

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MOULOD MAMMARI DE TIZIOUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



# Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

## *Thème*

*Étude comparative de la sensibilité à l'hydrolyse des  
protéines du lactosérum camelin natif et désamidé*

Réalisé par :

M<sup>elle</sup> FETTANE Céline

M<sup>elle</sup> LARIBI Hanane

Devant le jury :

Présidente : M<sup>me</sup> SI AHMED-ZENNIA S.  
UMMTO

MCA

Promotrice : M<sup>me</sup> ALMI-SEBBANE D.  
UMMTO

MCB

Examinatrice : M<sup>me</sup> ISSELNANE S.  
UMMTO

MAA

Année universitaire : 2020 /2021

## **Remerciements**

Avant toute chose, nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu le tout puissant pour la santé, chance, volonté et courage qu'il nous a donné pour la réalisation de ce travail.

Nos remerciements vont puis à nos parents, pour leur amour inestimable, leur soutien et leurs sacrifices, que Dieu les protège et les bénisse.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice **M<sup>me</sup> ALMI-SEBBANE Dalila**, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé pour permettre la réalisation de ce travail.

Nos remerciements les plus sincères vont aussi pour les membres du jury :

- **M<sup>me</sup> SI AHMED ZENNIA .S.**, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury et d'évaluer notre travail ;
- **M<sup>me</sup> ISSELNANE .S.**, d'avoir accepté d'être parmi le jury de notre soutenance et d'examiner notre travail.

*Nous remercions aussi ceux qui ont pu participer de prêt ou de loin à ce modeste travail chacun son nom, veuillez croire nos chers amis en notre sincère considération.*

*A tous ceux qu'on n'a pas cité mais qui restent tout de même cher à nos yeux pour chaque sourire et chaque mot réconfortant mille fois merci.*

*Hanane/Céline*

***Dédicaces***

*C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et sympathie à :*

*Mes chers parents, pour leur amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragé à continuer mes études.*

*Que le bon dieu leur accord une longue vie.*

*A mon cher fiancé, **JUBA** pour avoir toujours été l'oreille écoutante, pour son aide*

*Précieuse, son amour et sa présence, sa patience tous le long de ce travail.*

*Mes sœurs mes frères et mes amis qui ont toujours su trouver les mots pour me réconforter.*

*Mes professeurs, pour leur savoir qu'ils m'ont transmis.*

*...Hanane*

## *Dédicaces*

*Avec l'expression de ma reconnaissance je dédie ce travail à*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, qu'elle reçoive à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat des longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mon frère et mes sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études supérieures.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible,*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

*...Céline*

## Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Mécanisme de la désamidation non-enzymatique à pH>5(PATEL et BORCHARDT, 1990).	12
02	Étapes de séparations des protéines sériques à partir du lait de chamelle	17
03	Courbe étalon du dosage des protéines lactosériques camelines par la méthode de <i>BIURET et al</i> 1949.	19
04	Processus de polymérisation du gel d'acrylamide en présence du persulfate d'ammonium.	20
05	structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS)	22
06	Étapes de la digestion gastro-intestinale simulée des protéines sériques camelines.	24
07	Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant (AH)	25
08	Profil électrophorétique en PAGE-native des protéines lactosériques camelines natives et désamidées après une désamidation non enzymatique à pH 8,4.	28
09	Electrophorégramme en PAGE native des protéines sériques camelines natives (A) et désamidées (B) après incubation avec un suc gastrique artificiel à différents pH.	30
10	Electrophorégramme en PAGE SDS des hydrolysats pepsiques (A) et pancréatiques (B) des protéines sériques camelines natives et désamidées.	31
11	Pourcentages d'inhibition de radical DPPH, par les protéines sériques camelines natives et désamidées après 6h d'incubation avec le suc gastriques artificiel	33
12	Pourcentages d'inhibition de radical DPPH, par les protéines sériques camelines et leurs hydrolysats natifs et désamidées.	34

## Liste des tableaux

<b>N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Caractéristiques physico chimiques du lait de chamelle en comparaison avec celle du lait de vache	04
<b>02</b>	La composition chimique du lait de chamelle (%) (AL HAJ et AL KANHAL, 2010).	06

## Résumé

La désamidation est une modification post-traductionnelle qui introduit une charge négative sur le squelette de la protéine par modification de l'asparagine (Asn) et/ou la glutamine (Gln). Les réactions de désamidation d'Asn, qui ce produit non enzymatiquement, ont été largement étudiées dans de nombreux domaines des sciences chimiques et pharmaceutiques. En effet, elles permettent d'améliorer les propriétés technologiques surtout pour les protéines alimentaires telles que la  $\alpha$ -zéine, le soja et même les protéines du lactosérum.

La désamidation des protéines du lactosérum du lait camelin collecté dans la région de Ouargla du sud algérien a été réalisée par incubation dans un tampon phosphate de sodium pH 8,4 pendant 72 heures. Le profil électrophorétique en PAGE native montre que l'intensité de la bande qui correspond à l' $\alpha$ -Lactalbumine native du lait camelin diminue et, en parallèle, nous observons l'apparition d'une autre bande qui migre plus loin que la  $\alpha$ -Lactalbumine.

L'effet d'un suc gastrique artificiel à différents pH sur les protéines sériques camelines natives et désamidées a été étudié et les résultats obtenus ont montré que ce suc n'a aucun effet sur les protéines sériques camelines natives et désamidées.

L'étude de la sensibilité des séroprotéines camelines natives et désamidées, vis-à-vis l'action de la pepsine et la pancréatine (simulation gastro-intestinale) a révélé la diminution de l'intensité des bandes pour les hydrolysats pepsiques et leur disparition après l'action de la pancréatine. Donc, la désamidation n'a pas protégé les sites d'action de ces deux enzymes.

Enfin, l'activité antiradicalaire par le test de DPPH a été évaluée. Les hydrolysats ont montré des activités importantes par rapport aux protéines natives et les hydrolysats des protéines désamidées ont donnés des pourcentages d'inhibition plus importants. La désamidation des protéines camelines améliore donc les propriétés antiradicalaires.

**Mots clés :** lait camelin ; Désamidation non enzymatique ; Électrophorèse ; suc gastrique ; hydrolyse enzymatique ; activité antioxydante.

## **Abstract**

Deamidation is a post-translational modification that introduces a negative charge on the protein backbone by modification of asparagine (Asn) and/or glutamine (Gln). Asndeamidation reactions, which occur non-enzymatically, have been widely studied in many areas of chemical and pharmaceutical sciences. Indeed, they allow the improvement of technological properties especially for food proteins such as  $\alpha$ -zein, soybean and even whey proteins.

Deamidation of camel milk whey collected in the Ouargla region of southern Algeria was performed by incubation in sodium phosphate buffer pH 8.4 for 72 hours. The native PAGE electrophoretic profile shows that the intensity of the band corresponding to the native  $\alpha$ -Lactalbumin of camel milk decreases and, in parallel, we observe the appearance of another band which migrates further than the  $\alpha$ -Lactalbumin.

The effect of an artificial gastric juice at different pH on native and deamidated Camel serum proteins was studied and the results obtained showed that this juice has no effect on native and deamidated Camel serum proteins.

The study of the sensitivity of native and deamidated Camel seroproteins to the action of pepsin and pancreatin (gastrointestinal simulation) revealed a decrease in the intensity of the bands for pepsin hydrolysates and their disappearance after the action of pancreatin. Thus, deamidation did not protect the action sites of these two enzymes.

Finally, the antiradical activity by the DPPH test was evaluated. The hydrolysates showed significant activities compared to the native proteins and the hydrolysates of the deamidated proteins gave higher percentages of inhibition. The deamidation of camel proteins therefore improves the antiradical properties.

**Keywords:** Camel milk; Non-enzymatic deamidation; Electrophoresis; Gastric juice; Enzymatic hydrolysis; Antioxidant activity.

# ***Table des matières***

<b>Liste des figures</b>	<b>Page</b>
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Introduction générale.....</b>	<b>01</b>
<b>I. Synthèse des données bibliographiques</b>	
<b>1.1. Aperçu général sur le lait camelin.....</b>	<b>03</b>
1.1.1. Caractéristiques du lait camelin.....	03
1.1.1.1. Caractéristiques organoleptiques .....	03
1.1.1.2. Caractéristiques physicochimiques.....	03
1.1.2. Composition chimique.....	04
1.1.3. Les protéines du lait camelin.....	07
1.1.3.1. Les caséines .....	07
1.1.3.1.1. Caséine $\alpha$ S1.....	07
1.1.3.1.2. Caséine $\alpha$ S2.....	08
1.1.3.1.3. Caséine $\beta$ .....	08
1.1.3.1.4. Caséine $\kappa$ .....	08
1.1.3.2. Les protéines sériques.....	08
1.1.3.2.1. L' $\alpha$ -lactalbumine.....	08
1.1.3.2.2. L'albumine sérique.....	09
1.1.3.2.3. La lactoferrine.....	09
1.1.3.2.4. La lactoperoxydase.....	09
1.1.3.2.5. Le lysozyme .....	10
1.1.3.2.6. Les immunoglobulines.....	10
1.1.4. Désamidation non enzymatique.....	10
1.1.4.1. Définition.....	10
1.1.4.2. Mécanisme de la désamidation .....	11
1.1.4.3. Influence de divers facteurs sur la cinétique de désamidation.....	12
1.1.4.3.1. Effet du pH.....	12
1.1.4.3.2. Effet de la température.....	13
1.1.4.3.3. Effet de la structure de la protéine.....	13
1.1.4.4. Impact de la désamidation non enzymatique sur les protéines alimentaires.	14
<b>II. Partie expérimentale</b>	
<b>2.1. Matériel.....</b>	<b>16</b>

2.1.1. Matériel biologique.....	16
2.1.2. Matière première .....	16
2.1.3. Produits chimiques .....	16
2.1.4. Appareillage.....	16
<b>2.2. Méthodes.....</b>	<b>17</b>
2.2.1. Isolement des protéines sériques du lait camelin.....	17
2.2.1.1. Écrémage .....	17
2.2.1.2. Précipitation acide.....	18
2.2.1.3. Dialyse.....	18
2.2.1.4. Congélation et lyophilisation.....	18
2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de Biuret.....	18
2.2.3. Désamidation non enzymatique.....	19
2.2.4. Méthodes électrophorétiques.....	19
2.2.4.1. Principe général .....	20
2.2.4.2. Conduite de l'électrophorèse.....	21
2.2.4.3. Électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)	21
2.2.4.4. Électrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes (PAGE-SDS) .....	22
2.2.5. Test de suc gastrique artificiel sur les protéines sériques camelines.....	23
2.2.6. Digestion gastro-intestinale simulée des protéines sériques camelines .....	23
2.2.7. Mesure de l'activité antioxydante par le test de DPPH.....	25
<b>III. Résultats et discussions</b>	
3.1. Teneur en protéines lactosériques.....	27
3.2. La sensibilité des protéines lactosériques camelines au phénomène de la désamidation non enzymatique.....	28
3.3. Effet du suc gastrique artificiel sur les protéines lactosériques camelines.....	29
3.4. Hydrolyse des protéines sériques camelines par la pepsine et la pancréatine.....	31
3.5. L'activité antioxydante des protéines sériques camelines et de leurs hydrolysats par le test DPPH.....	32
<b>Conclusion générale</b>	<b>36</b>

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

***Introduction***

***Générale***

### Introduction générale

Les chameaux sont un symbole d'importance culturelle et jouent un rôle clé dans la fourniture de lait de qualité nutritionnelle supérieure dans différentes parties du monde.

Le lait de chamelle constitue, depuis des temps très lointains, la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomades. Il est considéré comme l'aliment de base où sa richesse en vitamine C (dont la quantité se trouvant dans un litre de lait couvre 40% des besoins) constitue un apport nutritionnel important dans les régions arides où les fruits et les végétaux contenant cette vitamine sont rares (SIBOUKEUR, 2007). Il ressemble un peu au lait de vache et est plus proche de celui de la femme (LASNAMI, 1986) et il possède en son sein un puissant système protecteur (Lysozyme, Lactoperoxydase, Lactoferrine...etc) qui prolonge naturellement sa conservation de quelques jours sous des températures moyennes avoisinants les 30 °C.

Le lait de chamelle est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti-infectieuses, anticancéreuses, antidiabétiques et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents (KANASPAYEVA, 2007), pour cette raison ses protéines sont sujettes à diverses modifications soit après leur biosynthèse et là on parle des modifications post traductionnelles (glycosylation, oxydation, phosphorylation...etc.) ou au cours des procédés de transformation et de traitement.

Ces modifications chimiques des chaînes latérales des protéines peuvent être à l'origine du changement de la nature chimique des résidus d'acides aminés ainsi que le comportement et l'activité des protéines.

Parmi les modifications chimiques, il y'a la désamidation non enzymatique (DNE) du résidu asparaginyle (Asn) qui génère de nombreux effets indésirables par exemple une diminution de l'activité biologique, une réduction de la stabilité ou encore une augmentation de l'immunogénicité des protéines. Cette DNE peut aussi être à l'origine des maladies comme les protéinopathies dégénératives ; la cataracte, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la démence vasculaire et le vieillissement.

Cette modification n'induit pas que des effets néfastes. Elle peut générer également des effets favorables tels que l'amélioration des propriétés techno-fonctionnelles des protéines,

utilisées comme traitement dans certain domaine (en oncologie, en immunologie....) et elle est également pratiquée dans des études fondamentales pour mieux élucider la relation structure/fonction des protéines.

Dans cette étude nous nous sommes intéressées au phénomène de la désamidation non enzymatique sur les protéines du lait camelin. Ainsi, la présente étude s'articule autour de quatre volets d'investigations complémentaires :

1. Étude de la sensibilité des protéines lactosériques camelines au phénomène de la désamidation non enzymatique ;
2. Effet du suc gastrique artificiel sur les protéines lactosériques camelines ;
3. Hydrolyse des protéines sériques camelines par la pepsine et la pancréatine ;
4. Évaluer l'activité antioxydante des protéines sériques camelines et de leurs hydrolysats par le test de DPPH.

***I. Synthèse***

***Bibliographique***

## 1.1. Aperçu général sur le lait camelin

### 1.1.1. Caractéristiques du lait camelin

#### 1.1.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche, en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en  $\beta$ -carotène (SAWAYA *et al*, 1984). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (ABDEL-RAHIM, 1987) et/ou amère (RAMET, 2003). Cette variabilité dans le goût est liée au type de fourrage ingéré ainsi qu'à la disponibilité en eau (YAGIL et ETZION, 1980 ; WANGOH *et al*, 1998 b).

#### 1.1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le pH du lait camelin varie de 6,5 à 6,7 (MEHAIA *et al*, 1995 ; KHASKHELI *et al*, 2005), il est légèrement inférieur à celui du lait de vache (6,8). Sa densité moyenne est de 1,029 g/cm<sup>3</sup> (FARAH, 1996) identique à celle du lait bovin (1,030 g/cm<sup>3</sup>). Il est moins visqueux que le lait de vache, sa viscosité à 20°C est de 1,72 mPa.s et elle est toutefois inférieure à celle du lait de vache dans les mêmes conditions et qui est 2,04 mPa.s. (KHEROUATOU *et al*, 2003). Il présente une acidité titrable de l'ordre de 18°D  $\pm$  0,79 (CHETHOUNA, 2011).

La variation des données sur le pH, l'acidité, la densité et la viscosité peut être en relation directe avec les conditions de la traite et la charge microbienne des échantillons collectés (MEHAIA *et al*, 1995). Le lait de chamelle reste stable pendant quelques jours à température ambiante (25 à 30°C) comparativement au lait d'autres espèces. Le pH de coagulation est atteint après 8h à 30°C alors que le lait bovin commence à coaguler après 3h dans les mêmes conditions. Ceci est dû à la présence en son sein d'un système antimicrobien puissant (lysosyme, lactoferrine, lactoperoxydase, immunoglobulines, protéoses peptones...) dont les concentrations sont plus élevées dans ce lait que dans celui des autres espèces laitières (KAPPLER *et al*, 1999 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2007).

**Tableau 01 : Caractéristiques physico-chimiques du lait de chamelle en comparaison avec celles du lait de vache**

<b>Espèce</b> <b>Propriétés</b>	<b>Lait de chamelle</b>	<b>Lait de vache</b>	<b>Références</b>
<b>Densité</b>	1,029 g/cm <sup>3</sup>	1,030 g/cm <sup>3</sup>	FARAH, 1996
<b>Viscosité (Cp)</b>	1,72 mPa.s	2,04 mPa.s	KHEROUATOU <i>et al</i> , 2003.
<b>Acidité (°D)</b>	18°D ±0,79	15–18°D	CHETHOUNA, 2011.
<b>pH</b>	6,5 - 6,7	6,8	MEHAIA <i>et al</i> , 1995; KHASKHELI <i>et al</i> , 2005

### 1.1.2. Composition chimique

La composition chimique du lait de chamelle a été largement étudiée (ELAMIN et WILCOX, 1992 ; KHAN et IQBAL, 2001 ; KHASKHELI *et al*, 2005 ; HADDADIN *et al*, 2007). Des variations dans les proportions des différents composants ont été rapportées (tableau 02). Ces variations sont la conséquence de plusieurs facteurs tels que la saison (HADDADIN *et al*, 2007), la race (FAYE *et al*, 2008) ainsi que le stade de lactation (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2009).

L'eau est l'élément le plus important qui affecte cette composition. La chamelle produit un lait plus dilué en période de sécheresse, la teneur en eau en été est de 89,8 % alors qu'elle est de 86,1% en hiver (AL HAJ et AL KANHAL, 2010). La dilution du lait est un mécanisme d'adaptation naturelle des chameaux pour procurer de l'eau aux chamelons pendant les périodes de sécheresse.

La teneur en protéines dans le lait camelin est de 3,2%, elle est comparable à celle du lait bovin (2,59 %) (EL-HATMI *et al*, 2015). Les protéines camelines sont représentées par deux fractions principales, les caséines et les séroprotéines.

La matière grasse du lait camelin représente environ 1,2 à 6,4% (KONUSPAYEVA *et al*, 2009). Par comparaison avec le lait bovin, la matière grasse cameline est pauvre en acides gras à courte chaîne (ABU-LEHIA, 1989) et en  $\beta$ -carotène (STAHL *et al*, 2006). Cependant, il a été noté que la matière grasse cameline est riche en acides gras à longue chaîne (KONUSPAYEVA *et al*, 2008) particulièrement les acides gras essentiels (HADDADIN *et al*, 2007).

Le taux en lactose varie de 2,4 à 5,8 % (KONUSPAYEVA *et al*, 2009). Les variations enregistrées dans les teneurs en lactose semblent dépendre non seulement de la race mais aussi du stade de lactation et l'état d'hydratation. Une diminution de la teneur initiale a été constatée en cas de déshydratation des chamelles (SIBOUKEUR, 2007).

Le lait de dromadaire constitue une très bonne source de minéraux. Il est riche en minéraux majeurs : Calcium, Magnésium, Sodium, Potassium et particulièrement en manganèse et en fer (AL-AWADI et STRIKUMAR, 2001). Les minéraux du lait de chamelle, notamment le Sélénium et le Fer sont associés à des fractions protéiques de faible poids moléculaire, ce qui augmente leur capacité digestive et leur biodisponibilité (ALAWADI et STRIKUMAR, 2001 ; SAITMIRATOVA *et al*, 2001).

Concernant les vitamines, le lait de chamelle contient moins de vitamines A, E, B1, B2, B5 et B9 comparativement au lait de vache (SAWAYA *et al*, 1984 ; FARAH *et al*, 1992 ; MEHAIA, 1994). Cependant, il se distingue par sa richesse en vitamine C qui est présente à une teneur moyenne de 34 ,16 mg/l. Elle est 3 à 5 fois plus élevée que celle présente dans le lait bovin (SAWAYA *et al*, 1984 ; FARAH *et al*, 1992 ; HADADDIN *et al*, 2008).

**Tableau 02 : La composition chimique du lait de chamelle (%) (AL HAJ et ALKANHAL, 2010).**

<b>Composant</b>	<b>Teneur en %</b>	<b>Références</b>
<b>Eau</b>	86,3-88,5	KHAN et IQBAL(2001)
<b>Protéines totales</b>	3,11	FARAH et RUEGG (1989)
	2,69	HADDADIN <i>et al</i> (2008)
<b>Protéines sériques</b>	0,63-0.80	FARAG ET KABARY(1992) ; MEHAIA <i>et al</i> (1995) ; KHASKHELI <i>et al</i> (2005)
<b>Caséines</b>	1,63-2,76	FARAG ET KABARY(1992) ; MEHAIA <i>et al</i> (1995) ; KHASKHELI <i>et al</i> (2005)
<b>Matière grasse</b>	3,95	EL-AGAMY <i>et al</i> (1998)
	1,2	ATTIA <i>et al</i> (2001)
	4,47	INDRA (2003)
<b>Lactose</b>	5,4	ATTIA <i>et al</i> (2001)
	3,92	HADDADIN <i>et al</i> (2008)
	2,9	SHUIEP <i>et al</i> (2008)
<b>Fraction minérale</b>	0,6-0,90	KONUSPAYEVA <i>et al</i> (2009)
<b>Vitamine C</b>	34,6 mg /l	SAWAYA <i>et al</i> (1984) FARAH <i>et al</i> (1992) HADDADIN <i>et al</i> (2007)

### 1.1.3. Les protéines du lait camelin

De part leur apport nutritionnel (source d'acides aminés essentiels) et leurs propriétés techno-fonctionnelles particulières, les protéines du lait revêtent une importance considérable au double plan quantitatif et qualitatif.

Selon leur solubilité en milieu acide, ces protéines se répartissent comme pour les laits d'autres espèces, en deux fractions : les caséines et les protéines du lactosérum (albumines et globulines). Les premières précipitent à leur pH isoélectrique se situant à 4,3 (WANGOH *et al*, 1998) alors que les autres restent solubles dans cette zone de pH considérée.

#### 1.1.3.1. Les caséines

Les caséines sont les principales protéines dans le lait de chamelle. Il contient à peu près 1,63 à 2,76 % qui représentent environ 52 à 87 % des protéines totales contre 83% dans le lait bovin (MEHAIA *et al*, 1995 ; KHASKHELI *et al*, 2005).

Les caséines du lait camelin sont des phosphoprotéines élaborées dans les cellules lactogènes mammaires et sont constituées de quatre protéines différentes ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$  et  $\kappa$ ). Ces protéines sont codées par des gènes différents portés sur le même chromosome (RIBADEAU-DUMAS et BRIGNON, 1993). Les caséines ont tendance à s'associer en particules sphériques ou micelles, de taille variable et fortement hydratées et minéralisées. L'assemblage et la cohésion de cette structure micellaire sont assurés par des liens phosphocalciques (HAMBRAEUS, 1982).

A la différence des protéines solubles qui ont une structure globulaire compacte et résistante à l'attaque protéolytique, les caséines présentent une structure lâche et peu ordonnée qui les rend accessibles aux enzymes protéolytiques (SCHMIDT, 1982).

##### 1.1.3.1.1. Caséine $\alpha$ S1

Dans le lait de chamelle, elle représente 22 % des caséines totales et contient 215 acides aminés pour une masse moléculaire de 25,773 kDa et un point isoélectrique de 4,4 (KAPPELER *et al*, 1998).

### 1.1.3.1.2. Caséine $\alpha$ S2

Cette fraction est présente dans le lait de chamelle à une moyenne de 2,6 g/l (AL-LAWI *et al*, 2011). Sa structure primaire contient 178 résidus d'aa dont 11 résidus de sérine phosphorylés. Son poids moléculaire est d'environ 21,266 kDa, alors que son pH isoélectrique est 4,58 (KAPPELER *et al*, 1998).

### 1.1.3.1.3. Caséine $\beta$

La  $\beta$ -caséine est constituée de 217 acides aminés avec un poids moléculaire de 28,6 kDa (MOHAMED, 1993 cité par AL HAJ *et al*, 2010), son point isoélectrique est à pH 4,76. Elle est dépourvue de résidus glucidiques et de cystéine. Comme dans le lait bovin c'est la protéine la plus hydrophobe des caséines (LARSSONRAZNIKIEWIC et MOHAMED, 1986).

### 1.1.3.1.4. Caséine $\kappa$

C'est la caséine la plus étudiée en raison de son rôle dans la coagulation du lait par la présure (CAYOT *et* LORIENT, 1998 ; FILION, 2006 cité par MEDIOUR, 2014). La  $\kappa$ -CN n'occupe que 3,5% des caséines totales (EL-AGAMY, 2006). Sa structure primaire compte 162 acides aminés, son point isoélectrique se situe à pH 4,11 et sa masse moléculaire est de 22,9kDa (KAPPELER, 1998 ; EL-AGAMY *et al*, 2009).

### 1.1.3.2. Les protéines sériques

Les protéines sériques constituent la fraction soluble des protéines du lait. Elles représentent 20 à 28 % des protéines totales dans le lait de chamelle (MEHAIA *et al*, 1995).

Par comparaison à l'espèce bovine, le lactosérum camelin est plus riche en facteurs antimicrobiens tels que le lysozyme, la lactoferrine, les immunoglobulines (EL-AGAMY *et al*, 1992). Il contient également des protéines spécifiques acides (BEG *et al*, 1996) et basiques (OCHIRKHUYAG *et al*, 1998). Par contre, il est à noter l'absence de la  $\beta$ -Lactoglobuline, la protéine majeure du sérum du lait de plusieurs espèces animales.

#### 1.1.3.2.1. L' $\alpha$ -Lactalbumine

L' $\alpha$ -Lactalbumine (L' $\alpha$ -Lac) du lait de chamelle est constituée de 123 résidus d'aa avec une masse moléculaire de 14,6 kDa (BEG *et al*, 1985). Elle est généralement très riche en aa essentiels et particulièrement en : Tryptophane, Cystéine et Lysine où elle contient

21,6% de ces trois aminoacides alors que son homologue bovin n'en contient que 19,6%.

### **1.1.3.2.2. L'albumine sérique**

L'albumine sérique est une protéine d'origine sanguine, synthétisée dans le foie. Elle passe du plasma vers la glande mammaire pendant la production du lait. Son rôle principal est le transport des acides gras dans le plasma (CURRY *et al*, 1999).

L'albumine sérique est responsable à 80% du maintien de la pression osmotique dans le corps (QUINLAN *et al*, 2005). Sa concentration dans le lait camelin est estimée à 9,2g/l (EL-HATMI *et al*, 2007). Sa séquence primaire est constituée de 583 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire de 66339Da.

### **1.1.3.2.3. La lactoferrine**

La lactoferrine du lait provenant de sources différentes est connue par sa rétention du fer à pH inférieur à 3-4 (MAZURIER et SPIK, 1980 cité par AL HAJ et AL KANHAL, 2010), en revanche, la lactoferrine dans le lait de chamelle semble perdre du fer de son extrémité N terminale à pH 3-4 et de son extrémité C terminale à pH 6-7 (KHAN et IQBAL, 2001). La lactoferrine cameline est constituée d'une chaîne comprenant 689 résidus aminoacides. Son poids moléculaire est de 75,250 kDa et sa concentration est 220mg/l (KAPPELER *et al*, 1999).

### **1.1.3.2.4. La lactoperoxydase**

C'est une enzyme d'oxydoréduction à activités bactériostatique et bactéricide principalement sur les bactéries GRAM négatif (TAYEFI-NASRABADI *et al*, 2011b cité par MEDJOUR, 2014). Son activité enzymatique dans le lait de chamelle est de 869-1172 U/l et son poids moléculaire est 78 kDa alors que celui du bovin est de 72,5 kDa (EL-AGAMY *et al*, 1996).

### 1.1.3.2.5. Le lysozyme

Le lysozyme du lait de chamelle a un poids moléculaire de 14,4 kDa. Il possède une activité de lyse supérieure à celle du lysozyme bovin, mais inférieure à celle du lysozyme du blanc d'œuf (EL-AGAMY *et al*, 1996). Le lait de chamelle contient une concentration plus élevée de lysozyme (15 µg/100ml) contre (7 µg /100ml) pour le lait de vache (EL-AGAMY *et al*, 1996).

### 1.1.3.2.6. Les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Igs) représentent environ 10% des protéines totales du lactosérum. La concentration en IgG dans le lait camelin est de 1,64 mg/ml. Cette concentration est de 0,70 ; 0,67 ; 0,55 ; 0,63 et 0,86 mg/ml dans les laits caprin, bovin, ovin, bufflonne et humain respectivement (EL-AGAMY *et al*, 2009).

Les Igs présentent la même structure de base : deux chaînes légères identiques de 23 kDa et deux chaînes lourdes de 53 kDa chacune. Ces quatre chaînes sont liées par des ponts disulfures et la molécule complète d'Ig présente une masse moléculaire d'environ 180 kDa (KORHONEN *et al*, 2000). Par contre le lait de chamelle contient des immunoglobulines qui ont une structure unique, elles sont dépourvues de chaînes légères (SHABO et YAGIL, 2005).

## 1.1.4. Désamidation non enzymatique

### 1.1.4.1. Définition

Les modifications post traductionnelle des protéines sont des éléments essentiels à prendre en considération pour l'étude des protéines ; en effet elles subissent un ensemble de modification après leur synthèse ou bien durant le cours de leur vie. Ceci a pour but d'acquérir des fonctions particulières de modifier la fonction de la protéine ou bien encore permettre l'interaction avec d'autres éléments. Les principales modifications existantes sont : la désamidation, la phosphorylation la glycosylation et la méthylation (AKELE *et al*, 2012)

Les réactions de désamidation des chaînes latérales de l'asparagine et de la glutamine sont parmi les modifications covalentes non-enzymatiques les plus étudiées pour les protéines et les peptides. Des efforts considérables de recherche ont été étendus pour élucider les détails de la réaction de désamidation dans les systèmes *in vitro* et *in vivo* (MCNALLY et HASTEDT, 2007).

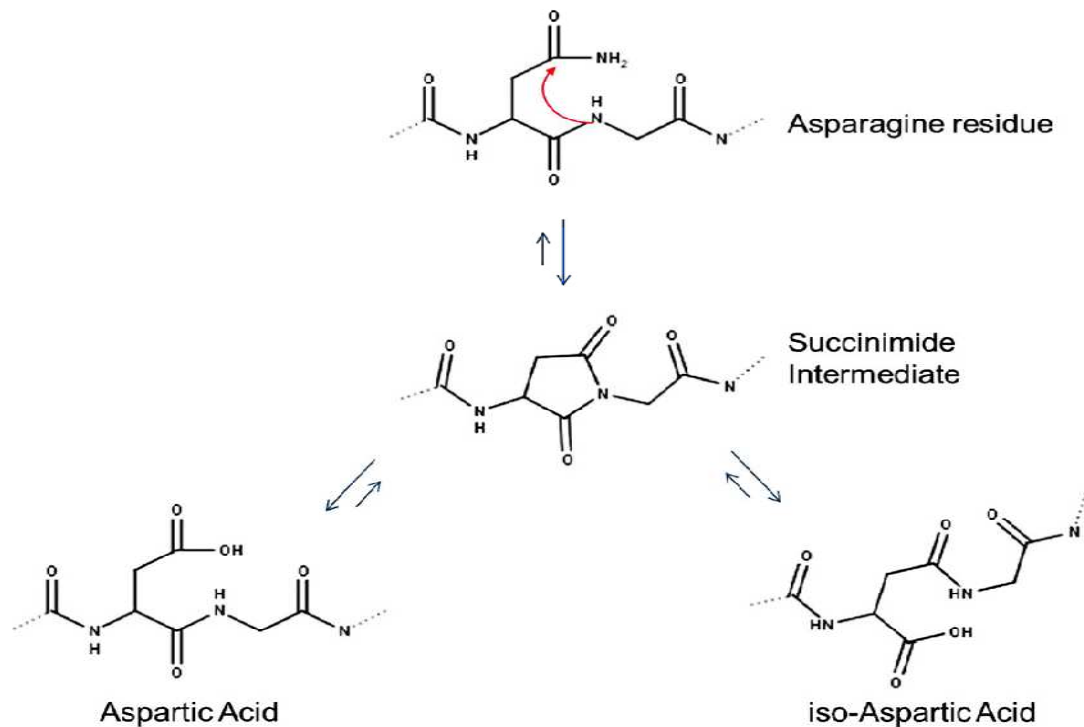
La désamidation des protéines est décrite comme la perte de la fonction amide d'un résidu Gln ou Asn accompagné d'une libération d'ammoniac et la transformation de ces deux acides aminés en acides glutamique et aspartique (SHLOMO, 1996).

Les résidus asparaginylyle et glutaminyle, dans les peptides et les protéines sont intrinsèquement instables dans des conditions physiologiques, avec des demi-vies allant de quelques heures à plus de 100 ans. Ils se désamident non enzymatiquement en résidus L et D aspartyle et glutamyle ou en L et D iso-Asp et iso-Glu. L'Asn réagit généralement beaucoup plus rapidement que Gln, bien que les mécanismes de désamidation sont essentiellement les mêmes (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

### 1.1.4.2. Mécanisme de la désamidation

Le mécanisme de la désamidation non enzymatique consiste en la formation d'un cycle imide (L-succinimide), qui résulte de l'attaque nucléophile du doublet électronique d'un atome d'azote de la chaîne carbonée principale sur l'atome de carbone du groupement amide de la chaîne latérale du résidu Asn. La formation du succinimide, molécule intermédiaire cyclique à cinq atomes, implique la chaîne latérale et le groupement carboxyle du résidu Asp ou Asn et l'azote du groupement amide du résidu suivant (GEIGER et CLARKE, 1987 ; STEPHENSON et CLARKE, 1989). Le succinimide, ainsi formé, est un intermédiaire stable qui peut être observé dans une zone du pH variant de 4,0 à 4,5, mais qui se décompose aussi vite qu'il s'est formé pour des valeurs de pH plus élevés.

Ensuite le cycle imide formé est soumis à une hydrolyse, ce qui génère au sein de la chaîne peptidique la formation d'un résidu L-iso-Asp ou L-Asp (XIE et SCHOWEN, 1999). L'apparition d'un résidu iso-Asp introduit une liaison  $\beta$ -amide attaché sur le groupement  $\beta$ -carboxylique du résidu iso-Asp. Ce qui provoque un changement dans la structure des peptides et des protéines qui subissent une désamidation (Figure 01). L'isoaspartate est un résidu d'acide aminé apparaissant dans certaines protéines suite à une réaction intramoléculaire entre un résidu Asn ou Asp et le résidu d'acide aminé suivant dans la séquence protéique (GEIGER et CLARKE, 1987).



**Figure 01. Mécanisme de la désamidation non-enzymatique à pH>5 (PATEL et BORCHARDT, 1990).**

### 1.1.4.3. Influence de divers facteurs sur la cinétique de désamidation

L'événement de la désamidation est très fréquent et survient spontanément. Toutefois, des facteurs comme la température, le pH environnant, la structure et le temps de demi-vie de la protéine peuvent influencer ce processus (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004).

#### 1.1.4.3.1. Effet du pH

Les résultats obtenus par l'étude du pH sur la dégradation des résidus Asn et Asp dans un intervalle du pH variant de 1 à 12, montrent que la désamidation spontanée dépend des valeurs du pH allant de 5 à 8. Au-delà de cet intervalle, la protéine est totalement dénaturée et ne peut résister à des valeurs de pH extrêmes. La désamidation des protéines et des peptides se produit à pH neutre ou proche de la neutralité mais elle est plus rapide à pH basique (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

En particulier, le pH semble exercer un contrôle majeur sur la désamidation non enzymatique des résidus asparaginyle dans les polypeptides. À pH alcalin et neutre, il est signalé que la désamidation des résidus d'asparagine implique la formation d'un cycle imide intramoléculaire intermédiaire. Dans des conditions acides, on a signalé que la réaction se faisait par hydrolyse directe des résidus d'Asn dans des résidus Asp sans formation d'intermédiaire cyclique imide (SHLOMO, 1996). A pH physiologique, la désamidation entraîne l'introduction d'une charge négative au résidu désamidant et une certaine isomérisation (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

### **1.1.4.3.2. Effet de la température**

Le taux de désamidation des protéines montre également la dépendance à la température sous un pH neutre; la désamidation peut se produire par catalyse des chaînes latérales amenées au voisinage du site de désamidation. La disponibilité de l'eau semble être un élément important des effets associés à la température (MCNALLY et HASTEDT, 2007).

Les travaux de Hamada (1992) ont montré que la réaction de désamidation est accélérée en chauffant brièvement des protéines alimentaires. La pénétration d'eau et la solubilisation des protéines semblent être des facteurs-clés dans le processus de désamidation et tous les deux sont améliorés par la chaleur.

La température est un facteur qui peut aussi modifier indirectement d'autres paramètres tel que le pH de l'environnement. De ce fait, la température de stockage de certaines formules protéiques affecte la vitesse de désamidation d'une protéine en présence de certains tampons car la température a un effet indirecte sur la constante de dissociation d'eau : la concentration d'ions hydroxyles peut varier en fonction de la température et peut ainsi affecter la vitesse de désamidation (ARAKI *et al*, 1989).

### **1.1.4.3.3. Effet de la structure de la protéine**

Les taux de désamidation dépendent de la séquence primaire et de la conformation des Protéines. Il a été démontré que la séquence d'acides aminés primaire, ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine, peuvent affecter le taux de désamidation. Cette modification introduit une charge négative dans la protéine qui peut changer la structure et la fonction de la protéine.

Des études antérieures ont également montré que la structure des acides aminés qui a un effet significatif sur le taux de désamidation. Un résidu Asn suivi d'un résidu Glycine (Gly) dans les protéines est particulièrement sensible à la désamidation, même si d'autres séquences telles que Asn-Ser, Asn-Asn et Asn-Ala ont été observées pour subir une désamidation dans les protéines (NARKHYUN, 2013).

Dans les études utilisant des modèles peptidiques, le résidu d'acide aminé sur le groupe carboxyle de l'Asn a montré une grande influence sur la vitesse de réaction, en particulier lorsque le résidu carboxyle adjacent de Asn est Gly (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004).

#### **1.1.4.4. Impact de la désamidation non enzymatique sur les protéines alimentaires**

L'utilisation efficace des protéines dans les systèmes alimentaires dépend des caractéristiques fonctionnelles de la protéine pour répondre aux complexes besoins des produits alimentaires manufacturés.

De nombreuses protéines alimentaires, en particulier celles provenant de sources végétales, nécessitent une modification pour améliorer les propriétés fonctionnelles telles que la solubilité, l'aptitude au fouettage et l'activité d'émulsification.

Les traitements chimiques utilisés pour la modification peuvent être classés en deux principaux groupes : méthodes enzymatiques et non enzymatiques. La désamidation concerne les méthodes chimiques qui modifient les protéines alimentaires de manière non enzymatique.

En raison de leur approche simple, disponibilité immédiate et de leur grande efficacité, les méthodes non enzymatiques sont toujours souhaitables et souvent irremplaçables.

Les propriétés fonctionnelles de la protéine sont étroitement liées à sa taille, à sa conformation structurelle et à la distribution des charges ioniques.

Les traitements chimiques qui pourraient entraîner une altération de ces propriétés comprennent des réactions qui introduisent un nouveau groupe fonctionnel dans la protéine ou éliminent un composant de la protéine. Par conséquent, les réactions telles que succinylation, acétylation, phosphorylation, hydrolyse limitée et l'hydrolyse des liaisons amides spécifiques (désamidation) ont été utilisées pour conférer à la protéine des propriétés fonctionnelles améliorées (FREDERICK ,1992).

## ***II. Partie***

# ***Expérimentale***

## 2. Matériel et Méthodes

Le présent travail a été réalisé au niveau de laboratoire de Biochimie, département de Biochimie-Microbiologie. Université MOULOUD MAMMARI de TIZI-OUZOU.

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matériel biologique

Deux enzymes protéolytiques ont été utilisées qui sont la pancréatine et la pepsine (EC 3.4.23.2)

#### 2.1.2. Matière première

Le lait de chamelle provient de troupeau de chameaux saines (*camelus dromedarius*) de la population *Sahraoui* vivant en élevage extensif dans des parcours naturels de la région d'Ouargla du sud algérien. Il est recueilli proprement dans des bouteilles de 1 l et est immédiatement additionné d'un antibactérien (l'azoture de sodium à 0,05%), puis acheminé au laboratoire dans une glacière.

#### 2.1.3. Produits chimiques

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, DPPH, NaN<sub>3</sub>, NaOH, éthanol (70 %), ferricyanure de potassium, acide trichloroacétique (TCA), chlorure de sodium, dodecyl sulfate de sodium (SDS), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Glycérol, tris (hydroxyméthyl) aminométhane, 2-mercaptoéthanol, acrylamide, Bis-acrylamide, bleu de bromophénol, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED), bleu de Coomassie, glycine, persulfate d'ammonium, Tartrate de sodium et de potassium, HCl, Carbonate de sodium (NaCO<sub>3</sub>), Eau distillée, Albumine de sérum bovin (BSA), Réactif de Gornall, acide acétique, chlorure de potassium (KCl), NaHPO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> et MgCl<sub>2</sub>...etc.

#### 2.1.4. Appareillage

-Unité d'électrophorèse : plaques en verre et en silice, cuve d'électrophorèse,

Générateur de courant ;

-Spectrophotomètre UV-Visible (SHINADZU) ;

- Centrifugeuse (SIGMA), max 15000 g ;
- Bain-marie (MEMMERT Allemagne) ;
- PH mètre (Hanna 808351) ;
- Balance de précision (OHAUS, USA) (0.001 g) ;
- Balance analytique (0.01 g) ;
- Agitateurs (magnétique, vortex, basculant) ;
- Lyophilisateur (TelstarIyoQuest);

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Isolement des protéines lactosériques totales

C'est une opération à plusieurs étapes, qui a pour objectif de séparer les protéines sériques des caséines du lait camelin, ces étapes sont illustrées dans la figure 02.

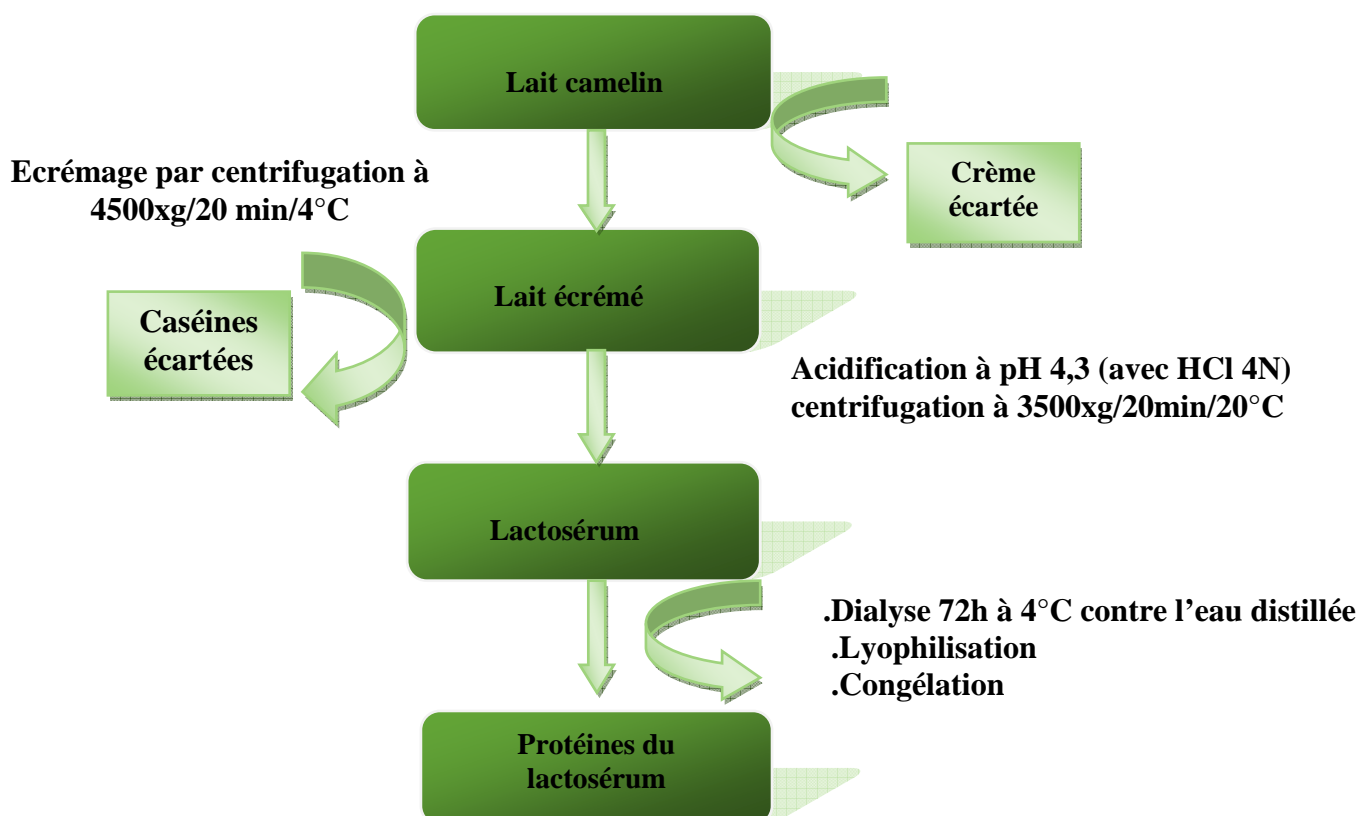


Figure 02 : Étapes de séparation des protéines sériques à partir du lait de chamelle.

### 2.2.1.1. Écrémage

L'écrémage du lait entier est réalisé par centrifugation à 4500xg pendant 30 min à 4°C.

La crème qui apparaît en surface est écartée, alors que le lait écrémé est filtré afin d'éliminer totalement la matière grasse.

### 2.2.1.2. Précipitation acide

La précipitation est réalisée par l'ajout d'une solution d'HCl 4N, ainsi le pH est amené progressivement à 4,3. C'est le pH isoélectrique des caséines camelines qui permet leur précipitation. Le lait acidifié est ensuite centrifugé à 3500xg pendant 20 min à 20°C.

Le culot constitue la fraction caséinique et le surnagent représente les protéines sériques totales. Ce dernier est neutralisé à pH 7,00 par NaOH 1N pour une meilleure solubilisation des protéines.

### 2.2.1.3. Dialyse

La fraction des protéines sériques est dialysée contre l'eau distillée pendant 72h à 4°C sous agitation douce, en utilisant des membranes de dialyse.

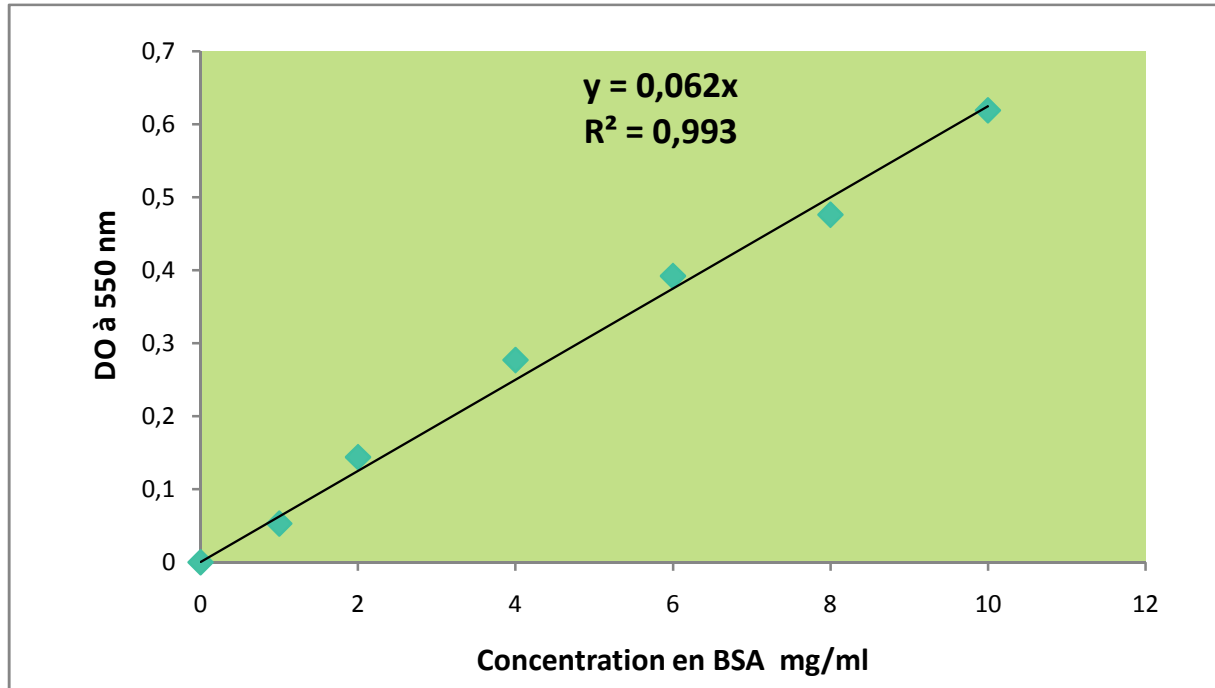
### 2.2.1.4. Congélation et lyophilisation

Après dialyse, la solution des protéines sériques est congelée puis lyophilisée. Les protéines sont ainsi récupérées sous une forme de poudre et conservées dans un dessiccateur.

## 2.2.2. Dosage des protéines par la méthode de biuret

La méthode utilisée est celle de BIURET. La réaction du biuret est une ; méthode colorimétrique décrite par *GORNALL et al, 1949*, une réaction mettant en évidence les liaisons peptidiques. Les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec  $\text{Cu}^{2+}$  en solution alcaline pour former un complexe coloré dont l'absorbance, proportionnelle à la concentration en protéines, est mesurée à 550 nm. Le réactif Biuret contient du sodium potassium tartrate qui complexe les ions cuivriques et maintient leur solubilité en solution alcaline.

La teneur en protéines est déterminée grâce à une courbe étalon :  $\text{DO} = f(c)$  (figure 3), en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine de référence.



**Figure 03 : Courbe étalon du dosage des protéines lactosériques camelines par la méthode de *BIURET et al 1949*.**

### **2.2.3. La désamidation des protéines lactosériques camelines :**

Un volume de 10 ml de sérum du lait camelin ont été mélangées avec un volume de 10 ml de tampon phosphate de sodium, pH 8,4, contenant 0,02% (m/v) d'azide de sodium. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 72h.

### **2.2.4. Méthodes électrophorétiques**

Les protéines qui sont des macromolécules amphotères, peuvent se déplacer dans un champ électrique en fonction de leur charge nette, de leur poids moléculaire et des conditions du milieu. Ce déplacement différentiel est mis à profit en électrophorèse pour pouvoir les séparer et les identifier, car les niveaux de migration atteints constituent une caractéristique intrinsèque de chaque entité protéique.

### 2.2.4.1. Principe général

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

Les gels de polyacrylamide sont constitués d'acrylamide (unité de base) ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CONH}_2$ ) et de bisacrylamide (agent pontant) (N, N méthylène-bis acrylamide), qui en présence de TEMED et du persulfate d'ammonium se polymérise (figure 04). Les caractéristiques du gel sont en fonction de la concentration, du degré de réticulation et du pontage de ses constituants. Ils sont déterminés par les indices T et C ; La porosité des gels est ajustée en faisant varier les concentrations relatives de a et b, la taille effective des pores d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée.

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

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

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

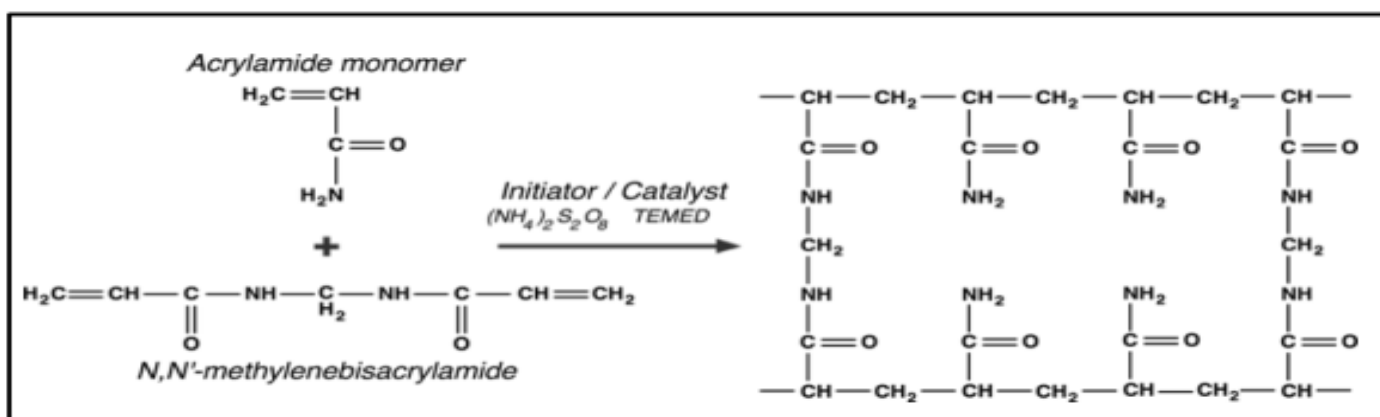


Figure 04 : Processus de polymérisation du gel

d'acrylamide en présence du persulfate d'ammonium

#### 2.2.4.2. Conduite de l'électrophorèse

Le gel de polyacrylamide, est coulé entre une plaque en verre et une plaque en alumine.

Les puits sont obtenus suite à l'introduction d'un peigne entre les deux plaques avant la polymérisation du gel. Après polymérisation, le peigne est retiré puis les échantillons sont déposés dans les puits, ils sont préalablement dissous dans de bleu de bromophénol indicateur de la progression de la migration électrophorétique. Celle-ci a lieu sous un voltage et un ampérage constants (250v ; 20mA).

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

**-La fixation :** La fixation est réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (P/V) pendant 45 minutes.

**-La coloration :** Le gel est immergé 2 à 4 heures dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie 0,55% (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1V), méthanol (1V) et TCA 4% (P/V).

**-La décoloration :** elle est réalisée par immersion du gel dans une solution composée du mélange (eau/éthanol/acide acétique).

#### 2.2.4.3. Électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dénaturantes et non dissociantes (PAGE-native) permet de garder les protéines à l'état natif, la migration des molécules se fait en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge (WITTIG *et al.* 2007). La PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques. Le protocole utilisé est celui de HILLIER (1976), modifié et adapté au système de minicuves. La porosité du gel est de T = 12% et C = 2,7%. Le tampon du gel est composé du Tris 0,75 M ; pH 8,9. Le tampon d'électrode est constitué du Tris 5 mM, glycine 77 mM ; pH 8,3. Les échantillons (1-2 mg/ml) dissous dans une solution contenant le tampon du gel, de l'eau distillée et du glycérol 50% et le bleu de bromophénol.

#### 2.2.4.4. Électrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes (PAGE-SDS)

Un échantillon protéique (1-2 mg/ml) est chauffé à 100°C pendant 5 minutes, en présence d'un détergent anionique le SDS (10%) et d'un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfures, le 2-βME (4%). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

La longue queue hydrophobe du dodécylsulfate (SDS) (figure 05) interagit très fortement avec les chaînes polypeptidiques et leur procure une charge négative. Le nombre des molécules de SDS liées à un polypeptide est proportionnel à la longueur de la chaîne (au nombre des résidus). Le SDS est aussi un détergent qui rompt toutes les interactions et détruit les structures tertiaires et quaternaires des protéines. Les ponts disulfures sont clivés en utilisant le β-mercaptoéthanol.

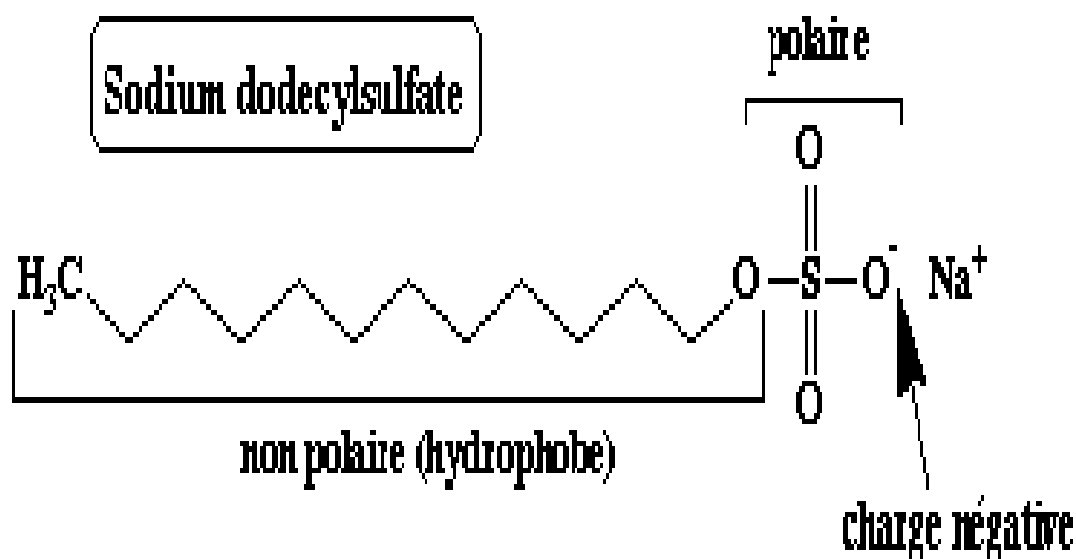


Figure 05 : Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS)

### 2.2.5. Test de suc gastrique sur les protéines sériques camelines

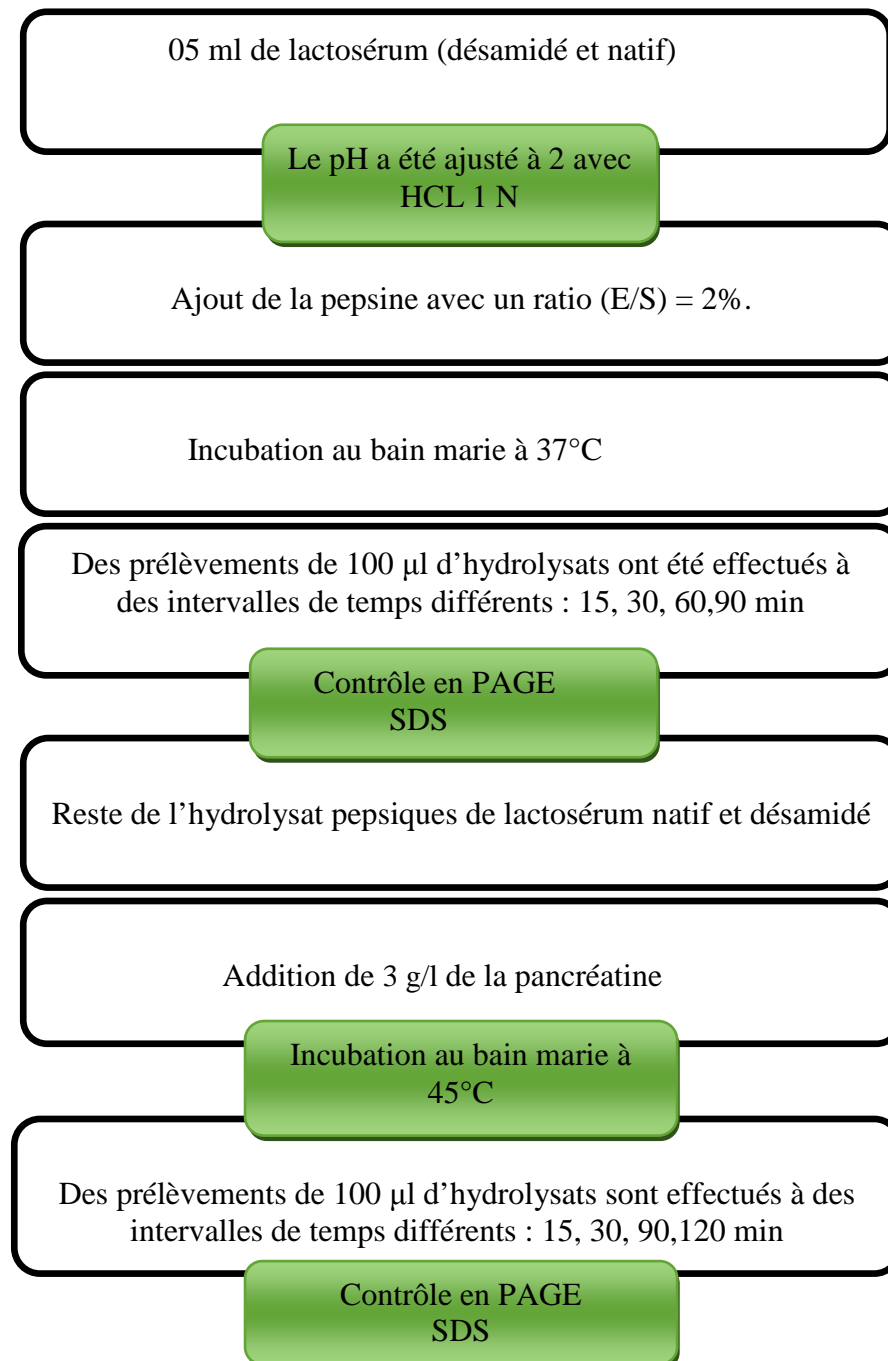
Un jus gastrique artificiel a été préparé en utilisant un tampon HCl contenant les réactifs suivant : NaCl (8 g/l), KCl (0,2 g/l), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (8,25 g/l), NaHPO<sub>4</sub> (14,35 g/l), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,1 g/l) et MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,18 g/l).

Le pH du tampon a été ajusté à 1, 2, 3, 4 et 5 en utilisant une solution d'HCl (5 M). 5 ml de chaque échantillon de lactosérum désamidé et natif ont été mélangés avec 5ml du jus gastrique artificiel pour tous les pH.

Le mélange réactionnel des deux échantillons de lactosérum a été incubé dans un bain-marie à une température de 37°C durant 6 h. Des prélèvements ont été réalisés après 0, 0,5, 1, 2, 4 et 6 h d'incubation et ensuite ils ont été contrôlés par PAGE native.

### 2.2.6. Digestion gastro-intestinale simulée des protéines sériques camelines

La digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* a été réalisée selon la méthode décrite par NONGONIERMA *et al*, (2017). La figure représente les différentes étapes de cette digestion :



**Figure 06 : Étapes de la digestion gastro-intestinale simulée des protéines sériques camelines**

### 2.2.7. Mesure de l'activité antioxydante par le test de DPPH

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par ZHU *et al* (2008). DPPH est une abréviation commune pour un composé chimique organique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl. C'est une poudre cristalline de couleur sombre composée de radical libre stable. En solution dans le méthanol, il est caractérisé par une couleur violette ; en présence d'un donneur d'hydrogène (AH) il est réduit à la forme non radicalaire 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune pâle, cette propriété permet donc le contrôle visuel de la réaction. Ce passage de la première forme à la deuxième est accompagné d'une diminution de l'absorbance et libération du radical. Le DPPH présente un maximum d'absorption dans le visible qui se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol.

Donc la réduction du radical libre DPPH par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible à 517nm.

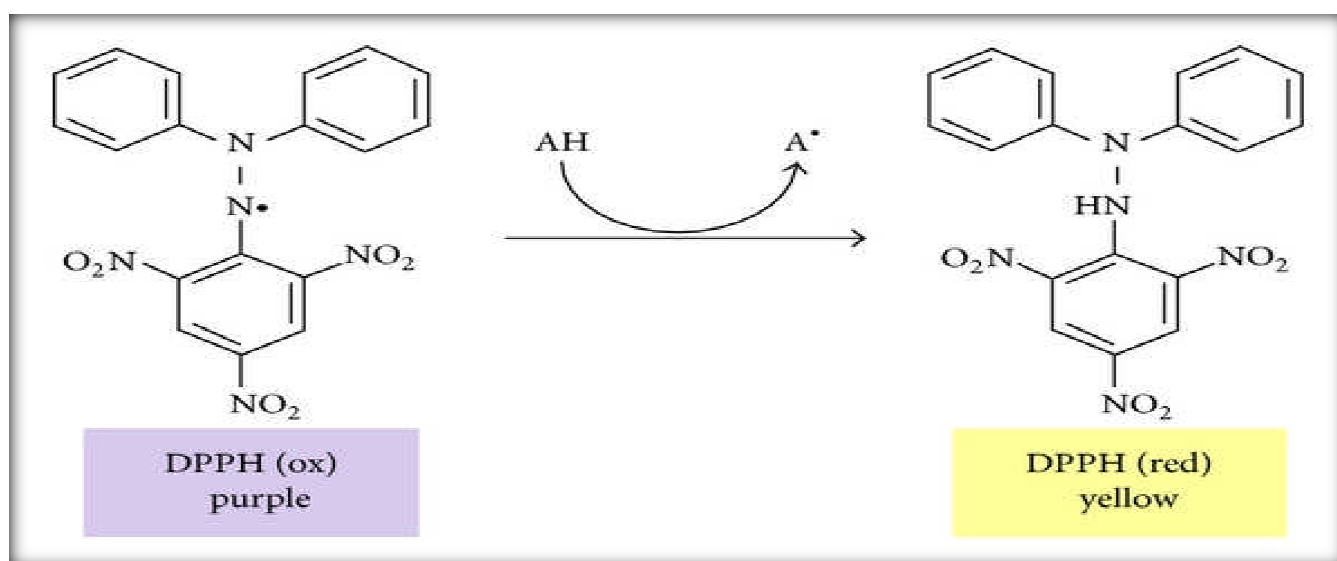


Figure 07 : Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant (AH)

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH (0,1 mM) dans 100 ml d'éthanol. L'activité anti radicalaire des lactosérums natifs, désamidés a été déterminé et ainsi que leur hydrolysats.

2 ml de la solution du DPPH ont été ajoutées à 500 µl de chaque échantillon. Le mélange est agité puis est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 1h.

La lecture de l'absorbance a été faite à 517 nm contre un blanc correspondant à la solution du DPPH ; de même, pour chaque échantillon trois essais ont été effectués.

Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante :

$$I \% = [(AB-AE)/AB] \times 100\%$$

I %: pourcentage d'inhibition ; AB : absorbance du blanc ; AE : absorbance de l'échantillon.

# ***III. Résultats et***

# ***Discussions***

### III. Résultats et discussions

#### 3.1. Teneur en protéines lactosériques

La méthode de dosage spectrophotométrique de BIURET décrite par GORNALL *et al.* (1949) a été utilisée pour estimer la teneur en protéines en exploitant la courbe d'étalonnage (figure 03).

Les protéines du lactosérum constituant la fraction soluble des protéines du lait sont d'une excellente valeur nutritionnelle car elles sont riches en lysine tryptophane et acides aminés soufrés (CHEFTEL et LORIENT, 1982).

La concentration des protéines sériques obtenue dans notre étude est de l'ordre de 7,14  $\pm$  0,42 g/l.

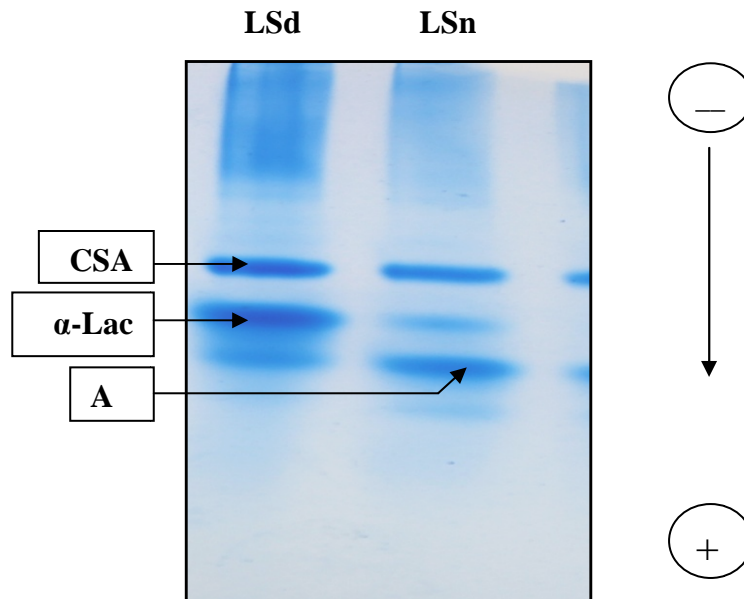
Le lait de vache contient une faible concentration en protéines sériques 5,5 - 6,5 g/l (ROLLERI *et al.*, 1956) et BELHADI, (2010) par rapport au lait de chamelle qui varie entre 6,67-8,42 g/l.

Ce taux important en protéines sériques du lait camelin est d'un grand intérêt du fait que c'est dans cette fraction qu'on retrouve des facteurs antibactériens particulièrement puissants (lysozyme, lactoferrine et les immunoglobulines) (ELAGAMY, 2000).

La valeur obtenue dans notre étude (7,14  $\pm$  0,42 g/l) est inférieure à celle signalée par SI AHMED ZENNIA, (2015) qui est en moyenne de 8,0.

### 3.2. La sensibilité des protéines lactosériques camelines au phénomène de la désamidation non enzymatique

Dans le but de déterminer l'effet de la désamidation non enzymatique sur les protéines sériques camelines, nous avons effectué une électrophorèse en PAGE-native. Le profil électrophorétique est présenté dans la figure 08.



**Figure 08 : Profil électrophorétique en PAGE-native des protéines lactosériques camelines natives et désamidées après une désamidation non enzymatique à pH 8,4.**

**Gel de séparation : T = 12% ; C = 2,7%.**

**LSn : Lactosérum natif      LSd : Lactosérum désamidé      α-Lac : L'α-Lactalbumine**  
**CSA : Sérum albumine cameline      A : α-Lac désamidée**

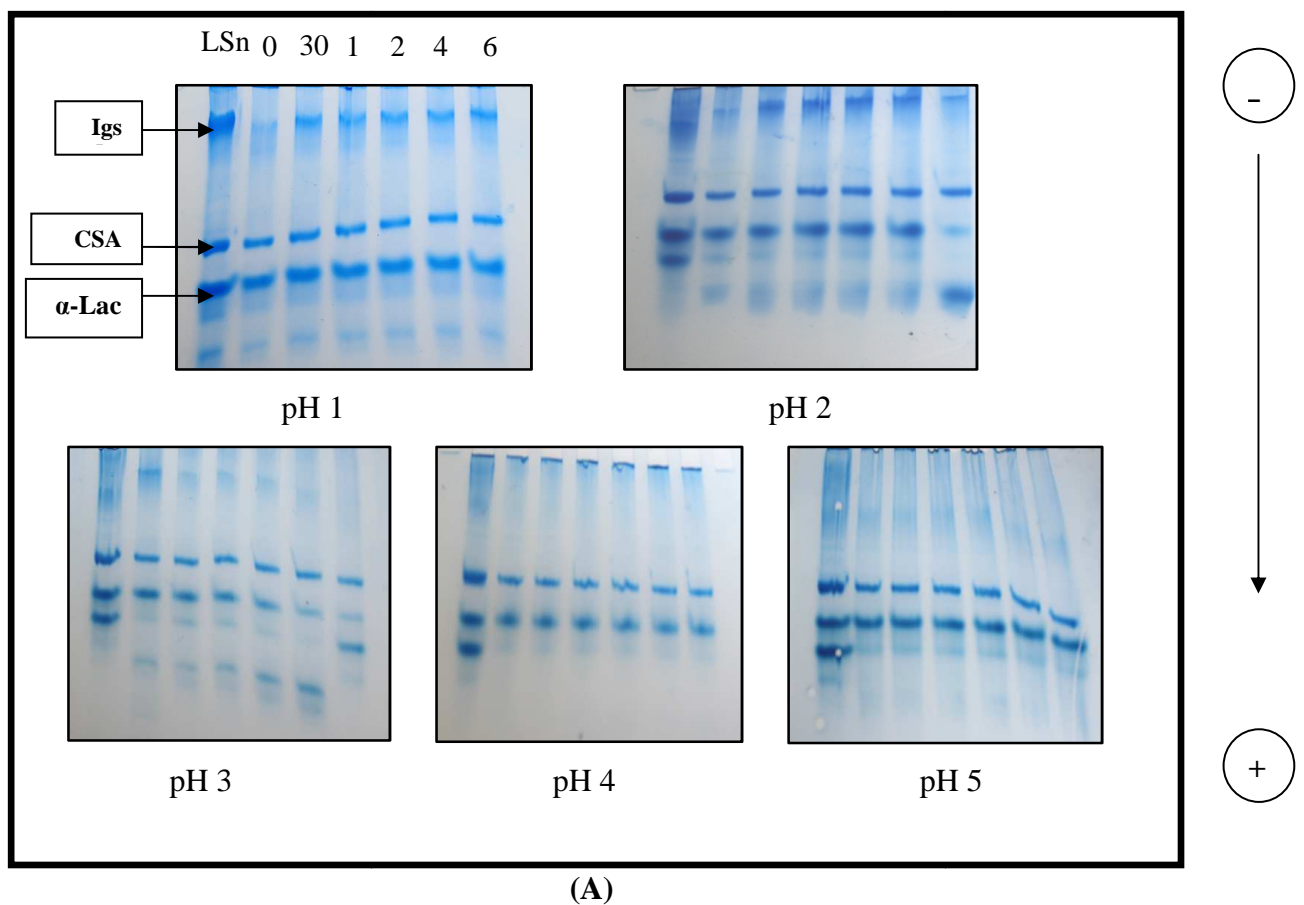
Le profil électrophorétique montre que les protéines lactosériques camelines sont constituées majoritairement de la CSA et de l'α-Lactalbumine qui représente la proportion la plus élevée. Nous remarquons en parallèle l'absence de la bande qui correspond à la β-Lactoglobuline.

Le profil électrophorétique révèle l'apparition d'une nouvelle bande A qui migre plus loin que l' $\alpha$ -Lac native. Cette nouvelle bande correspondrait à l' $\alpha$ -Lac cameline qui a subi une désamidation.

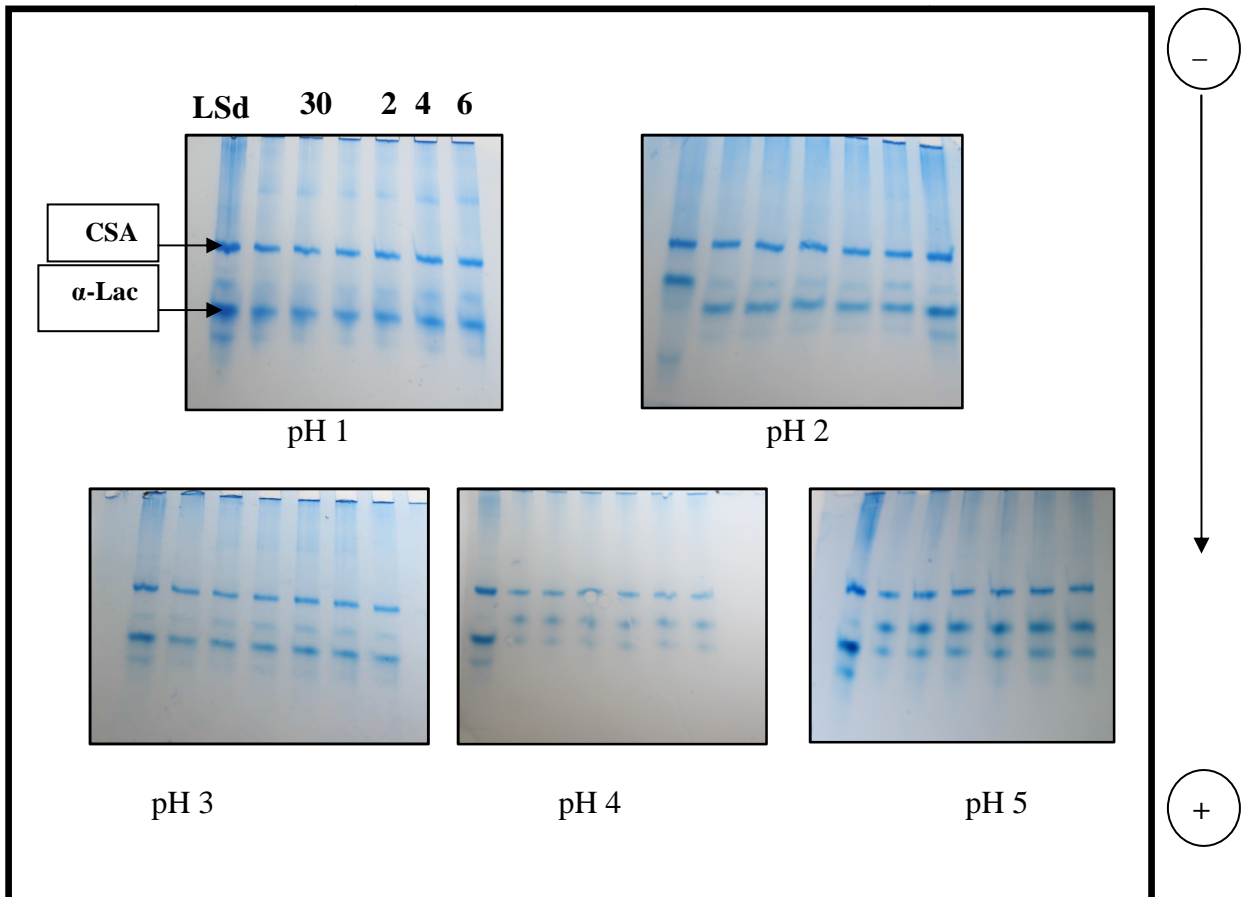
Des résultats similaires sont rapportés par SI AHMED ZENNIA, (2015) qui a montré que la présence des deux sites Asn16-Gly17 et Asn45-Gly46 dans la séquence primaire de l' $\alpha$ -Lac cameline rend cette protéine sujette à une désamidation non-enzymatique à pH 8,4.

### 3.3. Effet de suc gastrique artificiel sur les protéines lactosériques camelines

Les protéines lactosériques camelines natives et désamidées ont été mélangées avec un suc gastrique artificiel, à des pH différents et incubés pendant 6 heures à 37°C. Un contrôle en PAGE native a été effectué (figure 09).



- (LSn , 0 , 30 min , 1h , 2h , 4h, 6h) sont les mêmes pour tous les pH.



(B)

**Figure 09 : Electrophorégramme en PAGE native des protéines sériques camelines natives (A) et désamidées (B) après incubation avec un suc gastrique artificiel à différents pH.**

**Gel de séparation : T = 12% ; C = 2,7%.**

**LSn : Lactosérum natif**

**Ld : Lactosérum désamidé**

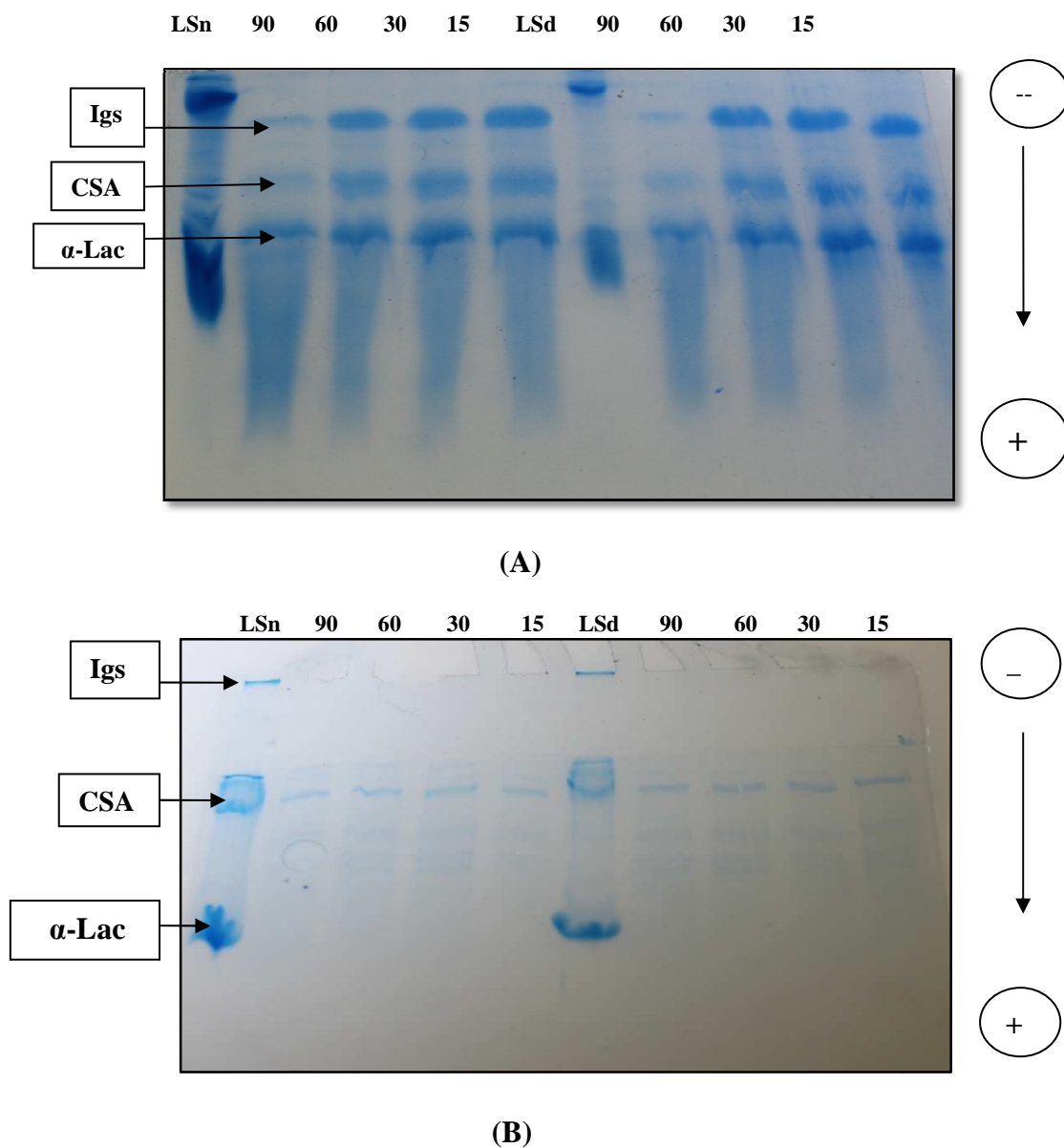
- Ld , 0 , 30 min , 1h , 2h , 4h , 6h : sont les mêmes pour tous les pH.

En analysant les profils électrophorétiques obtenus en PAGE- native des séroprotéines camelines natives (figure 09 -A) et des séroprotéines camelines désamidées (figure 09 -B), nous constatons que les bandes de protéines ne sont pas modifiées (il n'y a ni apparition de nouvelles bandes ni disparition des bandes correspondantes aux protéines principales).

Il est donc possible de conclure que le suc gastrique artificiel à différents pH n'influe pas sur les séroprotéines camelines natives et désamidées.

### 3.4. La digestion gastro-intestinale simulée par la pepsine et la pancréatine.

La figure (10) représente des protéines sériques natives et désamidées après la digestion gastro-intestinale simulée par la pepsine et la pancréatine.



**Figure 10: Electrophorégramme en PAGE SDS des hydrolysats pepsiques (A) et pancréatiques (B) des protéines sériques camelines natives et désamidées.**

**Gel de séparation : T =17% , C =2,7% ; gel de concentration : T=4,8% , C=2,7%**

**Le temps est en minutes (15 ; 30 ; 60 ;90 min)**

Les profils électrophorétiques obtenus, révèlent la présence de bandes bien focalisées, d'intensités variables. Selon la mobilité électrophorétique croissante ; les bandes représentés en figure (10) pourraient correspondre aux Igs, CSA et l' $\alpha$ -La. Les Igs migrent à un niveau très faible, vue leur PM très élevé. L' $\alpha$ -lactalbumine cameline est représentée par une bande bien focalisée, son PM est faible, elle migre à un niveau plus loin.

L'analyse du profil électrophorétique des hydrolysats pepsiques représenté en (figure 10) montre qu'après 90 min d'incubation, l'intensité des bandes électrophorétiques diminue.

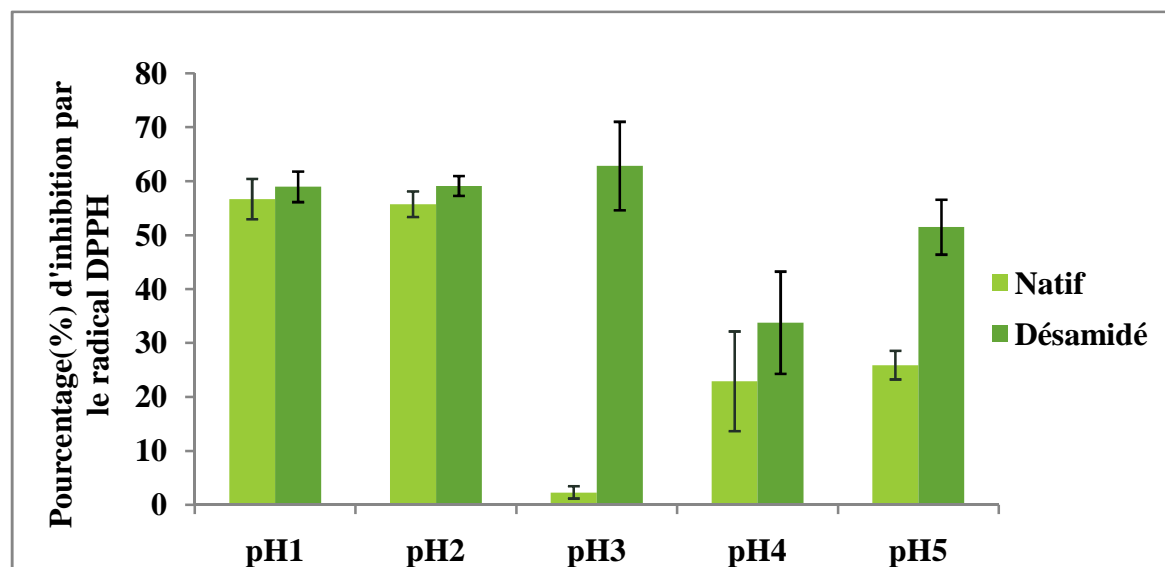
L'hydrolyse est très accentuée après l'addition de la pancréatine; dans ce cas, nous constatons la disparition totale des bandes électrophorétiques de la CSA et de l' $\alpha$ -Lac.

Ces résultats suggèrent que la désamidation non enzymatique n'a pas protégé le site de coupure des enzymes digestives car les chaînes latérales chargées négativement (Asp et isoAsp) lors de la désamidation entraînent une diminution du pHi de la protéine ce qui provoque l'ouverture de sa structure par des forces électrostatiques répulsives et par conséquent, celle-ci deviennent plus sensibles à l'attaque protéolytique (ROBINSON N.E.et ROBINSON A.B, 2004).

Des résultats similaires ont été rapportés par ABDERRAHMANE *et al*, (2015) qui ont réalisé une digestion enzymatique des protéines sériques camelines et bovines par la pepsine. Ils ont constaté que les séroprotéines camelines ont une meilleure digestibilité avec un haut degré d'hydrolyse en les comparants aux protéines sériques bovines.

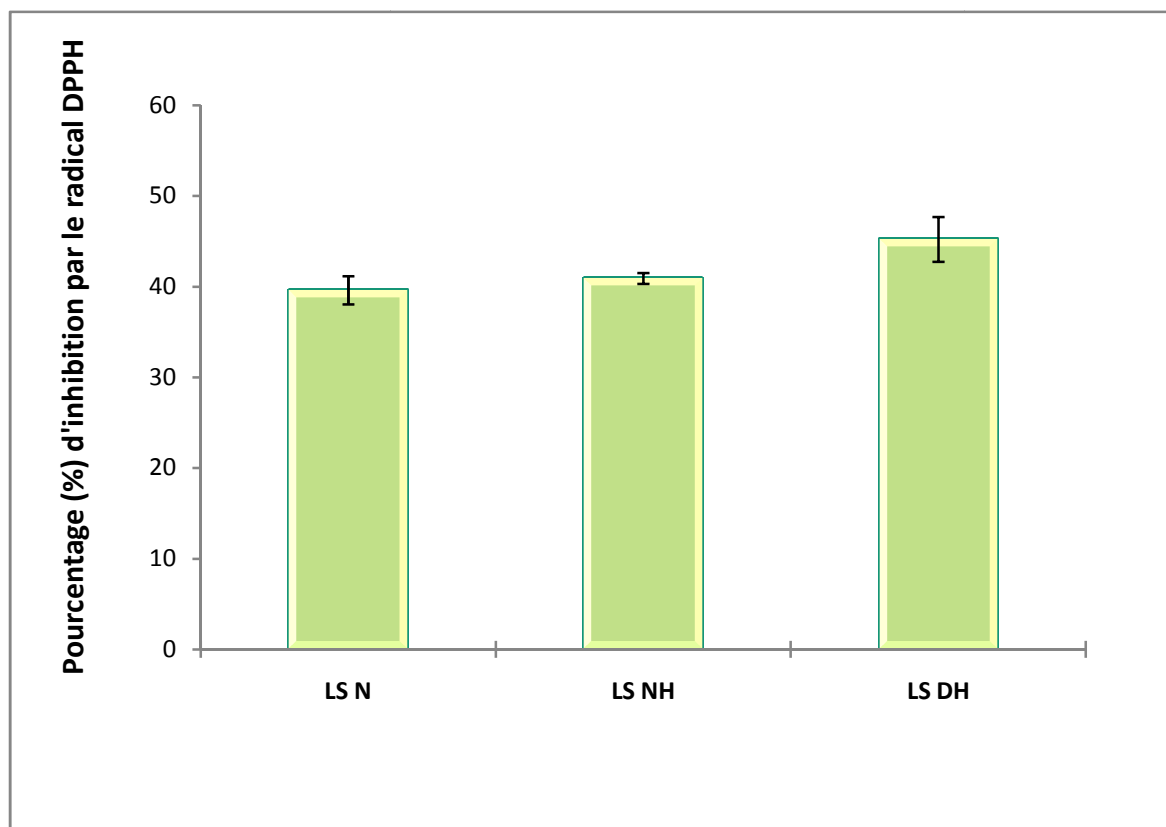
### **3.5. L'activité antioxydante des protéines sériques camelines et de leurs hydrolysats**

Les résultats de l'activité antioxydante des protéines sériques camelines et leurs hydrolysats pepsiques et pancréatiques sont estimés par le test du DPPH et sont représentés par les histogrammes dans les figures (11 et 12).



**Figure 11 : Pourcentages d’inhibition de radical DPPH, par les protéines sériques camelines natives et désamidées après 6h d’incubation avec le suc gastriques artificiel.**

L’analyse de l’histogramme révèle une différence dans la capacité des protéines sériques natives et désamidées à inhiber le DPPH à différents pH. Un haut pouvoir a été enregistré pour le lactosérum désamidé à pH 1, 2 et 3 avec les pourcentages les plus élevés ( $58,97 \pm 2,84 \%$ ), ( $59,13 \pm 1,85\%$ ) et ( $62,82 \pm 8,22$ ) respectivement. Suivent les protéines sériques natives qui montrent une faible capacité inhibitrice au radical DPPH qui a été constatée pour le lactosérum natif à pH 3, 4 et 5 à ( $2,28 \pm 1,14\%$ ) ; ( $22,89 \pm 9,25\%$ ) et ( $25,88 \pm 2,56$ ) respectivement.



**Figure 12 : Pourcentages d'inhibition de radical DPPH, par les protéines sériques camelines et leurs hydrolysats natifs et désamidés**

**LSN : lactosérum natif    LSNH : lactosérum natif hydrolysé    LSDH : lactosérum désamidé hydrolysé**

Les protéines sériques camelines natives et désamidées possèdent une activité antioxydante, elles sont capables de piéger le radical DPPH. Cependant les échantillons désamidés montrent des pourcentages plus importants par rapport aux protéines sériques natives à tous les pH. L'amélioration de l'activité antioxydante des protéines sériques totales après la désamidation pourrait être expliquée par l'exposition des résidus d'acides aminés qui possèdent des propriétés antioxydantes aux extrémités des peptides après ce phénomène d'hydrolyse non enzymatique.

Comme le montre les résultats de la présente étude, les protéines sériques désamidées ont une plus forte activité antioxydante, ont un pourcentage d'inhibition du radical DPPH plus important par rapport aux protéines sériques natives.

L'hydrolysate désamidé montre un pourcentage plus important ( $45,21 \pm 2,47\%$ ) par rapport à l'hydrolysate des protéines sériques natives ( $40,9 \pm 0,61\%$ ).

L'analyse de la structure primaire des protéines camelines montre que ces dernières sont riches en acides aminés qui suggèrent avoir des propriétés antioxydantes (Phe, Trp, Ty, His, Cys, Glu, Asp, Lys, Arg) (SALAMI *et al*, 2010).

Une amélioration significative de la capacité antioxydante des protéines sériques camelines après la protéolyse a été observée, cela pourrait être interprété par une meilleure accessibilité aux résidus d'acides aminés.

Notre étude montre que les peptides dérivés des protéines sériques camelines désamidées après hydrolyse enzymatique ont de bonnes propriétés antioxydantes, car la désamidation ouvre plus la protéine.

Il a été avancé par certaines études similaires qu'une forte activité antioxydante est obtenue avec des peptides de faible PM de 5 et 10 kDa, suggérant ainsi que la capacité antioxydante dépend de la taille et de la composition des peptides (SALAMI *et al*, 2010 ; ABDERRAHMANE *et al*, 2015).

SALAMI *et al*, 2011 ; EL-HATMI *et al*, 2016 ; KUMAR *et al*, 2016 ont montré que les propriétés antioxydantes des protéines sont plus importantes après l'hydrolyse enzymatique.

***Conclusion***

***Générale***

### Conclusion générale

L'espèce cameline dont la particularité réside dans le fait qu'elle est capable, dans des conditions de sècheresse extrêmes et en manque de pâturage, de produire un lait de très bonne qualité qui pourrait être une source précieuse de nutriments pour l'homme car il ne s'altère pas aussi vite que les autres laits ; il est doté de vertus thérapeutiques et cosmétiques, qui font actuellement l'objet d'investigations scientifiques au monde pour infirmer ou confirmer ses bienfaits . En plus de son intérêt nutritionnel, le lait de chamelle est doté de plusieurs activités biologiques attribuées à sa particulière composante protéique.

La désamidation des protéines joue un rôle important dans la régulation biologique, probablement comme une horloge biologique dans la détermination de la fonction et du catabolisme des protéines ou un signal pour la dégradation des enzymes et des hormones. L'efficacité de la réaction de désamidation non enzymatique repose sur les conditions présentes dans le tractus gastro-intestinal (pH légèrement alcalin, température de 37°C, peptides facilement accessibles). La modification d'un peptide par désamidation spontanée induit nécessairement un changement de sa structure et de sa conformation, ce qui provoque des conséquences importantes sur ses propriétés bioactives et fonctionnelles.

Au cours de cette étude, la désamidation des protéines sériques du lait camelin collecté dans le sud algérien a été réalisé dans un tampon phosphate pH 8,4 et à 37°C. Le contrôle électrophorétique en PAGE-native a montré que l' $\alpha$ -Lac a été désamidée par l'apparition d'une nouvelle bande avec une mobilité électrophorétique plus élevée.

Par la suite, nous avons testé l'effet du suc gastrique artificiel à différent pH sur les protéines sériques camelines. En effet, nous avons constaté que le suc gastrique n'a pas d'effet sur les protéines sériques camelines natives et les protéines sériques désamidées n'ont pas été touchées.

Puis, nous avons simulé la digestion gastro-intestinale des protéines sériques camelines natives et désamidées, ces protéines sont hydrolysées par la pepsine puis par la pancréatine. Le profil électrophorétique en PAGE-SDS des hydrolysats enzymatiques a montré la disparition totale des bandes correspondantes aux protéines sériques natives et désamidées du lait de chamelle.

L'activité antioxydante (test DPPH) des protéines sériques camelines natives et désamidées incubés au suc gastrique artificiel et après hydrolyse a été amélioré. Pour les protéines sériques natives à pH 3 et 5, nous avons eu ( $2,28\% \pm 1,13$ ) et ( $25,88\% \pm 2,65$ ) respectivement. Par contre pour les protéines sériques désamidées les valeurs étaient plus importantes pour les mêmes pH, les valeurs obtenues sont ( $62,82\% \pm 8,217453$ ) et ( $51,49\% \pm 5,0850664$ ) respectivement.

L'activité antioxydante des protéines sériques camelines désamidées après hydrolyse a été amélioré, nous avons eu une valeur de ( $45\% \pm 2,5$ ) qui est un pourcentage plus élevé par rapport au pourcentage estimé avec les protéines sériques natives. Donc, l'hydrolyse enzymatique augmente le pouvoir d'inhibition du radical DPPH, ainsi que la désamidation l'augmente d'avantage.

Il nous semble intéressant d'étudier le phénomène de la désamidation pour mieux élucider la relation structure / fonction des protéines et pour l'amélioration des propriétés techno- fonctionnelles des protéines alimentaires.

***Références***

***Bibliographiques***

## Références bibliographiques :

- **ABDERRAHMANE F., MEZMAZE F., CHEKROUN A., SAIDI DJ. et KHEROUA O. (2015).** In vitro digestibility of the dromedary whey proteins: potential uses in infant milk allergies. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2 (7), 115-120.
- **ABU-LEHIA I.H. (1989).** Physical and chemical characteristics of camel milk fat and its fractions. *Food Chemistry*, 34, 261-271.
- **AL-ALAWI A.A. et LALEYE L.C. (2011).** Characterization of camel milk protein isolates as nutraceutical and functional ingredients. Collaborative Research Project Sultan Qaboos University United Arab Emirates University.
- **AL-AWADI F. M. et SRIKUMAR T. S. (2001).** Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks. *Journal of Dairy Research*, 68, 463-469.
- **Al-HAJ O.A. et Al KANHAL H.A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk -A review. *International Dairy Journal*. 20(12):811–821
- **Al-SHAMSI K. A., MUDGIL P., HASSAN H. M. et MAQSOOD S. (2018).** Camel milk protein hydrolysates with improved techno functional properties and enhanced antioxidant potential in in vitro and in food model systems. *Journal of Dairy Science*, 101(1), 47-60.
- **ANTAL J., PAL G., ASBOTH B., BUZAS Z., PATTHY A. et GRAF L.N. (2001).** Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligo peptides substrate library. *Analytical Biochemistry*, 288, 156-167.
- **ATTIA H., KHEROUATOU N. et DHOUIB A. (2001).** Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 263-270.
- **BELABID S. et DJOUDER O. (2016).** Détermination de l'activité anti-oxydante des protéines sériques du lait de chamelle et de leurs hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques. Mémoire de la fin d'étude, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou
- **BELHADI N. (2010).** Effet des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait

de vache en régions montagneuses, mémoire magister en agronomie, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

- **BOSS J. O., BLANC B. et PLATTNER E. (1976).** Le dosage des protéines du lait et ces principaux dérivés : méthodes et appareillage titrés de la littérature parue entre 1964 et 1974. *Travaux Chimiques Alimentation et Hygiène*, 67, 226-261.
- **BOUDJENAH H.S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en sciences biologiques (option biochimie). Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou (Algérie).
- **CAYOT P. et LORIENT D. (1998).** Structures et Techno fonctions des Protéines du Lait. Ed. Tec et Doc., Lavoisier, Paris.
- **CHEFTEL J. C. et LORIENT D. (1982).** Aspect technologique : les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Lait*, 62, 435-483.
- **CHETHOUNA F. (2011).** Étude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologique du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Thèse Magister. Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie.
- **ELAGAMY E. I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk protein with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68, 227-232.
- **EL-AGAMY E. I., ABOU-SHLOUE Z. I. et ABDEL-KADER Y. I. (1998).** Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 43, 57-70.
- **EL-AGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P. et ASSAF R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, 59, 169-175.
- **EL-AGAMY E.I., NAWAR M., SHAMSIA S.M., AWAD S. et GEORGE F.W. (2009).** Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant research*, 82, 1-6.
- **EL-AGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. et ASSAF R. (1996).** Purification and characterization of Lactoferrin, Lactoperoxydase, Lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *Int. Dairy J.*, 6.
- **ELAMINE F.M et WILCOX C.J. (1992).** Milk composition of Majaheim camels. *Journal of dairy Science*, 75(11), 3155-3157.

- **EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J. L., KHORCHANI T et ATTIA H. (2006).** Therapeutic potential of whey proteins of camel colostrums. *Microbiologie ET Hygiene Alimentaire*. 53(18), 70-76.
- **EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J. L., YAHYAOUI M. H. et ATTIA H. (2007).** Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, 70, 267-271.
- **EL-HATMI H., JRAD Z., SALHI I., AGUIBI A., NADRI A. et KHORCHANI T. (2015).** Comparison of composition and whey protein fractions of human, camel, donkey, goat and cow milk. *Mljekarstvo*, 65 (3), 159-167.
- **EL-HATMI H., LEVIEUX A. et LEVIEUX D. (2006).** Camel (*Camelus dromedarius*) immunoglobulin G,  $\alpha$ - lactalbumin, serum albumin and lactoferrin in colostrum and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research*. 73, 288-293.
- **ELLOUZ S. et KAMOUN N. (1989).**Évaluation de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de la lactation. *Options Méditerranéennes-Série Seminaires*. 6, 307-311.
- **FARAG S. I. et KABARY K. M. (1992).** Chemical composition and physical properties of camel's milk and milk fat; in «Proceedings of the 5th Egyptian Conference on Dairy Science and Technology». Cairo, Egypt.
- **FARAH Z. (1996).** Camel Milk Properties and Products. Swiss Centre for Development Cooperation in Technology and Management, SKAT, Switzerland.20.
- **FARAH Z. et RÜEGG M.W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstruct*.
- **FAYE B., KONUSPAYEVA G., MESSAD S. et LOISEAU G. (2008).** Discriminant milk components of bactrian camel (*Camelus bactrianus*), dromedary (*Camelus dromedarius*) and hybrids. *Dairy Science and Technology*. 88, 607-617.
- **GEIGER T. et CLARKE S. (1987).** Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginyl and Aspartyl Residues in Peptides. *Journal of Biology Chemistry*, 262(2), 785-794.
- **GUILLOU H., PELISSIER J. P. et GRAPPIN R. (1984).** Méthode de dosage des protéines du lait de vache. *Lait*, 66 ,143-175.
- **GUILLOU H., PELISSIER J. P. et R. GRAPPIN R. (1976),** Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, 66, 143-175.
- **HADDADIN M. S. Y., GAMMOH S. I. et ROBINSON R. K. (2007).** Seasonal

variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. Journal of Dairy Research, 75, 8-12.

- **HADDADIN M.S.Y., GAMMOH S.I. et ROBINSON R.K. (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. Journal of Dairy Research 75 (1).
- **HAMADA J.S. et MARSHALL W.E. (1992).** Enzymatic Deamidation of Proteins for Improved Food Uses, U.S. Patent N° 5, 082, 672.
- **HAMADA J.S., SHIH F.F., FRANK A.W. et MARSHALL W.E. (1988).** Deamidation of soy peptides and proteins by *Bacillus circulans* peptide glutaminase. Food science, 53(3), 671-672.
- **INDRA R. (2003).** Temet (Bactrian camel from Mongolia). Oulaan-Bator, Mongolia: Mongolian State University of Agriculture.
- **KAPPELER S. (1998).** Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Doctorat Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse.
- **KAPPELER S. R. 1998.** Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph. D. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- **KAPPELER S., MANFRED A., FARAH Z. et PUHAN Z. (1999).** Sequence analysis of camel milk (*Camelus dromedarius*) lactoferrin. Int. Dairy J.,
- **KHAN B. et IQBAL A. (2001).** Production and composition of camel milk: review. Pakistani Journal of Agriculture Science, 38.
- **KHASKHELI M., ARAIN M. A., CHAUDHRY S., SOOMRO A. H. et QURESHI T. A. (2005).** Physico-chemical quality of camel milk. Journal of Agriculture and Social Sciences,(2).
- **KHEROUATOU N., NASRI M. et ATTIA H. (2003).** A study of the dromedary milk casein micelle and its changes during acidification. Brazilian Journal of Food Technology: 6.
- **KONUSPAYEVA G., FAYE B. et LOISEAU G. (2009).** The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data. Journal of Food Composition and Analysis 22.
- **KORHONEN H., MARNILA P. et GILL H.S. (2000).** Milk immunoglobulins and complement factors. The British Journal of Nutrition, 84 (Suppl 1), S75-S80.

- **LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMED M.A. (1986).** Analysis of the casein content in camel (*camelus dromedarius*) milks. Swidish Journal of Agricultural Research, 16, 118.
- **LASNAMI. (1986).** Le dromadaire en Algerie «Prespectives d'avenir» I.N.A. EL HARRACH-ALGER.
- **MAQSOOD S., AI-DOWAIL A., MUDGIL P., KAMAL H., JOBE B. et HASSAN H.M.(2018).** In-depth characterization of protein and lipid fractions from camel and cow milk, their functionality, antioxidant and antihypertensive properties upon simulated gastro-intestinal digestion, Food Chemistry (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.011>.
- **MAZURIER J. et SPIK G. (1980).** Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. Biochimica et Biophysica Acta, 629.
- **MCNALLY E.J. et HASTEDT J.E. (2007).** Protein Formulation and Delivery, 2ème Ed; Informa Healthcare, New York.
- **MEDJOUR A. (2014).** Étude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semi-intensif). Thèse Magister. Université Mohamed Khider de Biskra., Algérie.
- **MEHAIA M. A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. et EL-MOUGY S.A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. Food Chemistry, 52, 115-122.
- **MEHAIA M.A. (1994).** Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. Food Chemistry, 50 (2), 153-155.
- **MEHAIA M.A. (1995).** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. Milchwisens chaft, 50.
- **MOHAMED A. (1993).** Characterization of camel milk  $\beta$ -casein. Ph.D. Thesis. University of Karachi, Pakistan.
- **NARKYUN B. (2013).** In vitro and in vivo study of deamidating enzymes through proteomic analysis: Focus on Asparaginase, Glutaminase and Transglutaminase 2.These.University of Natural Resources and Applied Life Sciences. Vienna.
- **NONGONIERMA A. B., PAOLELLA S., MUDGIL P., MAQSOOD S. et FITZGERALD R. J. (2017).** Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of

camel milk protein hydrolysates generated with trypsin. *Journal of Functional Foods*, 34, 49-58.

- **OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J.M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. et HAERTLE T. (1998).**Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and Bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 105-124.
- **PATEL K. et BORCHARDT R. T. (1990).**Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical Research*, 7(7), 703-11.
- **QUINLAN G. J., MARTIN G. S. et EVANS T. W. (2005).** Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41, 1211–1219.
- **RAMET J. P. (2003).** Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur : "Lait de chamelle pour l'Afrique", 5-8 novembre, Niamey, Niger.
- **ROBINSON N.E. et ROBINSON A.B. (2004).** Molecular Clocks: Deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in peptides and proteins, Ed; Al those Press, USA  
Synthesis in Investigations of Biological Deamidation of Peptides and Proteins. *Biopolymers*, 90(3), 297-306
- **ROBINSON N.E. et ROBINSON A.B. (2007).**Use of Merrifield Solid Phase Peptide Synthesis in Investigations of Biological Deamidation of Peptides and Proteins. *Biopolymers*, 90(3), 297-306.
- **SAITMURATOVA K.H., SULAIMANOVA G. I. et SADYKOV A. A. (2001).** Camel's milk and shubat from the aralregion. *Chemistry of Natural Compounds*, 37(6), 566-568.
- **SALAMI M., MOOSAVI\_MOVAHEDI A. A., EHSANI M. R., YOUSEFI R., HEARTLE T., CHOBERT J. M., RAZAVI S. H., HENRICH R., BALALAE S., EBADI S.A., POUTAKDOOST S. et -NASLAJI A. (2010).**Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 3297-3302.
- **SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M. R., DALGALARRONDO M., CHOBERT J. M., HAERTLE T., RAZAVI S. H., SABOURY A. A., NIASARI-NASLAJI A. et MOOSAVI-MOVAHEDI A. A. (2008).**Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18, 1097-1102.

- **SAWAYA W.N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A.F. et AL-MOHAMMED H.(1984).**Chemical composition and nutritional quality of camel milk. Journal of Food Science, 49.
- **SCHMIDT D. G. (1982).**Association of caseins and casein micelle structure; in « Developments in Dairy Chemistry». Fox P.F. ed. Applied Science Publishers, London.
- **SENOUSSI C. (2011).** Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien et de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone ; Mémoire de Magister ; Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou ; Algérie.
- **SHABO Y. et YAGIL R. (2005).**Etiology of autism and camel milk as therapy. International journal on Disability and Human Development, 4(2), 67-70.
- **SHLOMO M. (1996).** Surface Activity of Proteins Chemical and Physico chemical, Modifications, Ed; New York
- **SHUIEP E. S., EL ZUBEIR I. E. M., EL OWNI O. A. O. et MUSA H.H. (2008).** Influence of season and management on composition of raw camel (*Camelus dromedarius*) milk in Khartoum state, Sudan. Tropical and Subtropical Agro ecosystems, 8, 101-106.
- **SI AHMED Z.S. (2015).** Isolement et séparation des protéines sériques du lait de chamelle : mise en évidence du phénomène de désamidation de l' $\alpha$ -Lactalbumine ; conséquence sur la stabilité structurale. Thèse Doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Alger.
- **SI AHMED ZENNIA S., MATI A., SAULNIER F., VERDIER Y., CHIAPPETTA G., MULLIERT G., MICLO L., VINH J., GIRARDET J.M. (2015).** Identification by FTICR- MS of (*Camelus dromedarius* )  $\alpha$ -lactalbumin variants as the result of no enzymatic deamidation of Asn-16 and Asn-45. Food Chemistry, 187, 305-313.
- **SIBOUKEUR O. (2007).** Étude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse Doctorat. Institut national agronomique El-Harrach-Alger, Algérie.
- **STAHL T., SALLMANN H. P., DUEHLMEIER R. et WERNERY U. (2006).** Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrums. Journal of Camel Practice and Research, 13.
- **TAYEFI-NASRABADI H., HOSEINPOUR-FAYZI M. A. et MOHASSELI M. (2011b).** Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in camel milk: A comparison with bovine lactoperoxidase. Small Ruminant Research, 99.

- **TAYEFI-NASRABADI H., HOSSEINPOUR-FEIZI M.A. et MOHASSELI M. (2011a).**Thermodynamic analysis of lactoperoxidase activity in camel milk. International Conference on Life Science and Technology.IPCBEE, 43.  
**WANGO J., FARAH H. et PUHAN Z. (1998).**Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. Milchwissenschaft, 53 (3), 136-139.  
**XIE M. et SCHOWEN R.L. (1999).**Secondary Structure and Protein Deamidation. Journal of Pharmaceutical Sciences, 88(1), 8-13.  
**YAGIL R. et ETZION Z. (1980).**Effect of drought conditions on the quality of camel milk. J. Dairy. Res.,47.

# ***Annexes***

## Annexes

### Annexe01:Électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes

(PAGE-native)

#### Préparation des solutions

##### Solution d'acrylamide

Acrylamide .....	9g
Bisacrylamide .....	0, 25g
ED.....	25ml

##### Tampon de gel (B)

Tris.....	2, 285g
ED.....	25ml

Ajuster à pH 8,9 avec de HCL 4N

##### Tampon d'électrode

Tris .....	0,12g
Glycine.....	0, 58
ED.....	200ml

##### Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B).....	100µl
ED.....	700µl
Glycérol 50%.....	200µl

Bleu de bromophénol.....une tête d'aiguille

Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 1ml de ce tampon.

✚ Préparation du gel : T=12% et C=2,7%(pour une plaque) :

Solution(A).....3,25ml

Solution (B).....5ml

ED.....1,68ml

Dégazer le mélange (max 2min)

TEMED.....10µl

Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75µl

Couler et mettre le peigne immédiatement.

Dépôt d'échantillon : à 20µl

Mise sous tension : 20mA ,25V

**Annexe 02 : Électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)**

✚ Solution d'acrylamide : comme celle préparée précédemment

✚ Tampon de gel de séparation

Tris .....4,625g

ED.....25ml

Ajuster à pH 8,8 avec de HCL 4N, ensuite jaugée dans une fiole de 25ml.

✚ Tampon de gel de concentration (solution C)

Tris .....1,5g

ED.....25ml

Ajuster à pH 6,8 avec de HCL 4N, ensuite jaugée dans une fiole de 25ml.

✚ Tampon d'électrode

Tris .....3g

Glycine.....14,4g

SDS.....0,5g

ED.....500ml

Solution(C) .....1ml

ED.....500µl

SDS 10%.....500µl

2-mercaptoéthanol .....50µl

-dissoudre 1à2mg de protéine lyophilisées dans 800µl de ce tampon ;

-chauffage à100°C pendant 4à5min puis refroidir dans un bain d'eau froide ;

-ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu debromophénol

✚ Solution persulfated'ammonium

Persulfated'ammonium.....0,1g

ED .....1ml

✚ Conduite de l'électrophorèse

1/préparation du gel de séparation : T=17% et C=207%(pour une plaque) :

Solution (A).....4,60ml

Solution(S).....2,51ml

ED.....2, 73ml

Dégazer pendant 2min max

SDS 10%.....100µl

TEMED.....13µl

Persulfate d'ammonium 10%.....75µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur.(figure )

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

Solution(A).....1,3ml

Solution(C).....2,5ml

ED .....5, 8ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à10%.....100µl

TEMED.....25µl

Persulfate d'ammonium à 10%.....40µl

-couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne.


-un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5mn en présence d'un détergent

anionique SDS (10% p/v) et un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol (4% v/v). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides seront chargés négativement donc ils seront séparés selon leur taille.


Dépôt d'échantillon : à 20µl ;

Mise sous tension : 20mA, 25V

**Annexe 03:**Révélation des bandes de migration électrophorétique : (SDS et native)

 Solution de fixation

TCA.....	12g
ED.....	100ml

 Solution de coloration

Bleu de Coomassie 0,2% (P/V).....	0, 5g
Dissous dans une solution constituée du mélange	
ED (1V).....	100ml
Methanol (1V).....	100ml
TCA 2 % (P/V).....	4g

 Solution de décoloration

Acide acétique .....	37,5ml
ED.....	321,5ml
Méthanol .....	150ml

Dosage des protéines par la méthode de BIURET.

#### Annexe 04:

✚ Préparation de la solution BSA :

Solubiliser 0.2 g de BSA dans 20ml de Nacl (0.9%).

BSA (ul)	0	50	100	200	300	400	500
EP (ul)	500	450	400	300	200	100	0
Réactif de Gornall (ml)	2	2	2	2	2	2	2

✚ Préparation de la solution de la dilution de lactosérum :

-04 ml de lactosérum dilué avec 4 ml de l'eau physiologique(EP)

-Prélever 0.5 ml de la dilution dans 6 tubes

-Ajouter 2 ml le réactif de Gornall aux 6 tubes.

-Incubation à l'obscurité pendant 30 minutes.

-Lecture de la DO à 540 nm.

- Tracer la courbe étalon  $DO = f(BSA)$ .

#### Annexe 05 :

✚ Préparation de Tampon phosphate

Avec une balance de précision peser :

-234mg de  $NaH_2PO_4$

-155.6mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

-10mg de  $\text{NaN}_3$

-Ajuster jusqu'à 50ml avec une fiole jugé

-Ajuster le pH à 8.4 avec de  $\text{NaOH}$

-Filtration pour éliminer les impuretés

-Dégagé sous vide avec une pompe à vide.

-Conservé à  $T^\circ$  ambiante.