18 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de *Lb. brevis* CHTD27.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
787.3	787.4	$\beta$ -CN f (220 – 226)	LHPVPQP	ECA-inhibitrice	Miguel <i>et al.</i> , (2006)
807.3	807.5	$\beta$ -CN f (178 – 184)	LLSLSQF		
802.3	802.5	$\beta$ -CN f (149 – 155)	<b>LHLPLPL</b>		
1069.2	1069.6	$\beta$ -CN f (161 – 169)	YQIPQVPVQ		
925.3	925.5	$\beta$ -CN f (90 – 97)	NFLPPLQP		
804.2	804.4	$\beta$ -CN f (67 – 73)	TFPQPQS		
1040.3	1040.5	$\beta$ -CN f (77 – 85)	SHTPIPIYP		
816.2	816.4	$\beta$ -CN f (79 – 85)	TEPIPIYP		
780.3	780.5	$\beta$ -CN f (186 – 192)	VLPVPQQ		
687.2	687.4	$\beta$ -CN f (110 – 115)	DVPKTK		
973.4	973.6	$\alpha_{s1}$ -CN f (46 – 54)	LAVVSPQIF		
860.4	860.5	$\alpha_{s1}$ -CN f (47 – 54)	AVVSPQIF		
1062.3	1062.5	$\alpha_{s1}$ -CN f (215 – 222)	TDVMPQWW		
816.2	816.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (167 – 173)	VTQPFQ		
721.1	21.4	K-CN f (48 – 53)	IQFVQS		
450.8	900.5	K-CN f (114 – 121)	RPSFIAIP		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

Le nombre des peptides correspondant aux fragments de la caséine  $\alpha_{s1}$  et la caséine  $\beta$  est le même dans les différents hydrolysats de la caséine de lait de chamelle, sauf dans les hydrolysats obtenus par les protéases de la souche *Lb. brevis* qui montrent un nombre plus élevé des peptides issus de la caséine  $\beta$ , ce qui confirme une fois de plus que les protéases de la souche *Lb. brevis* CHTD27 sont de type PI, et les protéases des souches *Lb. plantarum* BH14 et *Lc. lactis* LCL sont de type PIII.

**Tableau 19 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de *Lb. plantarum* BH14.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
870.5	870.4	$\beta$ -CN f (170 – 177)	TPMIPPQS		
787.4	787.4	$\beta$ -CN f (220 – 226)	LHPVPQP		
645.4	645.4	$\beta$ -CN f (130 – 135)	SPVVVF		
1040.5	1040.5	$\beta$ -CN f (77 – 85)	SHTPIYP		
804.4	804.4	$\beta$ -CN f (67 – 73)	TFPQPQS		
925.5	925.5	$\beta$ -CN f (90 – 97)	NFLPPLQP		
780.5	780.5	$\beta$ -CN f (186 – 192)	VLPVPQQ		
816.4	816.4	$\beta$ -CN f (79 – 85)	TEPIYP		
687.4	687.4	$\beta$ -CN f (110 – 115)	DVPKTK		
1069.6	1069.6	$\beta$ -CN f (161 – 169)	YQIPQVPQ		
882.5	882.5	$\beta$ -CN f (91 – 98)	FLPPLQPA		
660.4	660.3	$\beta$ -CN f (122 – 126)	RKEMP		
717.3	717.4	$\beta$ -CN f (67 – 72)	TFPQPQ		
664.2	664.4	$\beta$ -CN f (92 – 97)	LPPLQP		
996.6	996.6	$\beta$ -CN f (90 – 98)	NFLPPLQPA		
910.4	910.5	$\beta$ -CN f (17 – 23)	EKEEFKT		
811.5	811.5	$\beta$ -CN f (91 – 97)	FLPPLQP		
717.3	717.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (168 – 173)	TQFPFQ		
749.3	749.3	$\alpha_{s1}$ -CN f (27 – 32)	FQNEPD		
677.4	677.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (21 – 25)	LRYPE		
617.4	617.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (100 – 104)	DILKE		
852.3	852.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (154 – 160)	EDNHPQL		
660.4	660.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (16 – 20)	RPKYP		
848.4	848.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (26 – 32)	VFQNEPD		
816.4	816.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (167 – 173)	VTQFPFQ		
768.3	768.3	$\alpha_{s1}$ -CN f (200 – 206)	SYDTPEG		
877.4	877.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (207 – 215)	IASDGGKT		
864.4	864.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (168 – 174)	TQFPFQF		
733.4	733.3	$\alpha_{s1}$ -CN f (105 – 110)	DMPSQR		
832.3	832.4	$\alpha_{s1}$ -CN f (64 – 70)	DTRNEPT		
963.5	963.5	$\alpha_{s1}$ -CN f (167 – 174)	VTQFPFQF		
1172.5	3515.7	$\alpha_{s2}$ -CN f (50 – 80)	DICSTFCEEAVRNIKEVESAEVPTENKISQF		
925.1	925.3	$\alpha_{s2}$ -CN f (20 – 28)	DQGSSSEES		
808.4	808.4	$\alpha_{s2}$ -CN f (110 – 116)	AYPFIPT		
1371.6	2742.4	$\alpha_{s2}$ -CN f (85 – 107)	KFLQYLQALHQQIVMNPWDQGK		

**Tableau 20 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par les protéases extracellulaires de *Lc. lactis* LCL.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée*	Activité biologique rapportée	Références
880.3	880.6	$\beta$ -CN f (1151 – 158)	LPLPLLQS		
991.2	1981.0	$\beta$ -CN f (74 – 90)	LVYSHTPIPIYPILPQN		
1054.3	1054.6	$\beta$ -CN f (82 – 90)	IPYPILPQN		
875.2	875.5	$\beta$ -CN f (130 – 137)	SPVVPFTE		
802.2	802.5	$\beta$ -CN f (111 – 117)	VPKTKET		
945.3	945.5	$\beta$ -CN f (74 – 81)	LVYSHTEP		
787.2	787.4	$\beta$ -CN f (220 – 226)	LHPVPQP		
844.2	844.5	$\beta$ -CN f (84 – 90)	YPILPQN		
989.2	989.5	$\beta$ -CN f (159 – 166)	LMYQIPQP		
778.3	778.4	$\beta$ -CN f (163 – 169)	IPQVPVQ		
803.2	803.5	$\beta$ -CN f (148 – 154)	<b>NLHLPLP</b>	ECA-inhibitrice	Kohmura <i>et al.</i> , (1989)
759.2	759.4	$\beta$ -CN f (194 – 199)	<b>VPYPQQR</b>	ECA-inhibitrice	Maruyama <i>et al.</i> , (1989)
807.3	807.5	$\beta$ -CN f (178 – 184)	LLSLSQF		
832.1	832.4	$\beta$ -CN f (75 – 81)	VYSHTEP		
665.2	665.4	$\beta$ -CN f (49 – 53)	FKIEE		
660.2	660.4	$\beta$ -CN f (178 – 183)	LLSLSQ		
793.4	793.5	$\beta$ -CN f (151 – 157)	LPLPLLQ		
934.3	934.5	$\alpha$ s1-CN f (52 - 58)	IQFRQEN		
654.0	654.3	$\alpha$ s1-CN f (23 – 27)	YPEVF		
660.2	660.4	$\alpha$ s1-CN f (16 – 20)	RPKYP		
786.1	786.4	$\alpha$ s1-CN f (143 – 148)	HPYLEQ		
885.2	885.4	$\alpha$ s1-CN f (180 – 186)	SPYVAWY		
796.2	796.4	$\alpha$ s1-CN f (112 – 117)	LEELHR		
816.3	816.4	$\alpha$ s1-CN f (140 – 146)	LSSHPLYL		
1062.3	1062.5	$\alpha$ s1-CN f (215 – 222)	TDVMPQWW		
777.2	777.4	$\alpha$ s1-CN f (177 – 184)	LGASPYVA		
854.2	854.4	$\alpha$ s2-CN f (167 - 172)	FLWPEY		
660.2	660.3	$\alpha$ s2-CN f (115 – 120)	PTVNTE		
653.2	653.3	$\alpha$ s2-CN f (92 – 97)	ALHQGGQ		
854.2	854.4	$\alpha$ s2-CN f (167 – 172)	FLWPEY		
766.2	766.4	K-CN f (76 – 81)	IPYPNY		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.



**Tableau 21 :** Identification par RP-HPLC-MS/MS des peptides dans les hydrolysats de la caséine de chamelle produits par la trypsine.

Masse observée	Masse calculée	CN fragment	Séquence identifiée *	Activité biologique rapportée	Références
940.4	940.6	$\beta$ -CN f (82 – 89)	IPYPILPQ		
1054.4	1054.6	$\beta$ -CN f (82 – 90)	IPYPILPQN		
957.3	957.6	$\beta$ -CN f (219 – 227)	GLHPVPQPL		
1194.4	1194.6	$\beta$ -CN f (167 – 177)	VPQTPMIPPQS		
844.3	844.5	$\beta$ -CN f (219 – 226)	GLHPVPQP		
809.2	809.4	$\beta$ -CN f (17 – 22)	EKEEFK		
880.2	880.4	$\beta$ -CN f (66 – 72)	YTFFPQPQ		
730.2	730.4	$\beta$ -CN f (84 – 89)	YPILPQ		
993.3	993.5	$\beta$ -CN f (65 – 72)	IYTFFPQPQ		
929.4	929.6	$\beta$ -CN f (114 – 121)	TKETIIPK		
925.3	925.5	$\beta$ -CN f (90 – 97)	NFLPPLQP		
836.3	836.5	$\beta$ -CN f (225 – 232)	QPLVPVIA		
773.2	773.4	$\beta$ -CN f (129 – 135)	QSPVVPF		
725.2	725.4	$\beta$ -CN f (38 – 43)	ITHINK		
700.3	700.4	$\beta$ -CN f (116 – 121)	ETIIPK		
682.3	682.4	$\beta$ -CN f (213 – 218)	VPDPVR		
759.2	759.4	$\beta$ -CN f (194 – 199)	<b>VPYPQR</b>	ECA-inhibitrice	Maruyama <i>et al.</i> , (1989)
812.3	812.5	$\beta$ -CN f (82 – 88)	IPYPILP		
886.3	886.5	$\beta$ -CN f (128 – 135)	LQSPVVPF		
730.2	730.4	$\beta$ -CN f (124 – 129)	EMPLLQ		
780.3	780.5	$\beta$ -CN f (186 – 192)	VLPVPQQ		
890.3	890.5	$\beta$ -CN f (193 – 199)	MVPYPQR		
1018.2	1018.5	$\beta$ -CN f (192 – 199)	QMVYPYQR		
652.2	652.4	$\beta$ -CN f (225 – 230)	QPLVPV		
646.2	646.3	$\beta$ -CN f (50 – 54)	KIEEQ		
735.2	735.4	$\beta$ -CN f (92 – 98)	LPPLQPA		
1081.3	2161.2	$\beta$ -CN f (5 – 23)	ILACRVALALAREKEEFT		
645.2	645.4	$\beta$ -CN f (130 – 135)	SPVVVF		
1023.3	1023.5	$\alpha$ s1-CN f (183 – 190)	VAWYPPQ		
924.2	924.4	$\alpha$ s1-CN f (184 – 190)	AWYPPQ		
776.2	776.4	$\alpha$ s1-CN f (207 – 214)	IASEDGGK		
915.3	915.5	$\alpha$ s1-CN f (166 – 173)	VVTQFPFQ		
816.3	816.4	$\alpha$ s1-CN f (167 – 173)	VTQFPFQ		
1062.3	1062.5	$\alpha$ s1-CN f (215 – 222)	TDVMPQWW		
734.1	734.4	$\alpha$ s1-CN f (187 – 192)	YPPQVM		
786.2	786.4	$\alpha$ s1-CN f (143 – 148)	HPYLEQ		
862.2	862.4	$\alpha$ s1-CN f (104 – 110)	EDMPQSQR		
853.2	853.4	$\alpha$ s1-CN f (185 – 190)	WYPPQ		
735.2	735.4	$\alpha$ s1-CN f (176 – 182)	QLGASPY		
782.2	782.4	$\alpha$ s1-CN f (23 – 28)	YPEVFQ		
844.3	844.5	$\alpha$ s1-CN f (14 – 20)	LARPKYP		
690.1	690.3	$\alpha$ s1-CN f (215 – 220)	TDVMPQ		

\*Les séquences données en gras sont celles qui partagent la même séquence ou une partie d'une séquence peptidique précédemment rapportée bioactive.

Les peptides identifiés dans les hydrolysats correspondent à des fragments issus des différentes fractions des caséines, des fragments dérivés de la caséine  $\beta$ , de la caséine  $\alpha_{s1}$ , de la caséine  $\alpha_{s2}$  et de la caséine  $\kappa$  ont été trouvés dans la plupart des cas. Le plus grand nombre de peptides a été trouvé dans les hydrolysats de la caséine de lait de brebis (40 à 60 séquences peptidiques identifiées dans chaque hydrolysat), ensuite les caséines de chamelle (entre 16 et 42 peptides), alors que les hydrolysats de la caséine bovine contiennent entre 10 et 37 peptides identifiés. Le nombre d'acides aminés des peptides identifiés varie de 5 à 30 résidus. Les séquences les plus longues (plus de 15 acides aminés) correspondent à la région C-

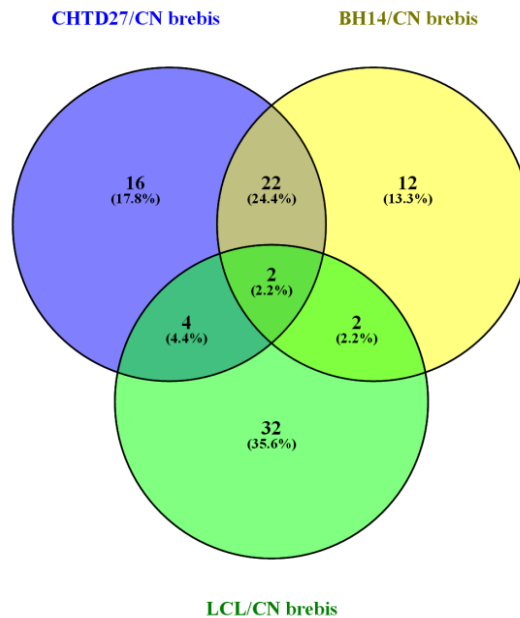
terminale de la caséine  $\beta$ , cela a été généralement observé dans les hydrolysats de la caséine de brebis. Cependant, des séquences courtes (moins de 8 résidus) ont été trouvées dans tous les hydrolysats.

Les profils peptidiques des hydrolysats diffèrent donc en fonction de la source de caséine et de l'enzyme protéolytique utilisée pour l'hydrolyse de ces protéines.

Les caséines de brebis et de chamelle ont été isolées au laboratoire tandis que la caséine bovine est un produit commercial dont le traitement industriel implique généralement un traitement thermique et un séchage dans des conditions oxydantes. Cela peut favoriser des changements chimiques tels que la racémisation des acides aminés, la réticulation ou la formation d'isopeptides qui diminuent leur susceptibilité à l'hydrolyse. Cela pourrait expliquer la différence dans le nombre de peptides identifiés entre les différentes espèces de caséines utilisées dans ce travail. De plus, les modifications post-traductionnelles, l'épissage alternatif du produit de gène ou le polymorphisme génétique sont responsables d'un certain degré d'hétérogénéité des caséines dans le lait de différentes espèces. Cette hétérogénéité se reflète dans l'identité des acides aminés qui composent les séquences de caséines et donc leur conformation native, ce qui influence, par conséquent les susceptibilités des caséines à l'hydrolyse enzymatique et à la génération de peptides bioactifs (Minervini *et al.*, 2003).

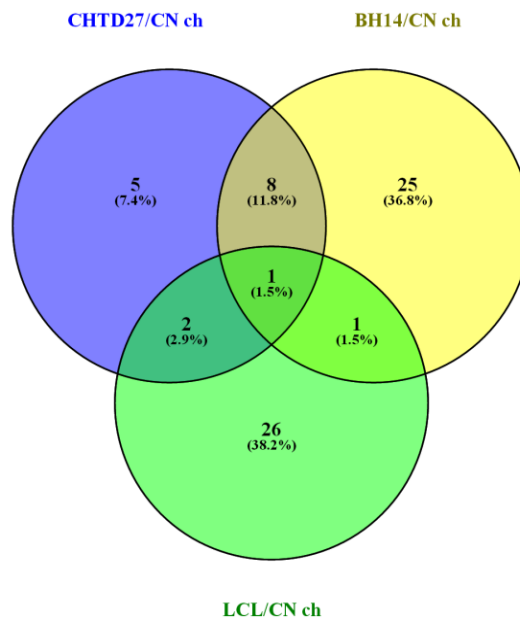
Selon les profils peptidiques identifiés dans les hydrolysats (le nombre et la longueur des séquences peptidiques), on observe une spécificité enzymatique pour les différentes fractions de caséines. La comparaison des peptides identifiés est représentée par les diagrammes (*Venn's diagrams*) dans les **figures 27, 28 et 29**. La comparaison a été faite par rapport à l'origine bactérienne des protéases extracellulaires impliquées dans l'hydrolyse, quelle que soit la source de la caséine.

Les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats d'une même caséine obtenus par l'action des protéases bactériennes laissent voir un chevauchement entre les hydrolysats obtenus par les protéases issues des deux lactobacilles. En effet, parmi tous les peptides générés de la caséine de brebis par ces deux protéases, 24.4% des peptides sont communs alors qu'un très faible taux (4.4%) est observé pour les hydrolysats de la même caséine mais obtenus par les protéases de *Lactobacillus* CHTD27 et de *Lactococcus* LCL (**Figure 27**).



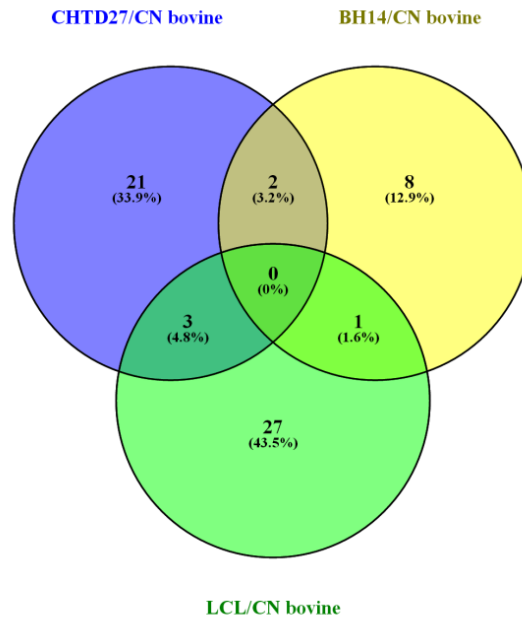
**Figure 27 :** Diagrammes (*Venn's diagrams*) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de brebis selon les protéases bactériennes utilisées.

De la même manière, on retrouve des peptides communs (11.8% du nombre total des peptides) dans les hydrolysats de la caséine de chamelle obtenus par les protéases des lactobacilles CHTD27 et BH14 (**Figure 28**), par contre les hydrolysats des caséines bovines obtenus par ces protéases bactériennes regroupent seulement 3.2% de peptides communs (**Figure 29**).



**Figure 28 :** Diagrammes (*Venn's diagrams*) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine de chamelle selon les protéases bactériennes utilisées.

**CN ch :** caséine de chamelle



**Figure 29 :** Diagrammes (*Venn's diagrams*) représentant les séquences peptidiques identifiées dans les hydrolysats de la caséine bovine selon les protéases bactériennes utilisées.

Ce résultat indique un comportement protéolytique différent pour *Lb. brevis* CHTD27, *Lb. plantarum* BH14 et *Lc. lactis* LCL quelle que soit l'origine de la caséine du lait, ovine, cameline ou bovine, leurs enzymes protéolytiques possèdent des sites de coupure communs et des sites de coupure spécifiques ce qui a conduit à la génération de nombreux et divers peptides issus de la même caséine dépendamment de l'origine de la protéase bactérienne.

Ces différences de profils peptidiques des hydrolysats provenant de la même source de caséine pourraient être attribuées aux différences génomiques entre *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* et *Lactococcus lactis*. Dans ce contexte, l'analyse d'hybridation comparative du génome a identifié des variations du système protéolytique de différentes bactéries lactiques qui indique que la protéolyse est souche dépendante (**Liu et al., 2010**).

**Yamamoto et al., (1994)** ont identifié 25 peptides issus de l'hydrolyse de la caséine  $\alpha_{s1}$  et de la caséine  $\beta$ , par la protéinase purifiée de la souche *Lb. helveticus* CP790, 11 peptides ont été identifiés dans un hydrolysats de la caséine  $\alpha_{s1}$ , produit par *Lb. helveticus* NCC619 (**Robert et al., 2004**). **Juillard et al., (1995)**, en étudiant l'hydrolyse de la caséine par la protéase PrtP purifiée de *Lc. Lactis* MG611 révèlent six peptides alors que **Flambard et al., (1998)**, en utilisant la même procédure, identifient trois peptides générés par action de la protéase de type PI de *Lc. lactis* sur la caséine. L'hydrolyse de la caséine par la protéase de

surface PrtP de *Lb. delbruckii subsp.lactis* ACA-DC178 génère quatre peptides (Tsakalidou *et al.*, 1999).

Les bioactivités des hydrolysats de protéines et des peptides dépendent largement des enzymes utilisées et également de la protéine à hydrolyser. Par conséquent, la recherche de sources de protéines et d'enzymes protéolytiques appropriées a attiré une attention croissante en raison du potentiel des hydrolysats et des peptides pour une application dans la science alimentaire, la technologie, la nutrition et la santé humaine. De nombreuses recherches ont été menées sur des peptides bioactifs dérivés de la caséine qui sont cryptés dans les structures primaires de la caséine intacte. Les peptides de caséine ne sont pas actifs dans la protéine native mais peuvent être libérés et activés pendant l'hydrolyse enzymatique, la fermentation microbienne et pendant la digestion gastro-intestinale (Phelan *et al.*, 2009 ; Corrêa *et al.*, 2014).

Dans cette étude, l'hydrolyse *in-vitro* des caséines extraites de laits de chamelle, de brebis ainsi que la caséine bovine par les protéases extracellulaires issues de *Lb. brevis* CHTD27, *Lb. plantarum* BH14 et *Lc. lactis* LCL, a été étudiée, car la plupart des travaux investis sur les bio-peptides ont été réalisés sur les protéines du lait de vache en utilisant les enzymes digestives et parfois les enzymes protéolytiques d'origine végétale. Néanmoins, seulement quelques travaux sur les caséines du lait de différentes espèces ont été rapportés.

Plusieurs bactéries lactiques ont été largement rapportées dans la littérature possédantes un système protéolytique efficace pour l'hydrolyse des protéines et la libération de peptides bioactifs, tels que *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis ssp. Diacety lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* and *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (Hernández-Ledesma *et al.*, 2011; De Castro *et al.*, 2015 ; Mohanty *et al.*, 2015). Cependant, les souches lactiques *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus platarum* n'ont pas été étudiées de manière approfondie, et la génération de peptides bioactifs par ces souches n'a pas été rapportée.

L'hydrolyse des caséines de brebis et bovines par l'action des protéases bactériennes et de la trypsine a permis d'obtenir plusieurs séquences peptidiques similaires à des séquences identifiées et rapportées par la littérature (base de données) biologiquement actives (Tableaux 10 à 21). Ce sont principalement les caséines  $\beta$  et  $\alpha_{s1}$  qui sont une source de peptides qui présentent une activité biologique. On retrouve ainsi des séquences précédemment identifiées

ECA inhibitrices, antioxydantes, antibactériennes, anticancéreuses, immunomodulatrices, antithrombotiques, DPP-IV inhibitrices et opioïde. Seuls 4 peptides identifiés à des activités inhibitrices de l'enzyme ECA ont pu être mis en évidence dans les hydrolysats de caséines de chamelle. Parmi ces 4 peptides, 3 ont été obtenus par hydrolyse sous l'action des protéases bactériennes et 1 seul par hydrolyse trypsique.

De nombreux autres fragments peptidiques identifiés dans les hydrolysats obtenus dans ce travail, n'ont pas été rapportés bioactifs dans des études précédentes, ils restent à évaluer pour leurs contributions ou non aux activités biologiques.

### 3.7. Mise en évidence *in-vitro* des activités biologiques liées aux hydrolysats

#### 3.7.1. Mise en évidence de l'inhibition de l'enzyme ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine)

Les différents hydrolysats obtenus (fractions <5 kDa), ont été testés *in-vitro* pour l'activité inhibitrice de l'enzyme ECA. Les valeurs  $IC_{50}$  sont données dans le **tableau 22**. L'activité inhibitrice de ECA la plus élevée (valeur de  $IC_{50}$  la plus faible) a été donnée par les hydrolysats de caséines de brebis obtenus par les protéases issues du lactocoque LCL ( $IC_{50}=16 \mu\text{g/ml}$ ), les hydrolysats des caséines bovines et de chamelle obtenus par les protéases de la même souche montrent également une inhibition importante de l'enzyme ECA ( $IC_{50}= 22 \mu\text{g/ml}$  et  $61 \mu\text{g/ml}$  respectivement). Une activité inhibitrice intéressante a été exprimée par les hydrolysats des différentes caséines obtenus par les protéases de *Lb. brevis* CHTD27 ( $IC_{50}= 40 \mu\text{g/ml}$  à  $100 \mu\text{g/ml}$ ). Cependant les hydrolysats des trois caséines obtenues par les protéases issues de la souche *Lb. plantarum* BH14 ont montré une faible activité inhibitrice de l'ECA. Les hydrolysats des caséines de chamelle et bovines obtenus sous l'action de la trypsine expriment également une bonne activité inhibitrice de l'ECA ( $IC_{50}= 74 \mu\text{g/ml}$  et  $85 \mu\text{g/ml}$  respectivement).

**Tableau 22 :** Inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ECA par les hydrolysats dérivés de caséines.

Origine des protéases extracellulaires	Source des caséines	Valeurs de IC <sub>50</sub> (µg/ml)
<i>Lb. brevis</i> CHTD27	Chamelle	100 ± 0.225
	Brebis	40 ± 5.735
	Bovine	70 ± 7.802
<i>Lb. platarum</i> BH14	Chamelle	156 ± 1.117
	Brebis	313 ± 0.983
	Bovine	385 ± 2.547
<i>Lc. lactis</i> LCL	Chamelle	22 ± 0.448
	Brebis	16 ± 3.118
	Bovine	61 ± 8.590
Trypsine	Chamelle	74 ± 0.128
	Brebis	180 ± 0.276
	Bovine	85 ± 0.361

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart type (n=3).

Les résultats obtenus sont en corrélation avec les données présentées dans tableaux (10 à 21) exposés dans le chapitre précédent, et qui montrent que les hydrolysats des caséines de brebis obtenus par les protéases issues de *Lc. lactis* LCL et *Lb. brevis* CHTD27 présentent un nombre important de séquences peptidiques identifiées inhibitrices de l'ECA.

Plus précisément, le fragment  $\beta$ -CN f (133-138), représenté par la séquence peptidique LHLPLP, a été rapporté inhibiteur puissant de ECA (IC<sub>50</sub> de 5,5 µM). Cette séquence a déjà été associée à un effet antihypertensif, en diminuant la tension systolique (25,3 mm) chez des rats Hgin spontanément hypertendus (SHR) (Quirós *et al.*, 2007). Nous avons identifié ce fragment dans les hydrolysats des caséines de brebis obtenus par la fraction protéasique extracellulaire de *Lb. brevis* CHTD27 et par la trypsine. L'hydrolyse des caséines de lait de brebis par les fractions protéasiques de *Lc. Lactis* LCL, des caséines bovines et de chamelle par les protéases de *Lb. brevis* CHTD27 a induit la libération de la séquence peptidique correspondante au fragment  $\beta$ -CN f (133 – 139). Ce peptide a été isolé du lait fermenté par *Enterococcus faecalis* et décrit bioactif avec un effet antihypertensif (Miguel *et al.*, 2006).

D'autres séquences peptidiques qui ont été identifiées dans la plupart des hydrolysats préparés dans ce travail, sont similaires aux séquences décrites dans la littérature à effet antihypertensif, comme la séquence EMPFPK (fragment  $\beta$ -CN f (108 – 113)), le peptide YPVEPF (fragment  $\beta$ -CN f (114 – 119)), le peptide VWPPFL (fragment  $\beta$ -CN f (82 – 88)) et



le peptide YIPIQY (fragment K-CN f (25 – 30)) (Abubakar *et al.*, 1998 ; Pihlanto-Leppala *et al.*, 1998 ; Gomez-Ruiz *et al.*, 2007 ; Hayes *et al.*, 2007).

Cependant, dans certains cas, on ne retrouve pas cette corrélation. Le plus grand nombre de peptides inhibiteurs de l'ECA a été identifié dans les hydrolysats tryptiques des caséines bovines et caséines de brebis, alors que ce sont les hydrolysats des caséines de chamelle qui ont exprimé l'activité inhibitrice la plus importante de l'ECA. Il est à remarquer que les hydrolysats de la caséine bovine obtenus par les protéases de la souche *Lc. lactis* LCL génèrent le plus grand nombre de séquences peptidiques inhibitrices de l'ECA, néanmoins, l'activité inhibitrice de cette enzyme est faible.

A la suite de l'ensemble de ces résultats, on constate que la présence des peptides décrits, précédemment dans la littérature, inhibiteurs de l'activité de l'ECA ne peut pas expliquer son inhibition par les hydrolysats, d'autres séquences non encore rapportées, générées par l'hydrolyse de la caséine pourraient également être responsables des effets inhibiteurs observés.

Les valeurs  $IC_{50}$  que nous avons déterminé sont comparables aux valeurs rapportées pour d'autres hydrolysats de protéines obtenus par fermentation et digestion enzymatique. Ainsi, le lait fermenté par *Enterococcus faecalis* a présenté des valeurs  $IC_{50}$  comprises entre 34 et 59  $\mu\text{g/ml}$  selon la souche (Muguerza *et al.*, 2006), et les hydrolysats de caséines par la pepsine ont présenté des valeurs  $IC_{50}$  comprises entre 25 et 60  $\mu\text{g/ml}$  en fonction du temps d'hydrolyse (Contreras *et al.*, 2009). La fermentation avec *Lb. delbrueckii* et *S. thermophilus* a été utilisée pour produire des boissons à base de lait fermentées où la valeur  $IC_{50}$  atteignait 50  $\mu\text{g/ml}$  lorsque la protéinase K était ajoutée (Saito *et al.*, 2008). Certains de ces produits d'hydrolyse ont montré une activité antihypertensive *in-vivo*.

Une valeur  $IC_{50}$  du même ordre de grandeur ( $IC_{50}$ , 80  $\mu\text{g/ml}$ ) a été également rapportée en utilisant *Lactobacillus animalis* pour dégrader la caséine (Hayes *et al.*, 2007). D'autres valeurs  $IC_{50}$  comprises entre 80 et 314  $\mu\text{g/ml}$  ont été trouvées en utilisant différentes souches de bactéries lactiques et des enzymes digestives (Pihlanto *et al.*, 1998).

Les valeurs  $IC_{50}$  déterminées dans ce travail concordent aussi avec les résultats rapportés par Robert *et al.*, (2004), en utilisant *Lb. helveticus* NCC 2765 pour dégrader une solution de caséinate de sodium.



De nombreux peptides bioactifs inhibiteurs de l'enzyme ECA ont été isolés à partir d'hydrolysats de protéines du lait et de produits fermentés. Un grand nombre de peptides dérivés de la caséine par fermentation ou par hydrolyse enzymatique ont été identifiés peptides inhibiteurs de l'ECA avec des effets antihypertensifs (**Martínez-Maqueda et al., 2012 ; Bastien, 2017**).

Il a été démontré que des souches protéolytiques de *Lactobacillus* et *Enterococcus* produisent de nombreux peptides bioactifs dans les produits laitiers, parmi lesquels, des peptides sont identifiés inhibiteurs de l'ECA et antihypertensifs. Certaines séquences peptidiques inhibitrices de l'ECA sont générées par l'action de protéases bactériennes extracellulaires seules sur les caséines telles que les fragments de  $\beta$ -caséine produits par les protéases extracellulaires de *Lb. helveticus* CP790 (**Yamamoto et al., 1994**). D'autres peptides dérivés de la caséine possédant l'activité inhibitrice de l'ECA ont été purifiés à partir de lait fermenté par *Lb. delbrueckii* et *Lactococcus lactis* (**Gobbetti et al., 2004**).

En outre, on s'intéresse de plus en plus, à l'étude de la possibilité d'obtention de peptides bioactifs par hydrolyse enzymatique des protéines du lait. En effet, les caséines se sont avérées intéressantes car elles représentent une source de peptides antihypertensifs. L'action de la pepsine seule sur les caséines camelines, ou associée à celle de la chymotrypsine et la trypsine, a révélé des peptides inhibant *in-vitro* l'enzyme de conversion de l'angiotensine ECA (**Salam et al., 2011**).

D'autres travaux ont montré que la consommation de lait de chamelle fermenté contribue à l'abaissement de la tension artérielle indiquant ainsi la possibilité de libération de peptides sous l'action des bactéries lactiques (**Al haj et al., 2010**).

Les inhibiteurs synthétiques de l'ECA, tels que le captopril et l'énalapril, sont souvent utilisés pour traiter l'hypertension. Cependant, les inhibiteurs synthétiques peuvent provoquer divers effets secondaires (**Alemán et al., 2011**). Par conséquent, les peptides inhibiteurs de l'ECA dérivés des aliments sont utilisés comme des agents préventifs naturels pour contrôler l'hypertension et pourraient conduire à une diminution de la nécessité de médicaments (**Mohanty et al., 2015**).

### 3.7.2. Mise en évidence de l'activité antioxydante

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Huang *et al.*, 2010).

Le test ORAC est considéré actuellement comme le test chimique de mesure de l'activité antioxydante le plus pertinent, puisque celui-ci est un test dynamique basé sur un stress induit par des radicaux peroxydes se rapprochant des mécanismes cellulaires induits par ces radicaux (Huang *et al.*, 2005 ; Conway *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 23**. La valeur la plus élevée correspond à l'activité la plus forte.

**Tableau 23:** Mesure de l'activité antioxydante des hydrolysats par le test ORAC.

Origine des protéases extracellulaires	Source des caséines	Valeurs ORAC ( $\mu\text{mol}$ de Trolox equiv/mg de protéine)
<i>Lb. brevis</i> CHTD27	Chamelle	$1.003 \pm 0.039$
	Brebis	$0.979 \pm 0.017$
	Bovine	$2.615 \pm 0.051$
<i>Lb. Platarum</i> BH14	Chamelle	$1.023 \pm 0.046$
	Brebis	$0.857 \pm 0.019$
	Bovine	$2.429 \pm 0.008$
<i>Lc.lactis</i> LCL	Chamelle	$1.385 \pm 0.016$
	Brebis	$1.613 \pm 0.022$
	Bovine	$3.618 \pm 0.014$
Trypsine	Chamelle	$0.701 \pm 0.009$
	Brebis	$1.097 \pm 0.049$
	Bovine	$1.122 \pm 0.023$

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (n=3).

D'après les valeurs obtenues, l'activité antioxydante est présente dans tous les hydrolysats. L'activité la plus élevée est révélée dans les hydrolysats des caséines bovines générés par les protéases de *Lc. lactis* LCL ( $3.6 \mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine). Il est à noter que les valeurs les plus élevées sont obtenues avec les caséines bovines ( $3.618 \mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine ;  $2.615 \mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine ;

2.429  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine ; 1.122  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine) quelle que soit l'enzyme utilisée. Les valeurs obtenues avec les hydrolysats des caséines de chamelle et de brebis générés par les différentes fractions enzymatiques sont par contre faibles (varient de 0.7 à 1.6  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/mg de protéine). Ces résultats concordent avec les résultats présentés dans les tableaux (10 à 21).

La séquence VLPVPQK correspondante au fragment  $\beta$ -CN f (170 – 176) a été retrouvée dans les hydrolysats de caséines de brebis préparés par la trypsine, par les protéases de *Lb. brevis*, et dans les hydrolysats de caséines bovines obtenus par les protéases de *Lb. brevis* et de *Lc. Lactis*. D'après les données de la littérature, cette séquence possède une activité antioxydante (**Rival et al., 2001**). La séquence peptidique correspondante au fragment  $\beta$ -CN f (183 – 188), RDMPIQ, qui a été identifiée dans les hydrolysats des caséines bovines par la trypsine a également été rapportée antioxydante (**De Gobba et al., 2014**).

Le peptide YFYPEL correspondant au fragment  $\alpha_{s1}$ -CN f (144–149) identifié dans les hydrolysats de la caséine bovine par la fraction protéasique de *Lc. Lactis*, a été décrit antioxydant (**Suetsuna et al., 2000**), il a été aussi récemment rapporté inhibiteur de l'enzyme de conversion d'angiotensine (**De Gobba et al., 2014**).

Il est intéressant de remarquer que l'activité antioxydante évaluée dans les hydrolysats est supérieure à l'activité montrée par les antioxydants naturels tels que la vitamine C (1.65  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/ $\mu\text{mol}$  de vitamine C) (**Huang et al., 2010**) ou les antioxydants synthétiques comme la hydroxyanisole butylé ou BHA (2.43  $\mu\text{mol}$  de Trolox équivalent/ $\mu\text{mol}$  de BHA) (**Dávalos et al., 2004**).

Les différences dans l'activité de piégeage des radicaux entre les hydrolysats ont été attribuées aux différences dans la taille et la séquence des acides aminés composants les séquences peptidiques libérées par les protéases qui présentaient une activité spécifique variable sur les différentes caséines.

L'effet de la composition en acides aminés du peptide sur l'activité antioxydante a été largement décrit dans la littérature. Une forte proportion d'acides aminés hydrophobes a été rapportée dans les peptides ayant une activité antioxydante élevée, par rapport à d'autres acides aminés hydrophiles, qui est considérée comme le facteur clé de la capacité des peptides à piéger les radicaux (**Zou et al., 2016**). La tyrosine est un acide aminé aromatique connu pour son activité antioxydante due à la présence du noyau phénolique (cycle aromatique avec

un groupe hydroxyle), ce qui rend la tyrosine un bon piègeur de radicaux libres (**Tagliazucchi et al., 2016**).

Les protéines du lait sont des précurseurs de peptides antioxydants grâce à leur richesse en certains acides aminés comme l'histidine ou en acides aminés hydrophobes. Les peptides dérivés de ces protéines sont capables d'inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres (**Léonil, 2014**).

Un peptide dérivé de la caséine  $\alpha_{s1}$  (Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys, CN (f 170-176)) ayant des propriétés antioxydantes *in-vitro* a été identifié dans le jéjunum de l'homme suite à la digestion de protéines laitières. Le rôle possible de ce peptide chez l'homme est encore inconnu, l'effet des protéines du lait sur la réduction du statut oxydatif chez l'être humain n'est toujours pas déterminé à ce jour. Les effets antioxydants qui ont été rapportés chez l'homme après la digestion des protéines de lait sont assez modestes. L'effet positif rapporté pour les peptides riches en Cystéine est probablement dû au résidu Cys qui est un acide aminé antioxydant bien connu (**Nongonierma et FitzGerald, 2015 ; O'Keeffe et al., 2017**).

Certains auteurs ont rapporté que l'accessibilité oxydant-antioxydant dans le test *in-vitro* est plus grande pour les peptides de petite taille et les acides aminés que pour les peptides de grande taille et les protéines (**Moosman et al., 2002**). Des peptides courts présentant une activité antioxydante ont été isolés et caractérisés à partir de caséines, un peptide exprimant une forte activité antioxydante a été identifié dans l'hydrolysate de caséines, sa séquence en acides aminés est Tyr-Phe-Tyr-Pro-Glu-Leu (YFYPEL) (**Suetsuna et al., 2000**).

Une variété d'enzymes protéolytiques a été utilisée pour générer des hydrolysats de protéines de lait à activités antioxydantes. Des enzymes digestives et des combinaisons de différentes protéases, telles que l'alkalase et la thermolysine, ont été utilisées pour générer avec succès des peptides antioxydants à partir des protéines du lait (**Pihlanto 2006; Power et al., 2013**). Des peptides antioxydants avec la capacité de piéger les radicaux libres ont été identifiés dans des hydrolysats de la caséine  $\alpha_{s1}$  bovine sous l'action de la pepsine (**Hernández-Ledesma et al., 2005**).

Les données rapportées sur l'activité antioxydante concernent largement les hydrolysats de caséines d'origine bovine. Les caséines de brebis ou de chamelle sont très peu étudiées, néanmoins, quelques études ont été menées pour étudier l'activité antioxydante des hydrolysats de ces caséines obtenus par fermentation avec des bactéries lactiques (**Nandhini,**

*et al.*, 2012), par hydrolyse enzymatique trypsique et par protéases bactériennes (Li *et al.*, 2013 ; De Gobba *et al.*, 2014) ou par l'enzyme papaïne (Bezzera *et al.*, 2013).

### 3.7.3. Mise en évidence de l'inhibition de l'enzyme DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV)

Les hydrolysats obtenus dans ce travail ont été testés *in-vitro* pour leur activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV. Pour chaque hydrolysats, plusieurs concentrations ont été testées et la valeur IC<sub>50</sub> a été déterminée.

Les hydrolysats de caséines bovines obtenus par les protéases issues de la souche *Lb. plantarum* BH14 et par la trypsine ont montré une forte inhibition de l'enzyme DPP-IV (IC<sub>50</sub> = 0.863 mg/ml et 0.958 respectivement). Les hydrolysats des caséines bovines et de brebis obtenus par les protéases issues de *Lc. lactis* LCL montrent également une bonne activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV (IC<sub>50</sub> = 1.14 et 1.02 mg/ml respectivement). Les hydrolysats des caséines de chamelle, quelle que soit l'origine de l'enzyme, présentent l'activité inhibitrice la plus faible (Tableau 24).

**Tableau 24 :** Concentration inhibitrice induisant 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) pour la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV).

Origine des Protéases extracellulaires	Source des caséines	Valeurs IC <sub>50</sub> (mg/ml)
<i>Lb. brevis</i> CHTD27	Chamelle	3.164 ± 0.191
	Brebis	3.958 ± 0.157
	Bovine	1.952 ± 0.093
<i>Lb. Platarum</i> BH14	Chamelle	4.152 ± 0.087
	Brebis	3.587 ± 0.182
	Bovine	0.863 ± 0.058
<i>Lc. lactis</i> LCL	Chamelle	2.157 ± 0.130
	Brebis	1.024 ± 0.015
	Bovine	1.149 ± 0.074
Trypsine	Chamelle	2.641 ± 0.183
	Brebis	2.874 ± 0.169
	Bovine	0.958 ± 0.018

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard (n=3).

Les valeurs IC<sub>50</sub> observées sont du même ordre de grandeur que les valeurs rapportées dans la littérature (0.075 à 6.4 mg/ml) pour divers hydrolysats de protéines alimentaires (Hatanaka *et al.*, 2012 ; Lacroix et Li-Chan, 2012a ; Li-Chan *et al.*, 2012).

Parmi les peptides identifiés dans les tableaux (10 à 21), la séquence YPVEPF correspondante au fragment  $\beta$ -CN f (114 – 119) a été récemment rapportée inhibitrice de l'enzyme DPP-IV (**Nongonierma et al., 2016a**). Cette même séquence a été identifiée dans les hydrolysats des caséines de brebis obtenus par les protéases de *Lc. Lactis* LCL et dans les hydrolysats des caséines bovines obtenus sous l'action de la trypsine. Les séquences FPGIPN, VPITPT correspondantes aux fragments  $\beta$ -CN f (62 – 68) et  $\alpha_{s2}$ -CN f (117– 122) respectivement, ont été identifiées dans les hydrolysats des caséines bovines obtenus par la trypsine, ces peptides ont été décrits inhibiteurs de l'enzyme DPP-IV (**Ojeda et al., 2014**).

Il est bien connu que les protéines du lait sont une source potentielle de peptides bioactifs avec diverses activités biologiques telles que l'activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV et, en particulier, les protéines laitières bovines ont montré la capacité à produire des peptides inhibiteurs de DPP-IV aussi bien par hydrolyse enzymatique ou par fermentation (**Lacroix et Li-Chan, 2012a ; Uenishi, et al., 2012 ; Nongonierma et FitzGerald, 2013 ; Ayyash et al., 2018**).

L'analyse *in-silico* de 34 protéines alimentaires, a prédit que la caséine bovine est la plus riche en peptides inhibiteurs de la DPP-IV (**Lacroix et Li-Chan, 2012b**). De nombreux peptides inhibiteurs de la DPP-IV ont été isolés puis identifiés dans des hydrolysats dérivés de la caséine bovine, tels que LPQNIPPL ( $\beta$ -CN, f 70-77) (**Uenishi et al., 2012**), FLQP ( $\beta$ -CN, f 87-90) (**Nongonierma et FitzGerald, 2013**), et VPLGTQ ( $\alpha_{s1}$ -CN, f 168-174) (**Boots, 2009**).

L'activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV est généralement plus importante dans les hydrolysats de caséines que dans les hydrolysats des protéines du lactosérum. Ceci est lié à la caséine  $\beta$  qui est le substrat générant le plus grand nombre de séquences peptidiques inhibitrices de DPP-IV (**Lacroix et Li-Chan, 2012a**).

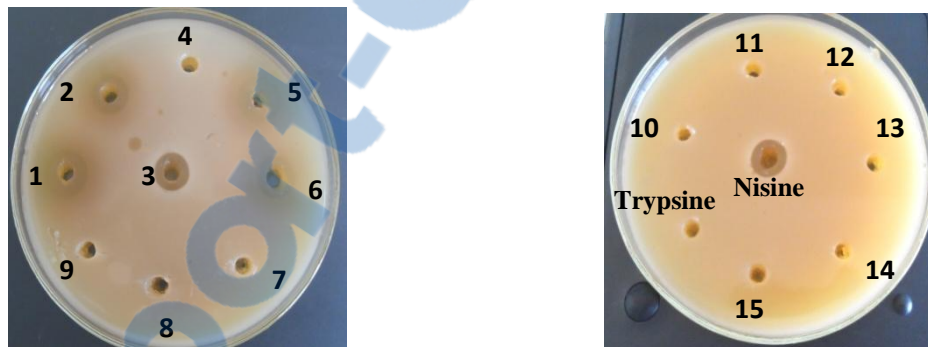
Il est bien documenté que les peptides riches en résidus Pro et la position de ces résidus ont une influence décisive sur les activités inhibitrices de la DPP-IV, les peptides avec un résidu Pro en seconde position de l'extrémité N terminale agissent généralement comme inhibiteurs compétitifs préférés de la DPP-IV en raison de leur analogie de structure avec le substrat (**Lacroix et Li-Chan, 2014; Nongonierma et FitzGerald, 2014**), tandis que les peptides où le résidu Pro est en troisième position sont considérés de puissants inhibiteurs de la DPP IV (**Lacroix et Li-Chan, 2014**). Les peptides contenant le résidu Pro à la quatrième

position pourraient également inhiber l'activité de la DPP-IV (Lacroix et Li-Chan, 2012b; Nongonierma et FitzGerald, 2014 ; Harnedy *et al.*, 2015).

#### 3.7.4. Activité antibactérienne des hydrolysats

L'activité antibactérienne a été recherchée dans les hydrolysats de différentes caséines préparés sous l'action des protéases bactériennes ainsi que la trypsine. L'activité est mise en évidence selon la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les hydrolysats sont testés contre une souche à Gram-négatif *Escherichia coli*.

La **figure 30** montre que les hydrolysats tryptiques des trois types de caséines possèdent une activité antibactérienne contre la souche *E.coli*. Cette inhibition se manifeste par l'apparition d'une zone de clarification autour des puits. Les hydrolysats de caséines bovines et de chamelle préparés par les protéases issues de *Lb. plantarum* BH14 montrent une zone de clarification réduite donc une inhibition faible de la croissance de *E.coli*, alors qu'aucune inhibition n'est révélée par les hydrolysats de caséines de brebis obtenus par les protéases de la même souche.



**Figure 30 :** Mise évidence de l'activité antibactérienne des hydrolysats contre la souche indicatrice *E. coli*.

- 1 :** Caséine bovine hydrolysée par la trypsine. **2 :** Caséine de brebis hydrolysée par la trypsine. **3 :** Caséine de chamelle hydrolysée par la trypsine.  
**4 :** Caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de souche BH14. **5 :** Caséine bovine hydrolysée par les protéases issues de la souche BH14. **6 :** Caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de la souche BH14.  
**7 :** Caséine bovine e hydrolysée les protéases issues de la souche CHTD27. **8 :** Caséine de brebis hydrolysée les protéases issues de la souche CHTD27. **9 :** Caséine de chamelle hydrolysée par les protéases issues de la souche CHTD27.  
**10 :** Caséine bovine hydrolysée par les protéases issues de la souche LCL. **11 :** Caséine de brebis hydrolysée par les protéases issues de la souche LCL. **12 :** Caséine de chamelle hydrolysée par les protéases de la souche LCL.  
**13 :** Solution de caséine bovine stérile. **14 :** Solution de caséine de brebis stérile. **15 :** Solution de caséine de chamelle stérile.



Aucune activité inhibitrice n'a été révélée par les hydrolysats des différentes caséines obtenus par les fractions enzymatiques issues des souches *Lb. brevis* CHTD27 et *Lc. lactis* LCL. Cette absence d'activité serait due à la concentration insuffisante des peptides antibactériens ou de peptides inhibiteurs de la souche cible testée. Cette approche expérimentale nécessite donc d'être complétée pour évaluer le potentiel des hydrolysats à fournir des peptides antimicrobiens.

La nisine utilisée dans ce cas comme témoin révèle une clarification qui traduit une inhibition de la croissance de la souche testée.

Les peptides antimicrobiens qui ont reçu le plus d'attention dans les deux dernières décennies sont dérivés de la lactoferrine (LF). La caséine qui est considérée comme importante du point de vue nutritionnel, elle est également une source de peptides antibactériens. Les peptides les plus pertinents des fractions de caséines correspondent à la région N-terminale de la caséine  $\alpha_{s1}$ , plusieurs fragments provenant du domaine C-terminal de la caséine  $\alpha_{s2}$  et certains peptides de la caséine  $\kappa$  sont actifs contre les bactéries Gram positives et négatives (**Hernández-Ledesma et al., 2014**).

**Lahov et al., (1971)** étaient les premiers à identifier des polypeptides de hauts poids moléculaires et de caractère antimicrobien nommé casécidins après traitement du lait acidifié par la présure. En **1974**, **Hill et al** ont identifié l'Isracidin ; un peptide à activité antimicrobienne correspondant au fragment N-terminal f (1-23) de la caséine  $\alpha_{s1}$ . Il a été obtenu par action de la chymosine sur la caséine bovine. Ce peptide possède un large spectre d'action *in-vitro* contre les bactéries Gram+ et Gram- comme *Escherichia coli* O157 :H7 (**Haque et chand, 2008**). Son activité antibactérienne a été confirmée *in- vivo* chez la souris qui acquiert une plus grande résistance face à l'infection par *Staphylococcus aureus*, *S. pyogenes*, et *Listeria monocytogenes* (**Léonil, 2013 ; Adoui, 2014**).

A partir de la caséine  $\alpha_{s2}$ , la casocidine I correspondant au fragment  $\alpha_{s2}$  (165- 203) a été isolé par **Zucht et al, (1995)**. Sous l'action de la pepsine, **Recio et Visser (1999)** ont pu séparer plusieurs peptides a activité antimicrobienne de cette fraction caséinique.

L'hydrolyse 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 al., 2006**). L'hydrolyse trypsique de la



caséine  $\beta$  de lait de lapine a donné plusieurs peptides antimicrobiens, le fragment (64–77) a montré l'activité la plus forte (**Baranyi *et al.*, 2003**). L'hydrolyse du lait humain par la protéase de *Lactobacillus helveticus* PR4 a libéré un peptide antimicrobien correspondant au fragment (184–210) de la caséine  $\beta$  (**Minervini *et al.*, 2003**).

**Tellez *et al.*, (2011)**, ont démontré l'efficacité d'une fraction peptidique isolée du lait fermenté par *Lb. helveticus* contre une infection expérimentale de *S. enteritidis* chez le rat. Le taux de survie du groupe nourri avec la fraction peptidique (0,02  $\mu\text{g}$  par jour) était supérieur à celui du groupe nourri avec la moitié de la dose (0,01  $\mu\text{g}$  par jour), et plus élevé que le groupe témoin.

## 4. Conclusion et perspectives

La présente étude avait pour but de mettre en évidence le potentiel des protéases de bactéries lactiques autochtones à hydrolyser les caséines de différentes sources de lait (brebis, chamelle et vache) en générant des peptides biologiquement actifs.

Dans une première étape, nous avons montré le potentiel de protéolyse de deux espèces de lactobacilles *Lb. plantarum* BH14 et *Lb. brevis* CHTD27 et d'une espèce de lactocoque *Lc. Lactis* LCL. Ce potentiel s'exprime à travers des enzymes protéolytiques extracellulaires (protéases). Les deux lactobacilles expriment une activité protéolytique plus élevée que le lactocoque. Cependant les trois souches sont capables de sécréter les protéases dans leurs milieux de culture lorsqu'elles sont cultivées en présence du lait.

L'approche méthodologique utilisée pour libérer les protéases de la paroi bactérienne (lavage en absence d'ions calcium, incubation en présence du chélateur d'ions EDTA) a révélé que, dans nos conditions expérimentales, les protéases ne sont pas libérées par autoprotéolyse comme cela a été décrit particulièrement chez les lactocoques.

L'évaluation par différentes méthodes biochimiques (dosage au Folin-Ciocalteu, dosage au BCA, calcul du degré d'hydrolyse, électrophorèse SDS-PAGE) de l'activité enzymatique des protéases extracellulaires a montré que ces dernières sont capables d'hydrolyser les différentes caséines avec la même efficacité au bout de 24h de réaction. Les quantités de protéines trouvées dans les hydrolysats obtenus par les protéases extracellulaires issues des lactobacilles sont plus élevées que la quantité déterminée dans les hydrolysats obtenus par les protéases du lactocoque. Les différentes caséines ont par contre montré une grande sensibilité à la trypsine.

Dans une deuxième étape, nous avons recherché le lien entre l'enzyme utilisée (protéases de lactobacilles, protéases de lactocoque, trypsine), le substrat (caséines de chamelle, caséines de brebis, caséines bovines) et le potentiel des hydrolysats comme source de peptides biologiquement actifs. Le fractionnement et l'identification des séquences peptidiques dans les hydrolysats ont été effectués en utilisant la technique RP-HPLC-MS/MS. Le fractionnement a révélé une quantité potentiellement importante de peptides qui correspondent à des fragments dérivés de la caséine  $\beta$ , de la caséine  $\alpha_{s1}$ , de la caséine  $\alpha_{s2}$  et de la caséine  $\kappa$ . Ce résultat montre une activité significative des protéases bactériennes. Ces dernières possèdent des spécificités de substrat identiques à celles exhibées par les protéases types PI, PIII et le type intermédiaire PII. Selon le nombre des peptides générés

correspondants aux fragments des caséines  $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$ , nous avons trouvé que les protéases de la souche *Lb. brevis* CHTD27 sont de type PI, et les protéases des souches *Lb. plantarum* BH14 et *Lc. lactis* LCL sont de types PIII.

Les profils peptidiques des hydrolysats diffèrent en fonction de la source de caséines et de l'enzyme protéolytique utilisée pour l'hydrolyse de ces protéines. Le plus grand nombre de séquences peptidiques générées a été trouvé dans les hydrolysats de caséines de lait de brebis.

Parmi les peptides identifiés, de nombreuses séquences ont été décrites dans la littérature (base de données) comme des peptides bioactifs qui exercent les activités biologiques: antihypertensive, antithrombotique, antioxydante, inhibitrice de DPP-IV, antibactérienne, immunomodulatrice, anticancéreuse, et opioïde. La majorité de ces bio-peptides ont été identifiés dans les hydrolysats de caséines de brebis et caséines bovines sous l'action des protéases extracellulaires des souches *Lb. brevis* CHTD27 et *Lc. lactis* LCL. Cependant de nombreux peptides identifiés dans les hydrolysats mais non rapportés bioactifs dans la littérature n'exclut pas que ces derniers soient de nouvelles séquences peptidiques avec de nouvelles propriétés biologiques.

Ces résultats nous ont conduit, par la suite, à évaluer *in-vitro* l'activité inhibitrice de l'ECA, l'activité inhibitrice de l'enzyme DPP-IV, l'activité antioxydante et l'activité antibactérienne.

La mesure de l'activité inhibitrice de l'ECA des différents hydrolysats a révélé que ces derniers contiennent tous des séquences peptidiques inhibitrices de l'ECA. L'activité la plus élevée ( $IC_{50}=16$  à  $61 \mu\text{g/ml}$ ) a été évaluée dans les hydrolysats des différentes caséines obtenus par les protéases issues du lactocoque LCL, les hydrolysats obtenus par l'action des protéases de *Lb. brevis* CHTD27 ont également montré une bonne activité inhibitrice de l'ECA. Les protéases de la souche *Lb. plantarum* BH14 ont montré une spécificité à libérer des peptides inhibiteurs de l'enzyme DPP-IV après leur action sur les caséines bovines ( $IC_{50} = 0.863 \text{ mg/ml}$ ).

L'activité antioxydante, mise en évidence par le test ORAC, a été retrouvée essentiellement dans les hydrolysats de caséines bovines et ceci quelle que soit l'enzyme utilisée.

L'activité antibactérienne a été révélée dans les hydrolysats des caséines de lait de chamelle et lait de vache obtenus par l'action des protéases extracellulaires de la souche *Lb. plantarum* BH14.

A la suite de ces résultats, nous pouvons conclure que les protéases bactériennes utilisées sont capables de dégrader efficacement les caséines de diverses espèces et que ces protéases possèdent des sites de coupure communs et des sites de coupure spécifiques ce qui a conduit à de nombreux et divers peptides en fonction de la protéase et aussi de la source de caséine. De plus, ces résultats montrent que les caséines bovines ne constituent pas la seule source potentielle de peptides bioactifs, les caséines provenant des autres espèces du lait, (chamelle et brebis) pourrait être un substrat approprié pour l'hydrolyse visant à la libération de tels peptides.

Ces hydrolysats de caséines présentent des activités biologiques potentiellement intéressantes, ils pourraient être utilisés en tant qu'ingrédients fonctionnels ou compléments alimentaires dans un contexte préventif. Les souches lactiques *Lb plantarum* BH14 ; *Lb brevis* CHTD27 ainsi que la souche *Lc lactis* LCL peuvent contribuer au développement de peptides bioactifs dans des produits laitiers.

De nombreuses perspectives sont ouvertes par ce travail :

Il serait intéressant de procéder à la purification des protéases et d'entreprendre une modélisation de la cinétique d'hydrolyse des caséines ou d'autres protéines alimentaires pour améliorer les rendements d'hydrolyse, de diversifier les protéases microbiennes en fonction des réponses des protéines ciblées afin d'augmenter les chances d'apparition de peptides d'intérêt.

Il est nécessaire d'optimiser l'application des techniques de séparation et de fractionnement sur les hydrolysats actifs obtenus afin de préparer des extraits enrichis en peptides bioactifs permettant leur emploi dans le domaine agroalimentaire ou médical.

Il est fondamental de mettre en évidence les activités biologiques étudiées par des tests *in-vivo* pour déterminer la concentration nécessaire pour qu'un effet physiologique soit observé et déterminer la résistance de ces peptides aux protéases gastro-intestinales.

L'activité antimicrobienne des hydrolysats obtenus mérite d'être optimisée et le spectre d'action élargi à d'autres microorganismes.

## *5. Références* *bibliographiques*

- Abubakar, A., Saito, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh, T. (1998).** Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *Journal of Dairy Science*, 81(12), 3131-3138.
- Adler-Nissen, J. (1986).** Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: *Elsevier Applied Science Publishers* (EDs), London. 110-169.
- Adoui, F. (2014).** Peptides antimicrobiens préparation à partir de protéines laitières. Thèse de doctorat en science alimentaire présentée à l'université frères Mentouri Constantine. Institut de la Nutrition, Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires. 183 P.
- Ahmadova, A., Dimov, S., Ivanova, I., Choiset, Y., Chobert, J.-M., Kuliev, A., Haertlé, T. (2011).** Proteolytic activities and safety of use of Enterococci strains isolated from traditional Azerbaijani dairy products. *European Food Research and Technology*, 233, 131–140.
- Ahn, C. B., Cho, Y. S., Je, J. Y. (2015).** Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 168, 151-156.
- Al Haj, O.A., Al kanhal, H.A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk – review. *International Dairy Journal*, 20, 811-821.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C., Montero, P. (2011).** Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44, 1044–1051.
- Alim, N., Fondrini F., Bounizi, I., Felligini, M., Enne, G. (2005).** Characterisation of casein fractions from Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 112-116.
- Amiot, J., Fournier, F., Lebeuf, Y., Paquin, P., Simpson, R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses internationales Polytechnique*, Montréal, 1-73.
- Anema, S. G., Li, Y. M. (2003).** Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70, 73-83.
- Archibald, F. S. (1986).** Manganese : its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 13, 63-109.
- Atlan, D. (1996).** Les connaissances acquises chez les lactocoques sont-elles transposables aux autres bactéries lactiques. *Lait*, 76, 129-137.

- Atlan, D., Aubal, D., Gilbert, C. (2000).** La biodiversité des bactéries lactiques et les conséquences sur leurs protéinases de surface. *Science des Aliments*, 20, 5-17.
- Atlan, D., Béal, C., Champonier-Vergès, MC., Chapot-Chartier, MP., Chouayekh, H., Coccagn- Bousquet, M., Deghorain, M, Gadu P., Gilbert, C., Goffin, P., Guédon E, Guillouard, I., Guzzo, J., Juillard, V., Ladero, V., Lindley, N., Lortal, S., Loubière, P., Maguin, E., Monnet C., Monnet, V., Rul, F., Tourdot-Maréchal, R., Yvon M. (2008).** Métabolisme et ingénierie métabolique. In : Bactéries lactiques de la génétique aux ferments (Corrieu G et Luquet FM). *Tec & Doc Lavoisier*. Paris, 271-447.
- Atlan, D., Laloi, P., Portalier, R. (1990).** Isolation and characterization of aminopeptidase deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1717-1723.
- Auclair, J. (1990).** L'aptitude du lait au développement de la flore lactique. In Le fromage. Ed. *Eck, A. Tech & Doc Lavoisier*. p. 134-139.
- Audigié, C., Zonszain, F. (1999).** Biochimie structurale. *Doin Editions*.
- Autelitano, D. J., Rajic, A. Smith, A.I., Berndt, M, C. (2006).** The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Literature Review in Drug Discovery Today*, 11(7-8), 306-14.
- Ayyash, M., Al Dhaheri, A, S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J. (2018).** In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 900-911.
- Badis, A., Laouabdia-Sellami, N., Guetarni, D., Kihal, M., Ouzrout, R. (2005).** Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales «Arabia et Kabyle». *Science and Technology*, 23, 30-37.
- Baek, H., Cadwallader, R, H. (1995).** Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *Journal of Dairy Science*, 60, 929-935.
- 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.
- Barnett, A. (2006).** DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes », *International Journal of Clinical Practice*, 60(11), 1454–1470.



- Bastien, D. (2017).** Identification d'inhibiteurs peptidiques de l'enzyme dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) et de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans des laits fermentés. Mémoire de Maîtrise en sciences et technologie des aliments. Québec, Canada.
- Bezerra, V. S., Campos, J. F., da Silva, R. A., Porto, T. S., de Lima Filho, J. L., Porto, A. L. F. (2013).** Biotechnological richness of the northeastern semi-arid region: antioxidant activity of casein hydrolysates from Moxotó goat milk (*Capra hircus* Linnaeus, 1758) obtained by papain action. *Food Science and Technology*, 33, 513–520.
- Boots, J.-W. P. (2009).** Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use. *United States Patent US*, 2019/0075904 A1.
- Boudrant, G., Cheftel, C. (1976).** Continuous proteolysis with a stabilised protease. II continuous experiments. *Biotechnology and Bioengineering*, 18, 1935-1949.
- Boughellout, H., Zidoune, M.N. (2010).** Prévalence de l'allergie aux protéines au lait de vache dans la région d'Annaba. *Archives de Pédiatrie*, 17 (6), 86–87.
- Boyaval, P., Terré, S., Corre, C. (1988).** Production d'acide lactique à partir de permeat de lactosérum par fermentation continu en réaction à membrane. *Le lait*, 68(1), 65-84.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Britten, M., Pouliot, Y. (2002).** Rôles fonctionnels du calcium en industrie laitière. Résumé de cours-séminaire, *Agriculture et Agroalimentaire Canada*.
- Broadbent, J. R., Barnes, M., Brennand, C., Strickland, M., Houck, K., Johnson, M. E., Steele, J. L. (2002).** Contribution of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase specificity to peptide accumulation and bitterness in reduced-fat Cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 1778-1785.
- Brulé G., Lenoir J., Remeuf, F. (1997).** La micelle de caséine et la coagulation du lait. Dans : Le fromage : de la science à l'assurance-qualité. Eck A. et Gillis J.-C. (Ed.), *Lavoisier TEC & DOC*, Paris, New York. 891 p.
- Büetikofer, U., Meyer, J., Sieber, R., Wechsler, D. (2007).** Quantification of the angiotensin-converting enzyme-inhibiting tripeptides Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro in hard, semi-hard and soft cheeses, *International Dairy Journal*, 17, 968-975.
- Buist, G., Venema, G. & Kok J. (1998).** Autolysis of *Lactococcus lactis* is influenced by proteolysis. *Journal of Bacteriology*, 180, 5947-5953.

- Chantawannackul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S. M. (2002).** Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented Soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28, 241-245.
- Charbonnel, P., Lamarque, M., Aubel, D., Piard, J-C., Juillard, V., Atlan, D. (2004).** Qui régit la spécificité de transport des oligopeptides chez *Lactococcus lactis* ?. *Revue. Le Lait*. 84, 95-102.
- Chaves-López, C., Serio, A., Paparella, A., Martuscelli, M., Corsetti, A., Tofalo, R., et al. (2014).** Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptides in fermented milk. *Food Microbiology*, 42, 117-121.
- Chen, G., Tsai, J., Pan, B. (2007).** Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*, 17, 641-647.
- Chen, Y-S., Christensen, J.E., Broadbent, J.R., Steele, J.L. (2003).** Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with postproline specificity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1276-1282.
- Chiaradia, M.C., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F. (2008).** O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos óxicos em alimentos. *Quimica Nova*, 31(3), 623-636.
- Chiba, H., Tani, F., Yoshikawa, M. (1989).** Opioid antagonist peptides derived from casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 363-366.
- Chopard, M.A., Schmitt, M., Perreard E., Chamba, J.F. (2001).** Aspect qualitatif de l'activité protéolytique des *Lactobacillus thermophiles* utilisés en fabrication de fromages à pâte pressée cuite. INRA. EDP Sciences. *Le Lait* 81, 183-194.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., Steele, J. L. (1999).** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Christensen, J. E., Steele, J. L. (2003).** Impaired growth rates in milk of *Lactobacillus helveticus* peptidase mutants can be overcome by use of amino acid supplements. *Journal of Bacteriology*, 185, 3297-3306.
- Christensen, J.E., Dudley, E.G., Pederson, J.A., Steele, J.L. (1999).** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217-246.
- Contreras, M. M., Sancho, M. A., Recio, I., Mills, C. (2012).** Absorption of casein antihypertensive peptides through an in vitro model of intestinal epithelium. *Food Digestion*, 3, 16-24.

- Contreras, M.M., López-Expósito, I., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I. (2008).** Application of mass spectrometry to the characterization and quantification of food derived bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4), 981-994.
- Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y. (2013).** Antioxidant activities of butter milk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 364-372.
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Miera, S. M. M., Segalin, J., Brandelli, A. (2014).** Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, 61, 48 -55.
- Corrieu, G., Luquet, F, M. (2008).** Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Ed. *Lavoisier*. Paris. France : 472 -676.
- Coste, M., Rochet, V., Léonil J., Mollé, D., Bouhallab, S., Tomé, D. (1992).** Identification of C-terminal peptides of bovine b-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunology Letters* , 33, 41-46.
- Courtin, P., Monnet, V., Rul, F. (2002).** Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology Journal*, 148, 3413-3421.
- Dalgleish, D. G. (1998).** Casein micelles as colloids: surface structures and stabilities. *Journal of Dairy Science*, 81, 3013-3018.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. (2004).** Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 48–54.
- De Castro, R. J. S., Bagagli, M. P., Sato, H. H. (2015).** Improving the functional properties of milk proteins: Focus on the specificities of proteolytic enzymes. *Current Opinion in Food Science*, 1, 64-69.
- De Gobba, C., Espejo-Carpio, F. J., Skibsted, L. H., Otte J. (2014).** Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolysed by two commercial proteases. *International Dairy Journal*, 39(1), 28–40.
- De Gobba, C., Tompa, G., Otte, J. (2014).** Bioactive peptides from caseins released by cold active proteolytic enzymes from *Arsukibacterium ikkense*. *Food Chemistry*, 165, 205-215.
- De Roissart, H. B et Luquet, F.M. (1994).** Bactéries lactiques, Vol I et II *Lorica Chemin saint Georges*, F-38410 France.

- De Roissart, H. B. (1986).** Bactéries Lactique dans le lait et produits laitiers. Ed. *Technique et Documentation. Lavoisier*. Paris : 445 p.
- De Vos P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer K. H., Whiteman W.B.(2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The firmicutes. Ed. *Springer Dordrecht Heidelberg London, New York*.
- Deirder, P., Low H.M. U., Van Sinderen, D., Arendt, E. (2004).** Application of Biological Acidification to Improve the Quality and Processability of Wort produced from 50% Raw Barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 110, 133-140.
- Delacroix, N., Jean, M. (2008).** Le lait ami ou ennemi?, Paris, *Editions Médicis*.
- Demers-Mathieu, V. (2011).** Activité antimicrobienne d'un extrait Peptidique issu d'un hydrolysate Trypsique de protéines de lactosérum. Mémoire pour l'obtention du grade de Maître es Science (M. Se). Université Laval.
- Den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O. P., Kok, J. (2005).** Probing direct interactions between Coda and the *opp* promoter of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 187, 512-521.
- Den Hengst, C. D., van Hijum, S. A., Geurts, J. M., Nauta, A., Kok, J., Kuipers, O. P. (2005).** The *Lactococcus lactis* Coda regulon. Identification of a conserved cis-regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 34332-34342.
- Desmazeaud, M. J. (1992).** Les bactéries lactiques. In *Les groupes microbiens d'intérêts laitiers*. Ed. Lenoir, J., Hermier, J., Weber, F. CEPIL, Paris. p. 9-60.
- Desmazeaud, M. J. (1996).** Les bactéries dans l'alimentation humaine, utilisation et innocuité. *Cahiers Agricultures*, 5, 331-342.
- Desmazeaud, M. J. (1998).** Bactéries lactiques et qualité des fromages. Laboratoire de recherche laitière. INRA.
- Desmazeaud, M. J. (1983).** L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. *Lait*, 63, 267-316.
- Detmers, F., Kunji, E., Lanfermeijer, F., Poolman, B., Konings, W. (1998).** Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, 37, 16671-16679.
- Díaz, M., Decker, E. A. (2004).** Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8208-8213.

- Dimitrov, Z. (2009).** Characterization of bioactive peptides with calcium-binding activity released by specially designed cheese starter. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 927-930.
- Djellouli, M. (2010).** Caractérisation technologique de souches de lactobacilles isolées de lait camelin. Étude de leur activité protéolytique dans le lait. Thèse de magister en biotechnologie. Université d'Oran Es-senia.
- Dortu, C., Thonart, P. (2009).** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêt pour la bio-conservation des produits alimentaires. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13, 143-154.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006).** The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2, 564-582.
- Drider, D., Prevost, H. (2009).** Bactéries lactique Physiologie, Métabolisme, Génomique et Application industrielle. Ed, *Economisa* 49 rue Harica 75015 Paris : P 99 - 120.
- Driessen, A. J., De Jong, S., Konings, W. N. (1987).** Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *Journal of Bacteriology*, 169, 5193-5200.
- Drouault, S., Anba, J., Bonneau, S., Bolotin, A., Ehrlich, S.D., Renault, P. (2002).** The Peptidyl-Prolyl Isomerase Motif Is Lacking in PmpA, the PrsA-Like Protein Involved in the Secretion Machinery of *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3932-3942.
- Dziuba J., Iwaniak A., Minkiewicz P. (2003).** Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides , *Polymers*, 48, 50-53.
- El Gendy, S. M., Abdel, Galil, H., Shahin, Y., Hegazi, F. Z. (1983).** Characteristics of salttolerant lactic acid bacteria, in particular lactobacilli, leuconostocs and pediococci isolated from salted raw milk. *Journal of Food Protection*, 46, 429-433.
- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El-Mecherfi, K.E., Bazukyan, I., Choiset, I., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G., Kuliev, A. A., Mozzi, F., Chobert, J. M., Haertlé, T. (2011).** Potential use of lactic bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 509-516.
- El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertle, T., Chobert, J. ( 2010).** Screening of strains of Lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chemistry*, 120, 758-764.

- El-Zahar, K. (2004).** Etude des protéines du système laitier ovin et de leurs transformations par hydrolyse et par fermentation lors de la fabrication des yaourts. INRA, UR 0691 LEIMA Laboratoire d'Études des Interactions des Molécules Alimentaires. Centre de recherche de Nantes, France.
- Exterkate, F. A., Alting, A. C. (1999).** Role of calcium in activity and stability of *Lactococcus lactis* cell envelope proteinase. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1390-1396.
- Exterkate, F.A., de Veer, G.J.C.M. (1985).** Partial Isolation and Degradation of Caseins by Cell Wall Proteinase(s) of *Streptococcus cremoris* HP. *Applied and Environmental Microbiology*. 49(2), 328-332.
- Farah, Z., Farah-Riesen, M. (1985).** Separation and characterization of the major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40 (11), 669-671.
- 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., Swaisgood H. E. (2004).** Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk. Sixth Revision. *Journal of Dairy Sciences*, 87, 1641-1674.
- Fedrighi, M. (2005).** Bactériologie alimentaire. Compendium d'hygiène des aliments. 2<sup>ème</sup> édition. Ed. Economica, Paris, 292 pages. pp 224-233.
- Fernandez-Esplá, M. D., Garault, P., Monnet, V., Rul, F. (2000).** *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase. Release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4772-4778.
- Fernandez-Esplá, M. D., Rul, F. (1999).** A new member of the aminopeptidase T family of thermophilic bacteria. *European Journal of Biochemistry*, 263, 502-510.
- Fiat A.M., Migliore, D. Jollès, P. (1993).** Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunostimulating activities; *Journal of Dairy Science*, 76, 301-310.
- Filion, M.M. (2006).** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Université Laval. Canada.
- Fira, D., Kojic, M., Banina A., Spasojevic I., Strahinic, I., Topisirovic L. (2001).** Characterization of envelope associated proteinases of thermophilic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 123-130.
- Fitzgerald R. J., B. A. Murray. (2006).** Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 118-125.
- FitzGerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. (2004).** Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, 134, 980S-988S.



- Flambard, B., Helinck, S., Richard, J., Juillard, V. (1998).** The Contribution of Caseins to the Amino Acid Supply for *Lactococcus lactis* depends on the Type of Cell Envelope Proteinase. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* . 64, 1991-1996.
- Florèz, A.B., Ammor, M.S., Mayo, B. (2008).** Identification of tet (M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 189-194.
- Folin, O., Ciocalteu, V. (1927).** On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- Foucaud, C., Kunji, E. R. S., Hagting, A., Richard, J., Konings, W. N., Desmazeaud, M., Poolman, B. (1995).** Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis* : evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *Journal of Bacteriology*, 177, 4652-4657.
- Fox, P. F. (1993).** Exogenous enzymes in dairy technology - A review. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 73-199.
- Fox, P.F. (1989).** Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Sciences*, 72, 1379-1400.
- Fox, P.F., Brodtkorb, A. (2008).** The Casein Micelle Historical Aspects, Current Concepts and Significance. *International Dairy Journal*, 18, 677-684.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Ogan T.M., Mc Sweeney P.L.H. (2000).** Chemistry of milks constituents in fundamentals of cheese science. Ed. *Aspen publishers* : 19-43.
- Fransen, N. G., O'Connell, M. B., Arendt, E. K. (1997).** A modified agar medium for screening of proteolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 235-239.
- Gagnaire, V., Mollé, D., Herrouin, M., Léonil, J. (2001).** Peptides identified during Emmental cheese ripening: origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4402-4413.
- Galia, W. (2011).** Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Gaspar, P., Carvalho, A. L., Vinga, S., Santos, H., Neves, A. R. (2013).** From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 31(6), 764-788.

- Geerts, B. F., van Dongen, M. G. J., Flameling, B., Moerland, M. M., de Kam, M. L., Cohen, A. F., Romijn, J. A., Gerhardt, C. C., Kloek, J., Burggraaf, J. (2011).** Hydrolyzed casein decreases postprandial glucose concentrations in T2DM patients irrespective of leucine content. *Journal of Dietary Supplements*, 8, 280-292.
- Gilbert, C., Blanc, B., Frot-Coutaz, J., Portalier, R., Atlan, D. (1997).** Comparison of cell surface proteinase activities within the *Lactobacillus* genus. *Journal of Dairy Research*, 64, 561-571.
- Girard et J.M., saulnier, F., gaillard, J.L., ramet, J.P. humbert., G. (2002).** Camel (*Camelus dromedarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochemistry and Cell Biology*, 78, 19-26.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Rizzello, C. G. (2004).** Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 173-188.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. (2005).** Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 57-69.
- Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., Recio, I. (2007).** Identification of novel angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis*, 28, 4202-4211.
- Guédon, E., Martin, C., Gobert, F-X., Ehrlich, S. D., Renault, P., Delorme, C. (2001).** Réseau de régulation de la transcription des gènes du système protéolytique de *Lactococcus lactis*. *Le Lait*, 81, 65-74.
- Guédon, E., Renault, P., Ehrlich, S. D., Delorme, C. (2001).** Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *Journal of Bacteriology*, 183, 3614-3622.
- Guédon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S. D., Renault, P.(2005).** Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology*, 151, 3895-3909.
- Guldfeldt, L.U., Sørensen, K.I., Ströman, P., Behrndt, H., Williams, D., Johansen, E. (2001).** Effect of starter cultures with a genetically modified peptidolytic or lytic system on Cheddar cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 373-382.
- Gupta, R., Beg Q.K., Lorenz, P. (2002).** Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15-32.



- Haque, E. Chand, R. (2008).** Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 227, 7-15.
- Harless, Christopher. (2009).** La caséine et le lactose du lait : les conséquences sur l'organisme de la caséine et du lactose contenus dans le lait. Travail de maturité TM accompagnés par François Lombard à Calvin.
- Harnedy, PA., O'Keeffe, MB., FitzGerald, RJ. (2015).** Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*. *Food Chemistry*, 172, 400-406.
- Hatanaka, T., Inoue Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., et al. (2012).** Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*; 134, 797-802.
- Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C., Stanton, C. (2006).** Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2260-2264.
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P. (2007).** Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. *Biotechnology Journal*, 2 (4), 435-449.
- Herbert, E. M., Raya, R.R., De Giori, G.S. (2000).** Nutritional requirements and nitrogen-dependent regulation of proteinase activity of *Lactobacillus helveticus* CRL1062. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5316-5321.
- Hernández-Ledesma, B., Contreras, M. M., & Recio, I. (2011).** Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165, 23-35.
- Hernández-Ledesma, B., Davalos A., Bartolomé B., Amigo L. (2005).** Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M. J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I. (2014).** Dairy protein hydrolysates: Peptides for health benefits. *International Dairy Journal*, 38, 82-100.
- Hernandez-Ledesma, B., Quiros A., Amigo, L., Recio, I. (2007).** Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, 42-49.
- Hill, R. D., Lahov, E., Givol, D. (1974).** A rennin-sensitive bond in alpha and beta casein. *Journal of Dairy Research*, 41, 147-153.

- Ho T N T., Tuan, N., Deschamps, A., Caubet, R. (2007).** Isolation and identification lactic acid bacteria (LAB) of the Nem Chua fermented meat product. *Vietnam. Int. Workshop on Food Safety and Processing Technology*: pp 134-142.
- Holck, A., Naes, H. (1992).** Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell-envelope-associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* NCD0I51. *Journal of general microbiology*, 138, 353-1364.
- Holt, C., Horne, D. S. (1996).** The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 85-111.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U.(2001).** Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 36S-73S.
- Horne, D. S., (1998).** Casein interactions: casting light on the Black Boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8,171-177.
- Horne, D. S., Banks J. M., Muir, D. D., (1997).** Genetic polymorphism of bovine  $\kappa$ -casein : effects on renneting and cheese yield. Dans: Milk protein polymorphism. *International Dairy Federation (IDF)*, 162-171.
- Huang, D., Ou B., Prior, R.L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841–1856.
- Huang, W.-Y., Majumder, K., Wu, J. (2010).** Oxygen radical absorbance capacity of peptides from egg white protein ovotransferrin and their interaction with phytochemicals. *Food Chemistry*, 123, 635-641.
- Hughenoltz, J., Sybesma, W., Groot, M. N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., Van Sinderen, D., Piard, J.C., Eggink, G.J., Smid, E., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T., Hols P., Kleerebezem, M. (2002).** Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 217-235.
- Hutkins, R, W. (2006).** In microbiology and technology of fermented food. 1. Ed, IFT Press. *Blackwell publishing*. Oxford. ISBN: 9780813800189.
- Ibrahim, H. R. (2018).**Potential antioxidant bioactive peptides from camel milk proteins. *Archives of Animal Nutrition*, 4, 273-280.
- Ibrahim, H. R. Ahmed, S. A. Miyata, T. (2017).**Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63-71.
- Jakob, E., Piccinali, P. (2006).** L'amertume dans les fromages. *Agroscope. Liebefeld-Posieux*, 01-16.

- Jeantet, R., Croguennec, T., Mahaut, M., Schuck, P., Brulé, G. (2008).** Les produits laitiers. 2<sup>ème</sup> édition. *Technique & documentation-Lavoisier*, Paris, 185 pages.
- John, R.P., Anisha G.S., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. (2009).** Direct lactic acid fermentation: focus On simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*, 27, 145-152.
- Jollès, P., Henschen, A. (1982).** Comparison between clotting of blood and milk. *Trends in Biochemical Science*, 7, 325-328.
- Jouan, P. (2002).** Lactoprotéines et lactopeptides : propriétés biologiques. Paris : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Vol 1. (128 p).
- Juillard, V., Laan, H., Kunji, E. R., Jeronimus-Stratingh, C. M., Bruins, A. P., Konings W.N. (1995).** The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes betacasein into more than one hundred different oligopeptides. *Journal of Bacteriology*, 177, 3472-3478.
- Juillard, V., Foucaud, C., Desmazeaud, M., Richard, J. (1996).** Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus lactis*. *Le Lait*, 76, 13-24.
- Juillerat-Jeanneret, L., Robert, M. C., Juillerat, M. A. (2011).** Peptides from *Lactobacillus* hydrolysates of bovine milk caseins inhibit prolyl-peptidases of human colon cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 370-377.
- Kabadjova, H.P., Bakalova, S., Gocheva, B., Moncheva, P. (2006).** Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20, 89-94.
- Kappeler, S., Farah, Z. et Puhan, Z. (1998).** Sequence analysis of camelus dromedarius milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65, 209-222.
- Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U., Takemoto, S. (1990).** Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 96, 367-371.
- Kenny, O., Fitz, Gerald R. J., O'Cuinn, G., Beresford, T., Jordan, K. (2003).** Growth phase and growth medium effects on the peptidase activities of *Lactobacillus helveticus*. *International Dairy Journal*. 13, 509–516.
- Khalid, N. M., Elmer, H. M. (1990).** Lactobacilli their Enzymes and Role in Ripening and spoilage of cheese. A review. *Journal of Dairy Sciences*, 73, 2669-2684.
- Kinsella, J. E. (1984).** Milk proteins: physicochemical and functional properties. CRC Critical Review in *Food Science and Nutrition*, 21(3), 197-262.

- Kitts, D. D. (2005).** Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 549-554.
- Kitts, D. D., Nakamura, S. (2006).** Calcium enriched casein phosphopeptide stimulate release of IL-6 cytokine in human epithelial intestinal cell line. *Journal of Dairy Research*, 73, 44-48.
- Kitts, D. D., Weiler, K. (2003).** Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of ioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.
- Koch, G., Wiedemann, K., Drebes, E., Zimmermann, W., Link, G., Teschemacher, H. (1988).** Human  $\beta$ - casomorphin-8 immunoreactive material in the plasma of women during pregnancy and after delivery. *Regulatory Peptides*, 20, 107-117.
- Kohmura, M., Nio N., Ariyoshi, Y. (1990).** Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human k-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54, 835-836.
- Kohmura, M., Nio N., Kubo, K., Minoshima, Y., Munekata, E., Ariyoshi Y.(1989).** Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human beta-casein. *Agricultural and biological chemistry*, 53(8), 2107-2114.
- Kojic, M., Fira, D., Banina, A., Topisirovic, L. (1991).** Characterization of the cell wallbound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiology*, 57, 1753- 1757.
- Kojic, M., Fira, D., Bojovic, B., Banina, A., Topisirovic, L. (1995).** Comparative study on cell envelope-associated proteinases in natural isolates of mesophilic lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 61-68.
- Kok, J. (1990).** Genetics of the proteolytic system of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87, 15-42.
- Kok, J., De Vos, W. M. (1994).** The proteolytic system of lactic acid bacteria. *In Genetics Professional*, London, England. p. 169-210.
- Kok, J., Leenhouts, K. J., Haandrikman, A. J., Ledebøer, A. M., Venema, G. ( 1988).** Nucleotide sequence of the cell wall-associated proteinase gene of *Streptococcus cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 231-238.
- Konig, H. Frohlich, J. (2009).** Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. SpringerVerlag, Berlin Heidelberg. P: 31-46.
- Konings, J. K., Otto, R. (1983).** Energy transduction and solute transport in streptococci. *Antonie Van Leewenhoek*, 49, 247-257.

- Konings, W. N., Poolman, B., Driessen, A. J. M. (1989).** Bioenergetics and solute transport in lactococci. *CRC. Critical Review Microbiology*, 16, 419-476.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003).** Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1297-1308.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006).** Bioactive peptides: Production and functionality. *International dairy Journal*, 16, 945-960.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. (2007).** Technological options for the production of health-promoting proteins and peptides derived from milk and colostrum. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 829-843.
- Kumar, C.G., Tagaki, H. (1999).** Microbial alkaline proteinase: From a bioindustrial view point. *Biotechnology Advances*, 17, 561-594.
- Kunji, E. R. S., Smid, E. J., Plapp, R., Poolman, B., Konings, W. N. (1993).** Dipeptides and oligopeptides are taken up via distinct transport mechanisms in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2052-2059.
- Kunjie ,R., Mierau,I., Hagting,A., Poolman,B., Konings,W.N. (1996).** The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Laan, H., Konings, W. N. (1989).** The mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* Wg2. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 3103-3106.
- Laan, H; et Konings, W.N. (1991).** Autoproteolysis of the extracellular serine proteinases of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Applied Environmental Microbiology*, 57, 2586-2590.
- Lacroix IME, Li-Chan, ECY. (2012a).** Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25, 97-102.
- Lacroix, I. M. E., Li-Chan, E. C. Y. (2012b).** Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *Journal of Functional Foods*, 4, 403-422.
- Lacroix, I. M. E., Li-Chan, E. C. Y. (2014).** Overview of food products and dietary constituents with antidiabetic properties and their putative mechanisms of action: A natural approach to complement pharmacotherapy in the management of diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 61-78.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lahov, E., Edelstein, D., Sode-Mogensen, m.t., Sofer E. (1971).** Properties of basic glycopeptides released from cow milk protein by heat. *Milchwissenschaft*, 26, 489-495.

- Lahov, E., Regelson, W. (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: caseicin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(1), 131-145
- Landon, M. (1977).** Cleavage at aspartyl–prolyl bonds. *Methods in Enzymology*, 47, 145-149.
- Law, B. A., Sharpe, M. E. (1978).** Streptococci in the dairy industry. In Streptococci. Ed. Skinner, F. A., Quesnel, L. B. Academic Press. London.
- Lazreg, L., Dalache F., Zadi-Karam, H., Karam NE. (2015).** Bacteriocinogenic potential and genotypic characterization of three isolates from Algerian raw milk and traditional butter. *African Journal of Biotechnology*, 14(32), 2517-2524
- Le Maux, S., Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2015).** Improved short peptide identification using HILIC-MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. *Food Chemistry*, 173, 847-854.
- Leblanc, J., Fliss, I., Matar, C. (2004).** Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11, 1171-1181.
- Ledesma, O. V., De Ruiz, Holgado, A. P., Olivier, G., De Giori, G. S. Raibaud, P., Galpin, J. V. (1977).** A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 42, 123-133.
- Lenoir J., Hermier J., Weber F. (1992).** Les groupes microbiens d'intérêt, Ed Cidil : pp 30-50.
- Leonard, L. (2013).** Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne.
- Léonil, J. (2013).** Peptides bioactifs du lait : bénéfice-santé. Revue. INRA, UMR 1253, Science et Technologie du Lait et de l'OEuf, AGROCAMPUS OUEST, UMR1253. 65, rue de Saint Briec, F-35042 Rennes cedex France
- Léonil, J. (2014).** Les peptides bioactifs du lait et leur intérêt dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 8, 495–499.
- Léonil, J., Marchin, S., Henry G., Jouanneau, D., Putaux, J.L, (2007).** La caséine K : quel rôle dans la structuration de la micelle de caséine? *Colloque SFI-Grenoble*.
- Léonil, J., Maubois, J.-L. (2002).** Milk-derived bioactive peptides and proteins : future perspectives. *Sciences des Aliments*, 22, 383-392.



- Letrot, C., Juillard, V. (2001).** Development of a minimal chemically. Defined medium for the exponential growth of streptococcus thermophilus. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1023-1029.
- Leveau, J.-V., Bouix, M. (1993).** Microbiologie industrielle. Technique & documentation-Lavoisier, Aprica, Paris, 612 pages.
- Li, Z., Jiang, A., Yue, T., Wang, J., Wang, Y., Su, J. (2013).** Purification and identification of five novel antioxidant peptides from goat milk casein hydrolysates. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4242–4251.
- Li-Chan, ECY, Hunag S-L, Jao C-L, Ho K-P, Hsu K-C. (2012).** Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 973-8.
- Lili, Liu., Meihu, M ., Zhaoxia, C., Xieli Y., Wentao, W. (2010).** Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain, *Food Technology and Biotechnology*. 48 (2) 151-160.
- Liu Y., Guo, R. (2008).** pH-dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 136(2-3), 67-73.
- Liu, M., Bayjanov, J. R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R. J. (2010).** The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11–36.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L., Recio, I. (2006).** Identification of antibacterial peptides from bovine k-casein. *Journal of Food Protection*, 69, 2992-2997.
- Maeno, M., Yamamoto, N., Takano, T. (1996).** Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*, 79, 1316- 1321.
- Magboul A.A.A., Mc Sweeney, P.L.H. (1999).** PepN-like aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024: purification and characterization. *Lait*, 79, 515-526.
- Mahaut, J., Jeantet, R., Brulé, G., Schuck, P. (2000).** Les produits industriels laitiers. Technique & documentation-Lavoisier, Paris, 178 pages.
- Mahmoud, MI., Mlone, WT., Cordle, CT. (1992).** Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Technology*, 48, 89-95.
- Malkoski, M., Dashper, S.G., O'Brien-Simpson, N.M., Talbo G.H., Macris m., Cross, K.J., Reynolds, E.C. (2001).** Kappacin, a Novel Antibacterial peptide from Bovine Milk. *Antimicrobiol Agents Chemother*, 45, 2309-2315.

- Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960).** A medium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
- Manders, R. J., Hansen, D., Zorenc, A. H., Dendale, P., Kloek, J., Saris, W. H., van Loon, L. J. (2014).** Protein co-ingestion strongly increases postprandial insulin secretion in type 2. diabetes patients. *Journal of Medicinal Food*, 17, 758-763.
- Manders, R. J., Praet, S. F. E., Meex, R. C. R., Koopman, R., de Roos, A. L., Wagenmakers, A. J. M., Saris, W. H. M., van Loon, L. J. C. (2006).** Protein hydrolysate/leucine ingestion reduces the prevalence of hyperglycemia in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 29, 2721-2722.
- Marathe M. Y., Ghosh J.S. (2009).** Study of proteinase activity of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2083. *Internatinal Journal of Genetics and Molecular Biology*, 1, 001-005.
- Marilley, L., Casey, M. G. (2004).** Flavours of cheese products : metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food and Microbiology*, 90, 139-159.
- Marth, E. H., Steele, J. L. (2001).** Applied dairy microbiology. 2<sup>ème</sup> edition. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., Hernández-Ledesma, B. (2012).** Antihypertensive peptides from food proteins a review. *Food and Function*, 3, 350-361.
- Marugg, J. D., Meijer, W. C., van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P. G., de Vos, W. M. (1995).** Medium-dependent regulation of proteinase gene expression in *Lactococcus lactis*. Control of transcription initiation by specific dipeptides. *Journal of Bacteriology*, 177, 2982-2989.
- Maruyama, S., Mitachi, H., Awaya, J., Kurono, M., Tomizuka, N. Suzuki, H. (1987).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of  $\alpha$ s1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 2557-2561.
- Maruyama, S., Miyoshi, S., Tanaka, H. (1989).** Angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from ficus carica. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2763-2767
- Maruyama, S., Suzuki, H. (1982).** A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1393-1394.
- Masur, K., Schwartz, F., Entschladen, F., Niggemann, B., Zaenker, K.S. (2006).** DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells, *Regulatory Peptides*, 137(3), 147-155.
- Mäyra-Mäkinen, A., Bigret, M. (2004).** Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 3rd Ed. pp. 175-198. Ed. Salminen S., Wright A. et Ouwehand A., Marcel Dekker Inc, New York.



- Mazali, J. (1992).** Bioconversion de permeat de lactosérum par de cellules lactobacilles in mobilisées sur un support solide. Mémoire. Université du Québec. INRS-EA: pp 5-7.
- McCann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, W.P., Lee A., Wan J., Roginski, H. Coventry, M.J. (2006).** Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine as1-casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-323.
- McSweeney, P. L. H. (2004).** Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 127-144.
- Meijer, W., Marugg, J., Hugenholtz, J. (1996).** Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 156-161.
- Meijer, W.C. Hugenholtz.J. (1997).** Proteolytic enzyme activity in lactococci grown in different pretreated milk media. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 139-146.
- Meisel, H. (1993).** Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein. In: Food proteins, structure and functionality ed Schwenke K.D., Mothes R., VCh, Weinheim - New York - Basel - Cambridge - Tokyo, pp 67-75.
- Meisel, H. (1998).** Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal*, 8, 363-373.
- Meisel, H., FitzGerald, R. J. (2003).** Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1289–1295.
- Meisel, H., Frister, H. (1989).** Chemical characterization of bioactive peptides from in vivo digests of casein. *Journal of Dairy Research*, 56, 343-349.
- Meisel, H., Goepfert, A., Günther, S. (1997).** Occurrence of ACE inhibitory peptides in milk products. *Milchwissenschaft*, 52, 307-311.
- Messaoui, H. (2013).** Protéolyse et autolyse de souches de lactobacilles d'origine laitiers. Etude de leur aptitude à hydrolyser les caséines et les protéines de poisson. Mémoire de Magistère. Université d'Oran. Algérie.
- Miguel, M., Recio, I., Ramos, M., Delgado, M. A., Aleixandre, M. A. (2006).** Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *Journal Dairy Science*, 89, 3352-3359.
- Mills, O. E., Thomas, T. D. (1981).** Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *New Zealand Journal of Dairy Technology*, 16, 43-55.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V., Gobetti, M. (2003).** Angiotensin I- Converting-Enzyme-Inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 Proteinasehydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 297-5305.

- Mirmiran, P., Angoorani, P., Ejtahed, H., Azizi, F. (2017).** Camel Milk Has Beneficial Effects on Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 15(2), 421-450.
- Mkrтчyan, H., Gibbons, S., Heidelberger, S., Zloh, M., Limaki, H.K. (2010).** Purification, characterization and identification of acidocin LCHV, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er 317/402 strain narine. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 255-260.
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., Sahu, P. S. (2015).** Milk derived bioactive peptides and their impact on human health: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23, 577-583.
- Monnet, V., Chapot-Chartier, M.P., Gripon, J.C. (1993).** Les peptidases des lactocoques. *Lait*, 73, 97-108.
- Monnet, V., Gripon, J. C. (1994).** Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. De Roissart, H., Luquet, F. M. Edition *Lorica*. Vol 1.
- Moosmann, B., Behl, C. (2002).** Secretory peptide hormones are biochemical antioxidants: Structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology*, 61, 260-268.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A. (2006).** Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16, 61-69.
- Naes, H., Nissen-Meyer, J. 1992.** Purification and N-terminal amino acid determination of dipeptide transport in membrane vesicles of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 171, 292- 298.
- Nakajima, Y., Tsuji, Y., Homma, K., Natori, S. (1997).** A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Its purification and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 23805-23810.
- Nandhini, B., Angayarkanni, J., Palaniswamy, M. (2012).** Angiotensin converting enzyme inhibitory activity and antioxidant properties of goat milk hydrolysates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 367-370.
- Ngo, D. H., Kang, K. H., Ryu, B., Vo, T. S., Jung, W. K., Byun, H. G., Kim, S. K. (2015).** Angiotensin-Converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenoei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 174, 37-43.
- Nongonierma A. B., FitzGerald R. J. (2014).** Susceptibility of milk protein-derived peptides to dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) hydrolysis. *Food Chemistry*, 145, 845-852.

- Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2013).** Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 1909-1917
- Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2016b).** Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides*, 79, 1-7.
- Nongonierma, A. B., FitzGerald, R. J. (2015).** Bioactive properties of milk proteins in humans: A review. *Peptides*, 73, 20-34.
- Nongonierma, A. B., O'Keeffe, M. B., Fitz –Gerald, R. J. (2016a).** Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. Rehydration and Solubility Characteristics of High-Protein, *Dairy Powders*, 417-482.
- Ojeda, M. J., Cereto-Massagué, A., Valls C., Pujadas, G. (2014).** DPP-IV, An Important Target for Antidiabetic Functional Food Design. *Food informatics*, 177-212.
- O'Keeffe, M. B., Conesa, C., Fitz-Gerald, R. J. (2017).** Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *International Journal of Food Science and Technology* , 52(8), 1751–1759.
- Osaana, N., Donkor, Anders, Henriksson ., Todor, Vasiljevic ., Nagendra, P. Shah. (2006).** Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Le Lait INRA Editions*, 87 (1), 21-38.
- Otto, R., de Vos W. M., Gavrielli J. (1982).** Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg2: Influence of pH on selection in chemostats of variant lacking a protease plasmid. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 1272- 1277.
- Ou, B.X., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001).** Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and. Food Chemistry*, 49, 4619-4626
- Pailin, T., Kang, D.H., Schmidt, K., Fung, D.Y.C. (2001).** Detection of extracellular bound proteinases in EPS-producing lactic acid bacteria cultures on skim milk agar. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 45-49.
- Pastar, I., Fira, D., Strahinic, I., Krstic, K., Begovic, J., Toposirovic, L., Jovanovic, G. (2006).** Analysis of presence of PrtR proteinases gene in natural isolates of *Lactobacillus rhamnosus*. *Folia Microbiologica*, 51, 535-541.

- Perpetuo, E.A., Juliano, L. Lebrun, I. (2003).** Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin potentiating peptides from hydrolysis of casein. *Journal of Protein Chemistry*, 22, 601-606.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G. (2008).** Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, 25, 442-451.
- Phelan, M., Aherne, A., Fitzgerald, R J., O'Brien, N. M. (2009).** Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*, 19, 643–654.
- Picon, A., Garcia-Casado, M.A., Nunez, M. (2010).** Proteolytic activities, peptide utilization and oligopeptide transport systems of wild *Lactococcus lactis* strains. *International Dairy Journal*, 20, 156-162.
- Pihlanto, A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
- Pihlanto, A., Virtanen, T., Korhonen, H. (2010).** Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20, 3-10.
- Pihlanto-Leppala, A., Rokka, T., Korhonen, H. (1998).** Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *International Dairy Journal*, 8, 325-331.
- Poolman, B. (1993).** Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 125-148.
- Power, O., Jakeman, P., Fitzgerald, R. J. (2013).** Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44, 797-820.
- Pownall, T.L., Udenigwe, C.C., Aluko, R.E. (2010).** Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712-4718.
- Pro,B ., Dang, NH. (2004).** CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histology and Histopathology*, 19(4), 1345-51
- Quian, Z.-Y., Jolles, P., Migliore-Samour, D., Fiat A.-M. (1995).** Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1243, 25-32.

- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., al. (2007).** Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33-41.
- Ramasamy, V., Natarajan, A. M. (1981).** Purine and pyrimidine requirements of active lactic acid bacteria. *Dairy Science Abstracts*, 43, 283.
- Recio, I., Visser, S. (1999).** Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine  $\alpha$ 2-casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, 314-326.
- Rival, S.G., Fornaroli, S., Boeriu, C.G., Wichers, H.J. (2001).** Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoyxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 287-294.
- Rizzello, C. G., Losito I., Gobbetti, M., Carbonara, T., De Bari, M. D., Zambonin, P. G. (2005).** Antibacterial activities of peptides from the water-soluble extracts of Italian cheese varieties. *Journal of Dairy Science*, 88, 2348-2360.
- Robert, M.C., Razaname, A., Mutter, M., Juillerat, M.A. (2004).** Peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6923-6931.
- Roblet, C., Amiot, J., Lavigne, C., Marette, A., Lessard, M., Jean, J., al. (2012).** Screening of in vitro bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiralwound ultrafiltration membranes. *Food Research International*, 46, 237-249.
- Rodriguez, J. M., Martínez, M. I., Horn, N., Dodd, H. M. (2003).** Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food and Microbiology*. **80** :101-116.
- Röhrborn, D., Wronkowitz, N., Eckel J. (2015).** DPP4 in Diabetes. *Frontiers in Immunology*, 6, 386.
- Rollema, H.H. (1992).** Casein association and micelle formation. In : Advanced dairy chemistry-1: Proteins. Fox P. F. (Ed.), *Elsevier Applied Science*, London, UK, 111-140.
- Roudj, S. (2010).** Activité protéolytique de *Lactobacillus* : purification et caractérisation de protéases et d'une aminopeptidase. Thèse de doctorat. Université d'Oran. Algérie.
- Roudj, S., Belkheir, K., Zadi-Karam, H., Karam, N-E. (2009).** Protéolyse et autolyse chez deux lactobacilles isolés de lait camelin du sud ouest Algérien. *European Journal of Scientific Research*, 34 (2), 218-227.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., Zoon, P. (2002).** An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12, 163-171.

- Sadat-Mekmene, L, Genay, M, Atlan, D, Lortal, S, Gagnaire, V. (2011).** Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*: a review. *International Journal of Food and Microbiology*, 146, 1-13.
- SAHA. (2014).** 12ème Congrès Annuel de la Société Algérienne d'Hypertension Artérielle, 25 et 26 OCTOBRE 2014 à SETIF.
- Saito, T. (2008).** Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 606, 295-317.
- Saito, T., Nakamura, T., Kitazawa, H., Kawai, Y., Itoh T. (2000).** Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese », *Journal of Dairy Science*, 83, 1434-1440.
- Salam, M., Moosavi-Movahedi, A. A., Moosavi-Movahedi, F., Reza, Ehsani, M. (2011).** Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research*, 78(4), 471-478.
- Salminen, S., Wright, A. V., Ouwehand, A. (2004).** Lactic acid bacteria. microbiological and functional aspects. *Marcel Dekker. Inc.*, U.S.A.
- Sánchez, A. Vázquez, A. (2017).** Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1, 29-46.
- Sánchez-Rivera, L., Diezhandino, I., Gómez-Ruiz, J. Á., Fresno, J. M., Miralles, B., Recio, I. (2014).** Peptidomic study of Spanish blue cheese (Valdeón) and changes after simulated gastrointestinal digestion. *Electrophoresis*, 35, 1627-1636.
- Sasaki, S., Bosman, B. W., Tan, P. S. T. (1995a).** Immunological and electrophoretic study of the proteolytic enzymes from various *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 611-620.
- Sasaki, S., Bosman, B. W., Tan, P. S. T. (1995b).** Comparaison of proteolytic activities in various lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 601-610.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006).** Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(1), 394-406
- Schlimme, E., Meisel, H. (1995).** Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung*, 39, 1-20.
- Schmidt, D.G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure. In: Developments in dairy chemistry-1. Fox P. F. (Ed.), *Applied science publisher*, London, 61-86.
- Selby-Smith, J., Hillier, A. J., Lees, G. J., Jagos, G. R. (1975).** The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. *Journal of Dairy Research*, 42, 132-138.



- Sentandreu, M. A., Toldra, F. (2006).** A rapid, simple and sensitive fluorescence method for the assay of angiotensin-I converting enzyme. *Food Chemistry*, 97, 546-554
- Seppo, L., Jauhiainen, T., Poussa, T., Korpela, R. (2003).** A Fermented Milk High in Bioactive Peptides has a Blood Pressure-Lowering Effect in Hypertensive Subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77(2), 326-30.
- Settanni, L., Moschetti, G. (2010).** Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 27, 691- 697.
- Shah, N.P. (2000).** Effects of milk-derived bioactives: An overview. *British Journal of Nutrition*, 84, 3-10.
- Sharmin, S., Towhid, Hossain, M.D., Anwar, M.N. (2004).** Proteolytic activity of a *Lactobacillus* species isolated from rumen. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 2105-2108.
- Shin, J.Y., Jeon, W.M; Kim G.B; Lee, B.H. (2004).** Purification and Characterization of Intracellular Proteinase from *Lactobacillus casei ssp. casei* LLG. *Journal of Dairy Sciences*, 87, 4097- 4103.
- 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.
- Siezen, R. J. (1999).** Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 139-155
- Silva, S.V., Malcata, F.X. (2005).** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Silveira, S. T., Martínez-Maqueda, D., Recio I., Hernández-Ledesma, B. (2013).** Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in  $\beta$ -lactoglobulin. *Food chemistry*, 141(2), 1072-1077.
- Simova, E., Beshkova, D. (2007).** Effect of growth phase and growth medium on peptidase activities of starter lactic acid bacteria. *Le Lait*, 87, 555-573.
- Singh, B.P., Vij, S., Hati, S. (2014).** Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54, 171-179.
- Slover, C.M., Danziger, L. (2008).** *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30 (4), 23-27.

- Smeianov, V. V., Wechter, P., Broadbent, J. R., Hughes, J. E., Rodriguez, B. T., Christensen, T. K., Ardo, Y., Steele, J. L. (2007).** Comparative high density microarrayanalysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus richculture medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2661-2672.
- Smid, F. J., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. (1989).** Mechanism and energetics of dipeptide transport in membrane vesicles of *lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 171, 292-298
- Smit, Gerrit ., Smit, Bart, A. Engels Wim, J.M. (2005).** Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.
- Smith,P., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K, Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D.C.. (1985).** Measurement of protein using bicinchiconic acid, *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Smukowski, M., Wendorff, WL., Ping, Y., Rao, RD. (2003).** Impact of cheese defects on U.S. graded cheeses. *Journal of Dairy Sciences*, 86, 364.
- Sofia, V., Silva, F., Malcata, X. (2005).** Caseins as source of bioactive peptides, *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Sridhar, V.R., Hughes, J.E., Welker, D.L., Broadbent, J.R., Steele J.L. (2005).** Identification of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillushelveticus* CNRZ32 and the role of these genes in hydrolysis of model bitter peptides. *Appiedl Environmenta Microbiology*, 71, 3025-3032.
- St-Gelais, D., Tirard-Collet, P. (2002).** Fromage. Dans : Science et technologie du lait : transformation du lait. *Presses internationales Polytechnique, Montréal*, 349-415.
- Stiles, ME., Holzapfel, WH. (1997).** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal Food Microbiology*, 36 (1), 1-29.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000).** Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutrtional Biochemistry*, 11, 128–131.
- Svedberg, J., de Haas, J., Leimenstoll, G., Paul, F., Teschemacher, H. (1985).** Demonstration of -casomorphin immunoreactive materials in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides*, 6, 825-830.
- Swearingen,P.A.,Sullivan, D.J., Warthesen, J.J. (2001).** Isolation, characterization and influence of native nonstarter lactic acid bacteria on cheddar cheese quality. *Journal of Dairy Sci*, 84, 50-59.



- Tagg, J. R., Mc, Given A. R. (1971).** Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21(5), 943-945.
- Tagliazucchi, D., Helal, A., Verzelloni, E., Conte, A. (2016).** Bovine milk antioxidant properties: effect of *in vitro* digestion and identification of antioxidant compounds. *Dairy Science and Technology*, 96(5), 657–676.
- Tam, R. Saier ,M.H.Jr. (1993).** Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. in *Microbiological reviews*, 57(2), 320-46.
- Tan, P. S. T., Poolman, B., Konings, W. N. (1993).** Proteolytic enzymes of *Lactococcus lactis*. *Journal of Dairy Research*, 60, 269-286.
- Tauzin, J., Mielo, L., Gaillard, J. L. (2002).** Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine  $\alpha_{S2}$ -casein. *FEBS Letters*, 531, 369-374.
- Tellez, A., Corredig, M., Turner, P., Morales, R., Griffiths, M. W. (2011).** A peptidic fraction from milk fermented with *L. helveticus* protects mice against Salmonella infection. *International Journal of Dairy Technology*, 21, 607-614.
- Terzaghi, B.E., Sandine, W.E. (1975).** Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807-813.
- Teschemacher, H., Koch G., Brantl, V. (1994).** Milk protein derived atypical opioid peptides and related compounds with opioid antagonist activity. In -Casomorphins and Related Peptides: Recent Developments. 3-17. [V Brantl and H Teschemacher, editors]. Wenham: VCH.
- Tomé, D. (1998).** Peptides fonctionnels. *Danone World Newsletter*. n°17.
- Tsakalidou, E., Anastasiou, R., Vandenberghe, L., Van beeumen, J., Kalantzopoulos, G. (1999).** Cell-Wall-Bound Proteinase of *Lactobacillus delbrueckii subsp.lactis* ACA-DC178: Characterization and Specificity for  $\alpha$ -casein. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 2035-2040.
- Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., Haandrikman, A. (1993).** Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 175, 7523-7532.
- Uehara, S., Monden, K., Nomoto, K., Seno, Y., Kariyama, R., Kumon, H. (2006).** A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28, 30-34.

- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., Nakajima, H. (2012).** Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-IV)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*, 22, 24-30.
- Umeda, T., Aoki T. (2002).** Relation between micelle size and micellar calcium phosphate. *Milchwissenschaft*, 57(3), 131-133.
- Van den Berg, G., Escher, J. T. M., de Koning, P. J., Bovenhuis, H. (1992).** Genetic polymorphism of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin in relation to milk composition and processing properties. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 46, 145-168.
- Van der Ven, C. (2002).** Biochemical and functional characterisation of casein and whey protein hydrolysates. A study on correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Mini-Review. *Applied Microbiology. Biotechnology*, 71, 394-406.
- VanDen Berg, J.C., Smits A., Pot, B., Ledeboer, A.M., Kersters, K., Verbakel, J.M.A., Verrips, C.T. (1993).** Isolation, screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnology*, 7, 189-205.
- Vermeirssen, V., van der Bent, A., Van Camp, J., Van Amerongen, A., Verstraete, W. (2004).** A quantitative *in silico* analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests. *Biochimie*, 86, 231-239.
- Vierling, E. (2008).** Aliments et boissons. Filières et produits. 3<sup>ème</sup> édition. Doin éditeurs, CRDP d'Aquitaine, 277 pages.
- Vinogradov, E., Valence, F., Maes, E. ; Jevaba, I., Chuat, V., Lortal, S., Grard , T., Guerardel, Y., Sadovskaya, I. (2013).** Structural studies of the cell wall polysaccharides from three strains of *Lactobacillus helveticus* with different autolytic properties: DPC4571, BROI, and LH1. *Carbohydrate Research* , 379, 7-12.
- Visser, S., Exterkate, F.A., Slangen, C.J., De Veer, G.J.C.M. (1986).** Comparative study of action of cell wall proteinases from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine  $\alpha$ 1-,  $\beta$ -, and  $\kappa$ -casein. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 1162-1166.
- Visser, S., Robben, A. J. P. M., Slangen, C. J. (1991).** Specificity of a cell-envelope located proteinase (PIII-type) from *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* AM1 in its action on bovine  $\beta$ -casein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 477-483.
- Wakai, T., Yamamoto, N. (2012).** Antihypertensive peptides specific to *Lactobacillus helveticus* fermented milk, in *Biotechnology – Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, ed Sammour R. H., editor. (InTech: ), ISBN 978-953-51-0151-2.

- Wesley, UV., McGroarty, M., Homoyouni, A. (2005).** Dipeptidyl peptidase inhibits malignant phenotype of prostate cancer cells by blocking basic fibroblast growth factor signaling pathway, *Cancer Research*, 65(4), 1325-1334
- Williams, A.G., Noble, J. et Banks, J.M. (2001).** Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 11, 203-215.
- Wisselink, H.W., Weusthuis R.A., Eggink G., Hugenholtz J., Grobbee G.J. (2002).** Mannitol production by lactic acid bacteria. A review. *International Dairy Journal*, 12, 151-161.
- Yamamoto, N., Akino, A., Takano, T. (1994).** Antihypertensive effects of peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 917-922.
- Yateem, A., Balba, M. T., Al-Surrayai, T., Al-Mutairi, B., Al-Daher, R. (2008).** Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from camel milk. *International Journal of Dairy Sciences*, 3, 194-199.
- Yoshida, T. (2004).** Peptide separation by hydrophilic-interaction chromatography: A review. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 60, 265-280.
- Yoshikawa, M., Tani, F., Shiota, H., Usui, H., Kurahashi, K., Chiba, H. (1994).** Casoxin D, an opioid antagonist/ileum-contracting/vasorelaxing peptide derived from human casein. In: -Casomorphins and Related Peptides: Recent development. Brantl V. & Teschemacher H., editors. Weinheim: VCH, Germany, pp. 43-48.
- Zhang, H., Cai, Y. (2014).** Lactic Acid Bacteria. Fundamental et Practis. Springer. Dordrecht Heidelberg New York London : p 535.
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., Xia, E. K. (2016).** The Structure-Activity Relationship of the Antioxidant Peptides from Natural Proteins. Review. *Journal molecules*, 21(1), 72.
- Zucht, H.-D., Raida M., Adermann K., Magert, H.-J. Forssmann, W.-G (1995).** Casocidin-I: A casein- $\alpha$ s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *FEBS Letters*, 372, 185-188.

**Ressources électroniques :**

**BIOPEP-UWM database:** [www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep](http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep)

**FAO. (1998).** Archives de document de la FAO, le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. [www.fao.org](http://www.fao.org)

**OMS (2016):** Organisation mondiale de la santé : <http://www.who.int/entity/diabetes/global-report/fr/index.html>

**Venny's on-line reference:** Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. *An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.* <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

# *Annexes*

**Annexe 1: Milieux de culture****1. Composition des milieux de culture**

- **Milieu MRS (Man, Rogosa et Sharpe., 1960) pour culture des lactobacilles**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Extrait de viande	10 g
Glucose	20 g
Acétate de sodium	5 g
Citrate d'ammonium	1 g
Sulfate de manganèse	0,2 g
Phosphate dipotassique	2 g
Tween 80	1 ml
Eau distillée	1000 ml

pH = 5.7

Stérilisation à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

Le milieu MRS est utilisé sous forme liquide ou solide additionné d'agar agar à 1,5 %.

- **Milieu M17 (Terzaghi et Sandine., 1975) pour culture des lactocoques**

Extrait de viande	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Peptone	10 g
Glycine de phosphate de sodium	19 g
Acide ascorbique	0,25 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Eau distillée	950 ml

pH = 7.2

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

**Préparation de la solution de lactose :**

5 g de lactose.

50 ml d'eau distillée.

La solution de lactose est rajoutée au milieu de culture, après Autoclavage 10 min à 110 °C.

Le milieu M17 est utilisé sous forme liquide ou solide additionné d'agar agar à 1,5 %.

- **Milieu liquide substitué additionné de caséine**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Chlorure de sodium	1,5 g
Sulfate d'ammonium	1 g
Calcium chloride dihydrate (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0,02 g
Sulfate ferreux heptahydrate (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,02 g
Caséines	10 g
Extrait de levure	0,5 g
Sucrose	0,5 g
Eau distillée	1000 ml

pH=7

Stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

## 2: Préparation de lait écrémé reconstitué à 10%

Poudre de lait écrémé 10 g

Eau distillée 100 ml

Stérilisation à l'autoclave à 110°C pendant 10 min

## 3. Préparation des milieux pour le test de protéolyse

- **Milieu liquide MRS-lait (2%)**

Milieu MRS liquide stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. 98%

Lait écrémé reconstitué à 10% et stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 10 min 2%

- **Milieu solide MRS-lait (2%)**

Milieu MRS solide stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min. 98%

Lait écrémé reconstitué à 10% et stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 10 min 2%

- **Milieu liquide M17-lait (2%)**

Milieu MRS liquide stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min 98%

Lait écrémé reconstitué à 10% et stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 10 min. 2%

- **Milieu solide M17-lait (2%)**

Milieu M17 solide stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 min 98%

Lait écrémé reconstitué à 10% et stérilisé à l'autoclave à 110°C pendant 10 min 2%

- **Gélose au lait (2%)**

Agar préparé avec l'eau distillée à 1.5% 98%

Lait écrémé reconstitué à 10% 2%

- **Gélose au lait (1%)**

Agar préparé avec l'eau distillée à 1.5%	99. %
Lait écrémé reconstitué à 10%.	1%
Azide de Sodium $\text{NaN}_3$	0.02%

## **Annexe 2 : Préparation des tampons et solutions**

- **Préparation du tampon phosphate (0.1M, pH 7)**

Solution A	:	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.36% (m/v).
Solution B	:	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3.58% (m/v).
2 volumes de la solution A + 1 volume de la solution B.			

- **Préparation du tampon Tris-HCL (0,1M, pH 7)**

Tris	0,1M	tampon pH 7 (50ml Tris + 45ml HCL + 5ml $\text{H}_2\text{O}$ distillée).
HCL	0,1M	tampon pH 8 (50ml Tris + 26,8ml HCL + 23,2 ml $\text{H}_2\text{O}$ distillée).

- **Préparation du tampon phosphate potassium (0,1M, pH 7)**

Solution A	:	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	:	1M	1, 36%	(m/v).
Solution B	:	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	:	1M	1, 74%	(m/v).

- **Sulfate d'ammonium**

% de saturation en sulfate d'ammonium à 0°C																	% saturation initiale en sulfate d'ammonium (à 0°C)
20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
grammes de sulfate d'ammonium à ajouter à un litre de solution:																	
106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697	0
79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662	5
53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627	10
26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592	15
0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557	20
	0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522	25
		0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488	30
			0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453	35
				0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418	40
					0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383	45
						0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348	50
							0	30	61	93	127	161	197	235	273	313	55
								0	31	62	95	129	164	201	239	279	60
									0	31	63	97	132	168	205	244	65
										0	32	65	99	134	171	209	70
											0	32	66	101	137	174	75
												0	33	67	103	139	80
													0	34	68	105	85
														0	34	70	90
															0	35	95
																0	100

**Figure 31 :** Les quantités de sulfate d'ammonium requises pour atteindre les différents niveaux de saturation pour la purification partielle des protéases extracellulaires



- **Préparation de la solution de caséines à 2.5 %**

- 1- Dissoudre 2.5 g de la poudre de caséines dans 10 ml d'eau distillée et 10 ml de NaOH (0.2 N),
- 2- Ajuster le pH à 7.8 avec le HCl (0.1 N),
- 3- Compléter le volume de la solution de caséines à 100 ml avec de l'eau distillée,
- 4- Chauffer la solution à 90°C pendant 15 min au bain-marie,
- 5- Stérilisation à l'autoclave à 121°C pendant 15 min.

### **Annexe 3 : Solutions pour Electrophorèse**

- **Tampon d'échantillon**

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1 ml
Dodécylsulfate de sodium SDS 10%	1.6 ml
Glycérol	0.8 ml
2 β-mercaptoéthanol	0.4 ml
Bleu de Bromophénol 0.05 %	0.4 ml
H <sub>2</sub> O milli-Q	3.8 ml

- **Tampon de migration (XT Running buffer, Solution commercialisée 20X concentrée)**

Tris base	60 g/L
Glycine	288 g/L
SDS	20 g/L

Cette solution est diluée 20 fois avant son utilisation : 25 ml de XT running buffer 20 x en 500 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q.

- **Solution de Coloration**

Bleu de Coomassie R250	0.05g
Acide acétique	5 ml
Méthanol	50 ml
Eau distillée	40 ml

- **Solution de décoloration**

Acide acétique	10 ml
Méthanol	30 ml
Eau distillée	60 ml

**Annexe 4: Séquences primaires des caséines****1. Caséine du lait de brebis**

- **Alpha-S1 casein precursor [Ovis aries]**

GenBank: ACJ46472.1

ORIGIN

```

1 mklilitclv avalarpkhp ikhqqglspev lnenllrfvv apfpevfrke ninelskdig
61 sesiedqame dakqmkagss ssseeivpns aeqkyiqked vpserylgyl eqlrlkkyn
121 vpqlleivpks aeeqlhsmke gnpahqkqpm iavnqelayf ypqlfrqfyq ldaypsgawy
181 ylpplgtqytd apsfdsipnp igsensgkit mplw

```

//

- **Alpha-S2-casein precursor [Ovis aries]**

NCBI Reference Sequence: NP\_001009363.1

ORIGIN

```

1 mkffiftcll avalakhkme hvssseepin isqeiyykqek nmaihprkek lcttsceevv
61 rnadeeeysi rrsseesaev apeevkitvd dkhyqkalne inqfyqkfpq ylqylyqgpi
121 vlnpwdqvkr nagpftptvn reqlstseen skktidmest evftkktklt eeeknrlnfl
181 kkisqyyqkf awpqylktvd qhqkamkpwt qpktnaipyv ryl

```

//

- **Beta-casein precursor [Ovis aries]**

NCBI Reference Sequence: NP\_001009373.1

ORIGIN

```

1 mkvlilxclv alalareqee lnvvetes lssseesith inkkiekfqs eeqqqtedel
61 qdkihpfaqa qslvypftgp ipnslpqn timerlqtpvvp pflqpeimgv pkvketmvpk
121 hkempfpkyp vepftesqsl tltdevklhl plplvqswmh qppqplpptv mfppqsvlsl
181 sqpkvlpvpq kavpqrmpv qaflllyqepv lgpvrpfpfi lv

```

//

- **Kappa-casein precursor [Ovis aries]**

GenBank: AHN09738.1

ORIGIN

```

1 mmksfflvvt ilaltlpflg aeqnqeqri ccekderffd dkiakyipiq yvlstrypsyg
61 lnyyqqrpva linnqflpyp yyakpvavrs paqtlqwqvl pnavpakscq dqptamarhp
121 hphlsfmaip pkkdqdktei paintiasae ptvhstptte avnavdnpe assesiasap
181 etntaqvtst ev

```

//

## 2. Caséine du lait bovin

- **Alpha-S1 casein precursor [Bos taurus]**

GenBank: ACG63494.1

ORIGIN

```
1 mklilitclv avararpkhp ikhqglpgev lnenllrffv apfpevfgke kvnelsskdig
61 sestedqame dikqmeaesi ssseeivpns veqkhiqkdd vpserylgyl eqllrlkkyk
121 vpqleivpns aeerlhsmke gihaqqkepm igvnqelayf ypelfrqfyq ldaypsgawy
181 yvplgtqytd apsfddipnp igsensgktt mplw
```

//

- **Alpha-S2-casein precursor [Bos taurus]**

NCBI Reference Sequence: NP\_776953.1

ORIGIN

```
1 mkffiftcll avalakntme hvssseesii sqetykqekn mainpskenl cstfckevvr
61 naneeesig ssseesaeva teevkitvdd khyqkalnei nqfyqkfpqy lqylyqgpiv
121 lnpwdqvkrn avpitptlnr eqlstseens kktvdmeste vftkkktkte eeknrlnflk
181 kisqryqkfa lpqylktvyq hqkamkpwiq ptkkvipyvr yl
```

//

- **Beta-casein precursor [Bos taurus]**

GenBank: AAA30480.1

ORIGIN

```
1 mkvlilaciv alalarelee lnpvgeives lssseesitr inkkiekfqs eeqqqtedel
61 qdkihpfaqt qslvypfpgp ipnslpqnip pltqtpvvvp pflqpevmgv skvkeamapk
121 hkempfpkyp vepftesqsl tltdvenlhl plllqswmh qphqplpptv mfppqsvlsl
181 sqskvlpvpq kavpypqrdm piqaflllyqe pvlgpvrgpf piiv
```

//

- **Kappa-casein precursor [Bos taurus]**

GenBank: AAA30433.1

ORIGIN

```
1 mmksfflvvt ilaltlpflg aqeqnqeqpi rcekderffs dkiakyipiq yvlstrypsyg
61 lnyyqqkpva linnqflpyp yyakpaavrs paqilqwqvl sntvpakscq aqpttmarhp
121 hphlsfmaip pkknqdktei ptintiasge ptstptieav estvatleas pevtespei
181 ntvqvtstav
```

//

### 3. Caséine du lait de chamelle

- **Beta-casein precursor [Camelus dromedarius]**

ORIGIN

```
1 mkvlilacrv alalarekee fktageales issseesith inkqkiekfk ieeqqqtete
61 qqdkiytfpq pqslyvshte pipypilpqn flpplqpavm vpflqpkvmd vpktketiip
121 krkempllqs pvvpftesqs ltltdlenlh lplpllqslm yqipqpvpqt pmippqslls
181 lsqfkvlvpv qqmvpyppra mpvqavlpfq epvpdpvrgl hpvpqplvpv ia
```

//

- **Alpha-S1 casein precursor [Camelus dromedarius]**

ORIGIN

```
1 mklililtclv avalarpkyp lrypevfqne pdsieevlnk rkilelavvs piqfrqenid
61 elkdrnept edhimedter kesgsssee vvsstteqkd ilkedmpsqr yleelhrlnk
121 ykllqleair dqkliprvkl sshpyleqly rinednhpql gepvkvtqp fpqffqlgas
181 pyvawyyppq vmqyiahps ydtpegiase dggktdvmpq ww
```

//

- **Alpha-S2-casein precursor [Camelus dromedarius]**

ORIGIN

```
1 mkffiftcll avvlakhemd qgssseesin vsqqkfkqvk kvaihpsked icstfceeav
61 rnikevesae vptenkisqf yqkwkflqyl qalhqqqivm npwdqgktra ypfiptvnte
121 qlsiseeste vpteestevf tkktelteee kdhqkflnki yqyyqtflwp eylktvyqqy
181 ktmtpnwhik ryf
```

//

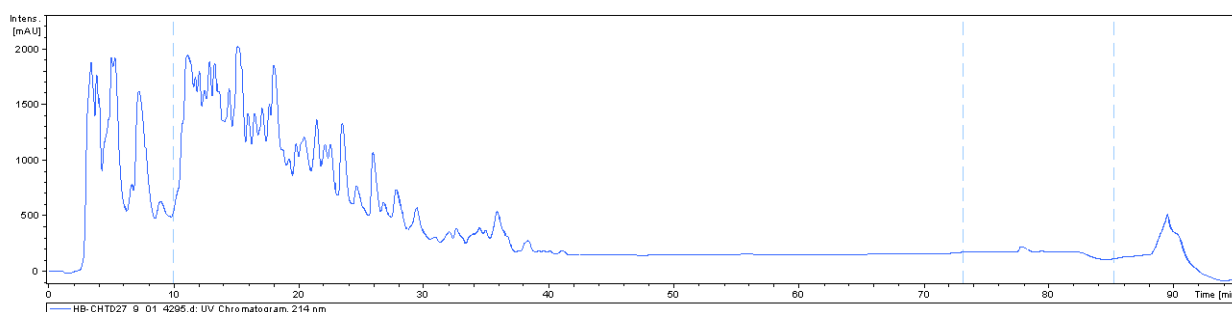
- **Kappa-casein [Camelus dromedarius]**

ORIGIN

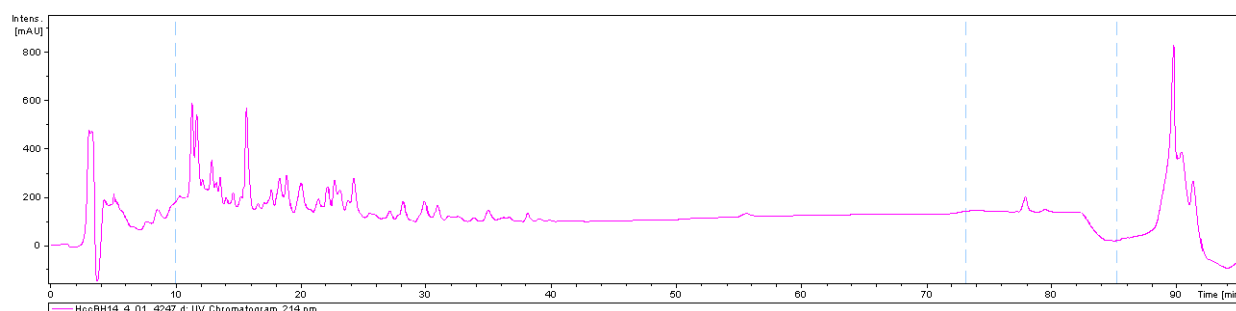
```
1 mksfflvvti laltlpflga evqnqeptc cekverllne ktvkyfpiqf vqsrypsygi
61 nyyqhrlavp innqfipypn yakpvairlh aqipqcqalp nidpptverr prprpsfia
121 ppkktqdktv npaintvatv eppvptae avntvviaea ssefittstp etttvqitst
181 ei
```

//

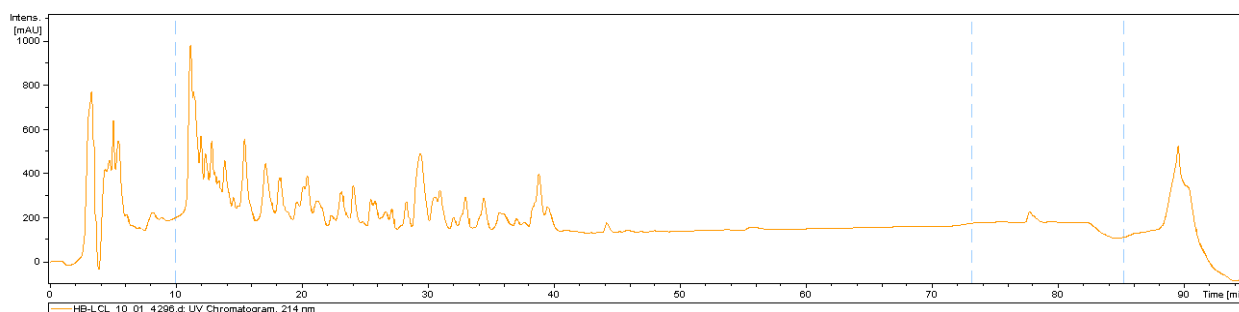
### Annexe 5 : Chromatogrammes obtenus par HPLC à 214 nm correspondants aux différents hydrolysats



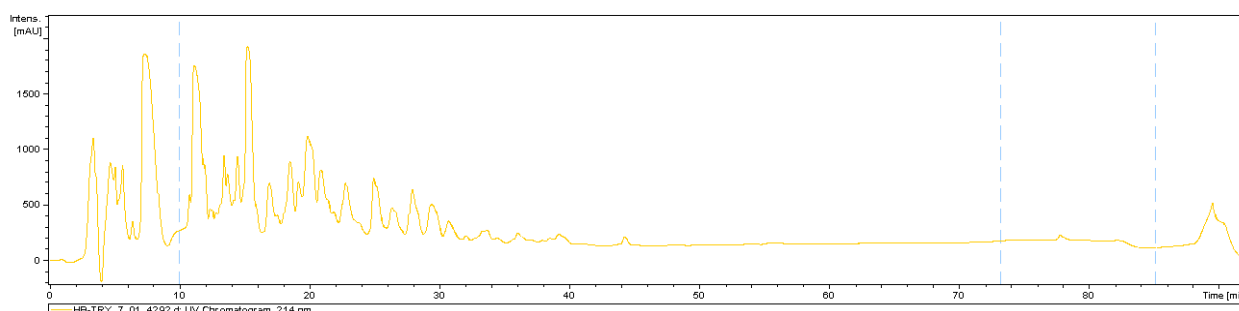
**Figure 32 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche *Lb. brevis* CHTD27.



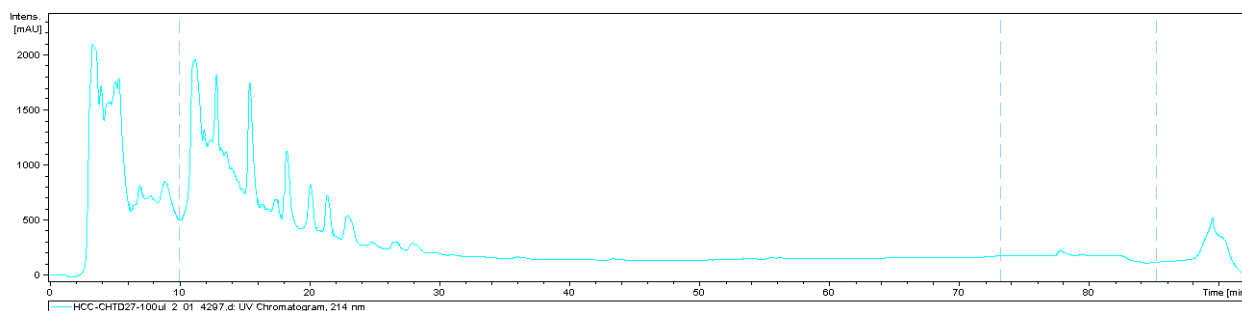
**Figure 33 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche *Lb. plantarum* BH14.



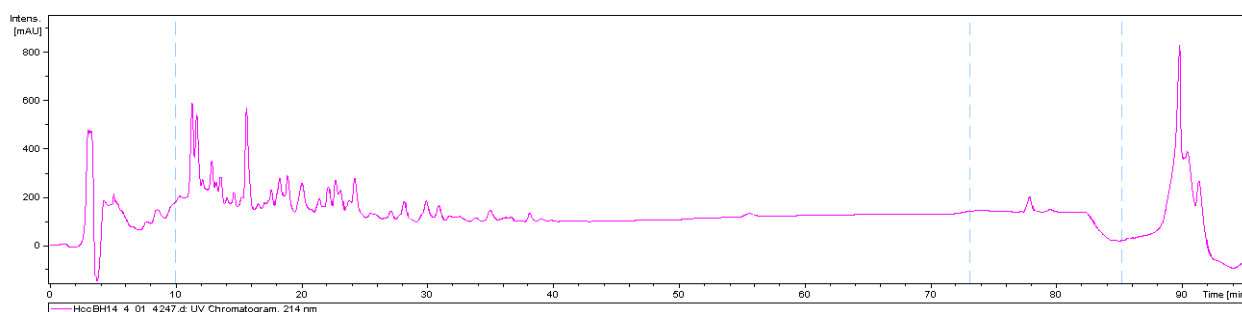
**Figure 34 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par les protéases issues de la souche *Lc. lactis* LCL.



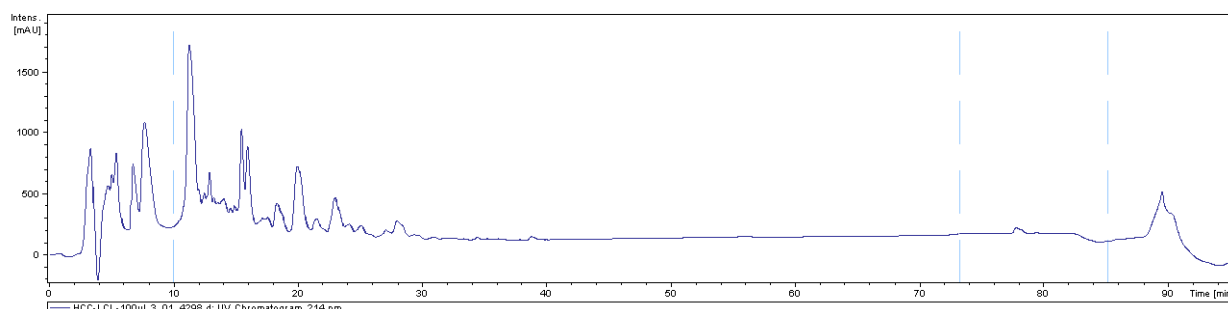
**Figure 35 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de brebis par la trypsine.



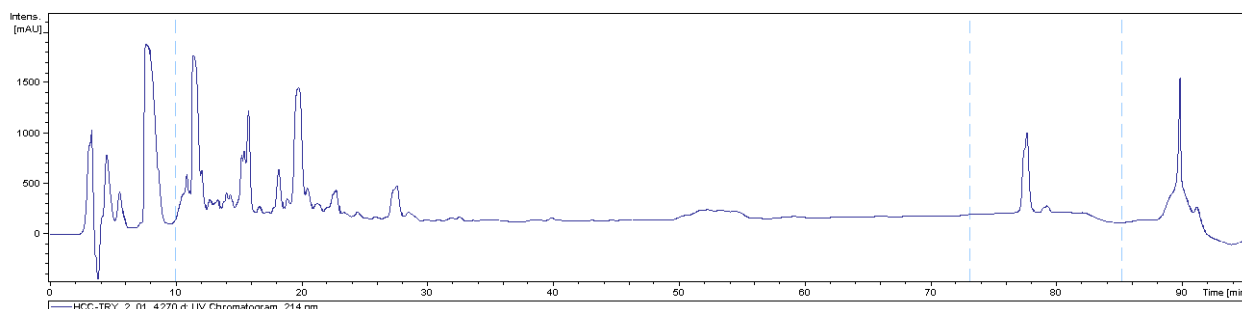
**Figure 36 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche *Lb. brevis* CHTD27.



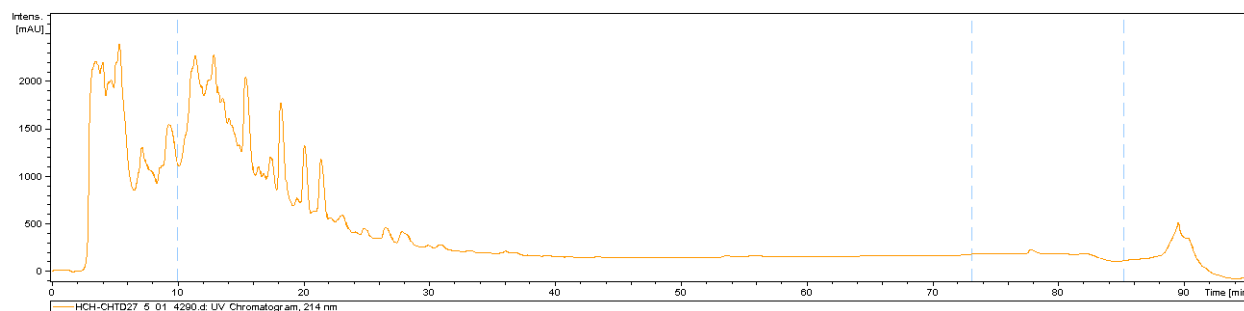
**Figure 37 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche *Lb. plantarum* BH14.



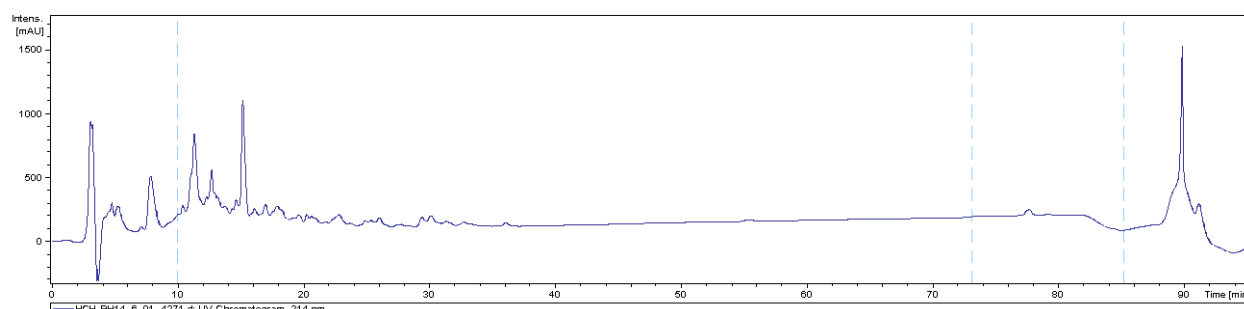
**Figure 38 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine par les protéases issues de la souche *Lc. lactis* LCL.



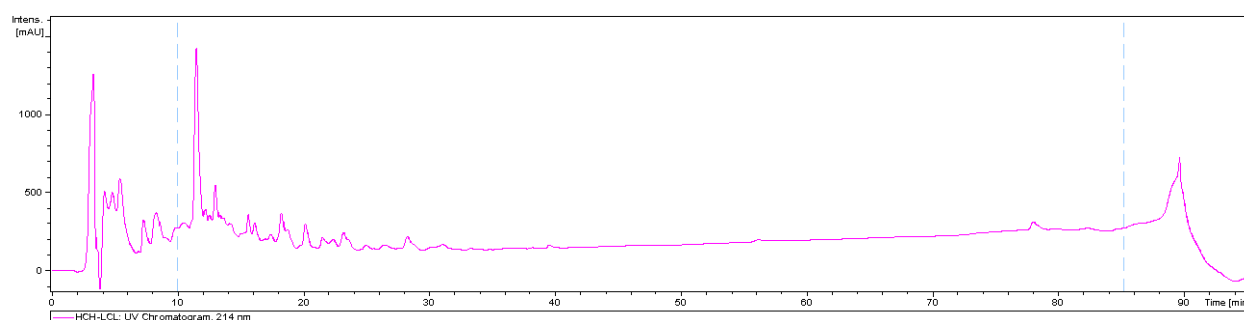
**Figure 39 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine bovine la trypsine.



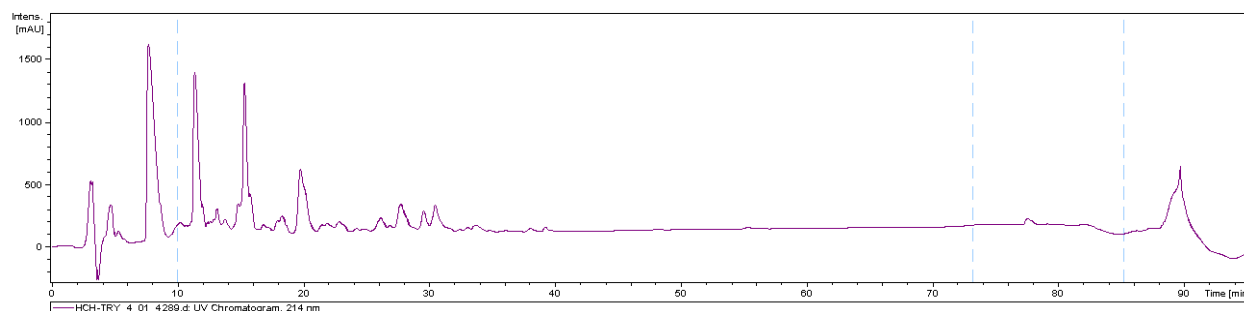
**Figure 40 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche *Lb. brevis* CHTD27.



**Figure 41 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche *Lb. plantarum* BH14.



**Figure 42 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par les protéases issues de la souche *Lc. lactis* LCL.



**Figure 43 :** Chromatogramme obtenu par HPLC correspondant aux hydrolysats de la caséine de chamelle par la trypsine

**Annexe 6: Réactifs utilisés dans la recherche des activités biologiques****1. Activité inhibitrice de l'enzyme ACE (angiotensin-I converting enzyme)****Réactifs à préparer et à conserver**

- **Solution A (tampon Tris-HCl 150 mM)**

11,82 g de Tris-HCl sont Dissous dans 400 ml de H<sub>2</sub>O milli-Q, le pH est ajusté à 8.3 puis le volume est complété dans une fiole jaugée à 500 ml avec H<sub>2</sub>O milli-Q

- **Solution B (tampon Tris-HCl 150 mM et NaCl 1125 mM)**

16.425 g de NaCl sont Dissous dans 200 ml de la solution A, le pH est ajusté à 8.3 puis le volume a été complété dans une fiole jaugée à 250 ml avec la solution A.

Les solutions A et B peuvent être conservées 1 mois à 4°C

- **Solution de ZnCl<sub>2</sub> 0.1mM**

Le Réactif ZnCl<sub>2</sub>.1M est dilué au 1/100, 10 µl de cette solution sont ajoutés à 990 µl de H<sub>2</sub>O milli-Q (dilution 1 mM). Après agitation, 100 µl de la solution 1 mM sont ajoutés à 900 µl de H<sub>2</sub>O milli-Q pour avoir la dilution 0,1 mM.

**Réactifs à préparer le jour du test**

- **Solution C (tampon Tris-HCl 150 mM et ZnCl<sub>2</sub> 1125 mM)**

25 µl de ZnCl<sub>2</sub> (dilution 0,1 mM) sont mise dans une fiole jaugée et complété à 25 ml avec la solution A. Le mélange est bien agité et stocké à 4°C.

- **Solution D (0.45 mM) (substrat fluorescent)**

(o-aminobenzoylglycyl-p-nitro-L-phenylalanyl-Lproline Abz-Gly-p-Phe (NO<sub>2</sub>)-Pro-OH), (Bachem Feinchemikalien, Bubendorf, Switzerland). 0,0054 g du substrat fluorescent sont agitées avec 20 ml de la solution B dans un bécher à l'obscurité, le volume est par la suite complété à 25 ml avec la même solution. Le mélange est bien agité et stocké à l'abri de la lumière à 4°C.

- **Solution E (Enzyme, Solution de travail ACE)**

Les puits qui ont besoin de la solution E sont comptés (contrôle et échantillon : numéro de puits x 40 µl), 2 ou 3 puits en plus sont ajoutés dans les calcules pour assurer que le volume soit suffisant. **Par exemple**, si nous avons besoin de 60 puits avec la solution E: 60 x 40 = 2400 ml (volume total nécessaire). En réalité l'enzyme est de 1/25 de ce volume totale donc 2400/25 = 96 µl d'enzyme, la solution C est ajoutée, suivant l'exemple: 2400-96 = 2304 ml. Le mélange est agité légèrement à la main, puis conservé à 4 °C.



## 2. Activité antioxydante en mesurant ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

### Réactifs à préparer et à conserver

- **Préparation du tampon phosphate 0,075 M (pH = 7,4)**

Le tampon phosphate 0,075, pH=7,4 est préparé par mélange de 810 ml de la solution A (13,06 g de  $K_2HPO_4$  dissous dans un litre de  $H_2O$  milli-Q) avec 190 ml de la solution B (2,59 g de  $NaH_2PO_4$  dissous dans 250 ml de  $H_2O$  milli-Q). Le tampon est conservé à 4 ° C jusqu'à 1 mois.

- **Préparation de fluorescéine Disodique (1166,1  $\mu$ M): Solution mère**

0,01097 g de fluorescéine (FL) sont dissous dans 25 ml du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4), la solution est conservée à 4 ° C pendant 1 mois à l'abri de la lumière.

### Réactifs à préparer le jour du test

- **Préparation de la solution de travail FL fluorescéine 116,61 nM**

100  $\mu$ l de la solution mère sont dilués avec à 10 ml avec du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4). Cette solution peut être conservée au réfrigérateur à l'abri de la lumière. 250  $\mu$ l de la solution sont complétées à 25 ml avec du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4) (c'est la solution utilisée pour l'analyse immédiate).

- **Préparation de la solution TROLOX**

0,0125 g de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) sont dissous dans 1 ml de méthanol puis diluées à 50 ml avec du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4) (T0). Cette solution peut être conservée 24 heures au réfrigérateur à l'abri de la lumière pour être utilisée dans tous les tests qui seront effectués le même jour. A la fin de la journée elle doit être jetée. 1 ml de la solution ci-dessus est complété jusqu'à 10 ml avec du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4). Cette étape est effectuée juste avant l'utilisation, une fois les échantillons sont chargés sur la plaque.

### Préparation de diverses concentrations TROLOX:

**T8:** 800  $\mu$ l T0 + 200  $\mu$ l PBS

**T7 :** 700  $\mu$ l T0 + 300  $\mu$ l PBS

**T6 :** 600  $\mu$ l T0 + 400  $\mu$ l PBS

**T5 :** 500  $\mu$ l T0 + 500  $\mu$ l PBS

**T4:** 400  $\mu$ l T0 + 600  $\mu$ l PBS

**T3 :** 300  $\mu$ l T0 + 700  $\mu$ l PBS

**T2 :** 200  $\mu$ l T0 + 800  $\mu$ l PBS

**T1 :** 100  $\mu$ l T0 + 900  $\mu$ l PBS

- **Préparation AAPH 14 mM**

0,13018 g de AAPH ((2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)) sont dissous dans 10 ml du tampon phosphate (0.075 M ; pH 7.4). Cette étape est effectuée juste avant l'utilisation dans la période d'incubation de la plaque dans le fluorimètre.

### 3. Activité inhibitrice de l'enzyme DPP IV (dipeptidyl peptidase IV)

- **Préparation du tampon Tris- HCl 50 mM pH 7.5**

500 ml de tampon sont préparées et conservées au réfrigérateur jusqu'à un mois. Toutes les solutions et les dilutions des échantillons à étudier sont préparées avec ce tampon.

- **Sustrat H-Gly-Pro-*p*-Nitroaniline (H-Gly-Pro-pNA)**

Biomol (Enzo): BML-P188-0025. GP-pNA DPP SUBSTRATE. Flacon de 25 mg. 1 ml d'une solution mère (10 mM) est préparé dans du DMSO (Dimethyl sulfoxide) .

A partir de la solution mère, des dilutions 1/50 sont préparées, (5 µl de la solution mère sont ajoutées à 245 µl de tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5). Tous les aliquots d'enzyme et du substrat ont été gardé – 20°C.

- **Diprotine A (IPI)**

Sigma: 19759. DIPROTIN A (Ile-Pro-Ile). C'est un peptide qui a une activité inhibitrice élevée de l'enzyme DPP IV. Il est utilisé comme un contrôle positif d'inhibition.

## ***Production scientifique***

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

### **Publication :**

**Fatima Zohra Bounouala**, Salima Roudj, Nour-Eddine Karam, Isidra Recio, and Beatriz Miralles. Casein Hydrolysates by *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus lactis* Proteases: Peptide Profile Discriminates Strain-Dependent Enzyme Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2017**, **65**, 9324–9332.

### **Communications :**

1. **BOUNOUALA. F.Z**, ROUDJ. S, ZADI KARAM. H et KARAM. NE. Aptitude à la protéolyse des souches de bactéries lactiques d'origines laitière. Séminaire International sur les Sciences Alimentaires (SISA) 14, 15 et 16 octobre **2014**, Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires. Université de Constantine 1, Algérie.
2. **BOUNOUALA. F.Z**, ROUDJ. S, ZADI KARAM. H et KARAM. NE. Hydrolyse des caséines par des bactéries lactiques. 5<sup>ème</sup> journée des doctorants 11/03/**2014**. Université d'Oran. Algérie.
3. **BOUNOUALA. F.Z**, ROUDJ. S, ZADI KARAM. H et KARAM. NE. Activité antibactérienne des peptides issus de l'hydrolyse de la caséine de chamelle par *Lactobacillus plantarum*. Séminaire international des Biotechnologies (SIBC) 19, 20 et 21 Octobre **2015**. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie.

## Résumé

Nous avons mis en évidence le caractère protéolytique de deux lactobacilles *Lb. brevis* CHTD27, *Lb. plantarum* BH14 et d'un lactocoque *Lc. lactis* LCL. Les trois souches ont montré l'aptitude à produire des protéases dans le milieu de croissance lorsque celui-ci est additionné de lait. Les deux lactobacilles se sont révélés plus protéolytiques que le lactocoque. Les protéases extracellulaires ont été concentrées par précipitation au sulfate d'ammonium (80%), puis dialysées avant de les utiliser pour hydrolyser les caséines de différentes sources (lait de brebis, lait de chamelle et lait de vache), comparativement à l'enzyme digestive la trypsine. L'activité enzymatique des protéases bactériennes et de la trypsine a été évaluée par différentes méthodes biochimiques. Nous avons trouvé que l'hydrolyse des caséines dans les conditions réalisées est maximale après 24 heures de réaction, les protéases issues des lactobacilles CHTD27 et BH14 sont plus actives sur les caséines (quelle que soit leur source) comparativement aux protéases issues du lactocoque LCL. Le DH exprimé en pourcentage révèle que l'étendue de l'hydrolyse est plus importante avec la trypsine qu'avec les protéases bactériennes. L'analyse des hydrolysats par HPLC-MS/MS a permis de révéler et d'identifier de nombreux peptides qui correspondent à des fragments dans les caséines  $\beta$ ,  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$  et  $\kappa$ . Les profils peptidiques des hydrolysats diffèrent en fonction de la source de caséine et de l'enzyme protéolytique utilisée pour l'hydrolyse. Parmi les peptides identifiés dans ce travail, plusieurs sont apparentés à des séquences décrites potentiellement bioactives: antihypertensive, antidiabétique, antioxydante, antimicrobienne, immunomodulatrice et anticancéreuse. L'évaluation *in-vitro* des activités biologiques a démontré que les hydrolysats obtenus contiennent des peptides inhibiteurs des enzymes ECA et DPP-IV, des peptides antioxydants et des peptides antibactériens.

### Mots clés :

Caséines; bactéries lactiques; *Lactobacillus*; *Lactococcus*; Activité protéolytique; Protéases extracellulaires; Hydrolysats de caséines; Peptides bioactifs; RP-HPLC-MS/MS; Activités biologiques.