

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
L'UNIVERSITE MOULOU MAMMERI DE TIZI OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIME - MICROBIOLOGIE



**MEMOIRE**

*Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister*

**Spécialité : Sciences Biologiques**

**Option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies**

**THEME**

*Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone*

Par M<sup>elle</sup> SENOUSSE Chahra

Soutenu le : 29 / 11 / 2011

Devant le jury composé de :

Président :	M <sup>me</sup> MOULTI-MATI F.	Maitre de conférences A	UMMTO
Rapporteur :	M <sup>r</sup> MATI A.	Professeur	UMMTO
Examineurs :	M <sup>r</sup> RIBA A.	Maitre de conférences A	UMB Boumerdes
	M <sup>r</sup> MOUSSAOUI R.	Maitre de conférences A	UMMTO
	M <sup>r</sup> AMIR Y.	Maitre de conférences A	UMMTO



*A Dieu,  
En qui j'ai toujours cru  
En qui je croirais toujours*

*A ma famille,  
Symbole d'amour  
inconditionnel  
Symbole de tous les sacrifices*

*A mes professeurs,  
Pour le savoir qu'ils m'ont transmis  
Pour leur générosité et leur confiance*

*« On ne va jamais aussi loin que lorsque l'on ne sait pas où l'on va »*

*Christophe Colomb (1451-1506)*

## **REMERCIEMENTS**

*Qu'il me soit permis d'exprimer ma gratitude à monsieur MATI A., de m'avoir accueilli parmi les siens, de m'avoir proposé ce sujet, mis à ma disposition les conditions nécessaires pour la réalisation de ce travail. J'ai beaucoup apprécié ses conseils et sa naturelle bienveillance.*

*Egalement remerciée doit être M<sup>me</sup> MATI – MOULTI F., maitre de conférences à l'UMMTO pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également aux autres membres de la commission d'examen :*

- *Mr RIBA A., maitre de conférences à l'université de Boumerdes.*
- *Mr MOUSSAOUI R., maitre de conférences à l'UMMTO.*
- *Mr AMIR Y., maitre de conférences à l'UMMTO.*

*Enfin, tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

*A tous, mes plus vifs remerciements.*

## **DEDICACES**

*Toute ma gratitude, mon amour et ma reconnaissance à mes parents, le rayon de soleil auquel je m'accroche tous les jours, à mon frère, mes sœurs, mon neveu et mes nièces pour leur amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragé à continuer mes études .*

*Merci à toi, Dieu, autant de fois qu'il ya de particules dans l'univers, d'eau dans la mer et de vies sur terre.*

*Ma reconnaissance à tous mes collègues qui m'ont permis de réaliser mes travaux dans une ambiance amicale très agréable. Je resterais toujours marquée par le milieu de vie extraordinaire et la belle ambiance du laboratoire (LABAB) ; je pense à Dalila, Hassina et particulièrement à Mme CHABI-BENYAHIA SAMIA, qui m'a toujours supporté. Mes remerciements s'adressent, également, à toute l'équipe du laboratoire pédagogique de microbiologie.*

*Les personnes que j'apprécie étant nombreuses, je ne pourrais les citer toutes, mais elles savent que je leur suis très reconnaissante pour toutes les discussions professionnelles ou personnelles et tous les moments qu'on a partagé ensemble, qu'elles trouvent ici l'expression de mon indéfectible amitié.*

**CHAHRA**





*Table des matières*

## **TABLE DES MATIERES**

	<b>Pages</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>01</b>
<b>1. Synthèse des données bibliographiques</b>	
1.1. Présentation du lait de chamelle .....	03
1.1.1. Élevage du dromadaire et production laitière .....	03
1.1.2. Caractéristiques physicochimiques et organoleptiques.....	04
1.1.3. Propriétés nutritionnelles.....	04
1.1.4. Propriétés thérapeutiques .....	05
1.1.5. Aptitudes technologiques du lait de chamelle.....	05
1.2. Présentation du système protéique du lait de chamelle.....	07
1.2.1. Les caséines .....	07
1.2.1.1. La structure micellaire des caséines .....	07
1.2.1.2. Distribution minérale dans les micelles .....	08
1.2.1.3. Caractéristiques structurales des caséines du lait de chamelle .....	09
1.2.1.4. Isolement et intérêt des caséines .....	10
1.2.2. Les protéines du lactosérum .....	12
1.2.2.1. Isolement et intérêt des séroprotéines .....	12
1.2.2.2. Caractéristiques des séroprotéines majeures .....	15
1.2.2.2.1. L'α-lactalbumine .....	15
1.2.2.2.2. L'albumine sérique .....	16
1.2.2.2.3. La β-lactoglobuline .....	17
1.2.2.3. Les séroprotéines mineures .....	17
1.2.2.3.1. La lactoferrine .....	17
1.2.2.3.2. La lactoperoxydase .....	18
1.2.2.3.3. Le lysozyme .....	19
1.2.2.3.4. Les immunoglobulines .....	19
1.2.2.4. Les protéines spécifiques au lait de chamelle .....	20
1.2.2.4.1. La PGRP (peptidoglycan recognition protein) .....	20
1.2.2.4.2. La WAP (whey acidic protein) .....	21
1.2.2.4.3. La CWBP (camel whey basic protein) .....	21
1.3. Les protéose-peptones du lait .....	22
1.3.1. Définition .....	22
1.3.2. Les fragments d'hydrolyse de la caséine β .....	22
1.3.3. Le composant-3 des PPT .....	22
<b>2. Matériel et méthodes</b>	
2.1. Matériel.....	26
2.1.1. Matière première.....	26
2.1.2. Produits chimiques.....	26

2.1.3. Supports chromatographiques.....	26
2.1.4. Matériel biologique.....	26
2.1.5. Appareillage.....	27
2.1.6. Petit matériel.....	27
2.2. Méthodes d'analyse.....	27
2.2.1. Collecte du lait.....	27
2.2.2. Méthodes chimique.....	27
2.2.2.1. Mesure du pH.....	28
2.2.2.2. Détermination des teneurs en EST, ESD et en MG.....	28
2.2.2.3. Détermination de la teneur en lactose.....	28
2.2.2.4. Détermination de la teneur en vitamine C .....	28
2.2.2.5. Détermination de la teneur en protéines.....	28
2.2.3. Préparation des échantillons.....	29
2.2.4. Méthodes électrophorétiques.....	30
2.2.4.1. Définition et principe générale.....	30
2.2.4.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	32
2.2.4.2.1. Conditions générales.....	32
2.2.4.2.2. Conduite de l'électrophorèse.....	32
2.2.4.2.3. PAGE en condition non dissociantes et non dénaturantes.....	32
2.2.4.2.4. PAGE en présence du SDS et du 2-ME.....	33
2.2.4.3. Détection des protéines dans le gel.....	35
2.2.5. Méthodes chromatographiques.....	36
2.2.5.1. Principe de la chromatographie de filtration sur gel.....	36
2.2.5.2. Conditions expérimentales.....	36
2.2.6. Traitement thermique.....	37
2.2.7. Isolement de la fraction protéose peptones totale.....	37

### 3. Résultats et discussion

3.1. Qualité physico-chimique du lait de chamelle collecté.....	39
3.1.1. Mesure du pH.....	39
3.1.2. Teneur en matière sèche.....	39
3.1.3. Teneur en matière grasse.....	40
3.1.4. Teneur en lactose.....	40
3.1.5. Teneur en vitamine C.....	41
3.1.6. Teneur en protéines totales .....	42
3.1.7. Teneur en protéines sériques. ....	42
3.1.8. Teneur en caséines.....	43
3.2. Isolement et caractérisation électrophorétique des protéines sériques totales.....	43
3.3. Isolement des séroprotéines par chromatographie .....	47

3.4. Dénaturation thermique des protéines sériques .....	49
3.4.1. Sensibilité au chauffage des protéines sériques totales.....	49
3.4.1.1. Taux de dénaturation thermique.....	49
3.4.1.2. Comportement électrophorétique.....	50
3.4.2. Sensibilité au chauffage des PPT.....	51
3.5. Isolement et caractérisation électrophorétiques de la fraction protéose	
Peptones totales cameline.....	54
3.5.1. Protocole d'isolement .....	54
3.5.2. Caractérisation électrophorétique .....	55
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>61</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>63</b>
<b>Annexes</b>	

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>aa</b>	Acide aminé
<b>ADNc</b>	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
<b><math>\alpha</math>-La</b>	$\alpha$ - Lactalbumine
<b><math>\alpha</math><sub>1</sub>/ <math>\alpha</math><sub>2</sub>- CN</b>	Caséine $\alpha$ <sub>1</sub> / $\alpha$ <sub>2</sub>
<b><math>\beta</math>-CN</b>	caséine- $\beta$
<b>K-CN</b>	Caséine-K
<b><math>\beta</math>-Lg</b>	$\beta$ -Lactoglobuline
<b>CDR</b>	« Complementary Determining Region »
<b>CWBP</b>	Protéine sérique cameline basique
<b>CN</b>	Caséines
<b>Da</b>	Dalton
<b>DO</b>	Densité optique
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>FPLC</b>	chromatographie liquide rapide des protéines
<b>GlyCAM-1</b>	Protéine murine d'adhésion cellulaire glycosylée-1
<b>HFPP</b>	Fraction hydrophobe des protéose peptones
<b>Igs</b>	Immunoglobulines
<b>kDa</b>	kilo dalton
<b>LABAB</b>	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
<b>LC</b>	Lait de chamelle
<b>LF</b>	Lactoferrine
<b>LP</b>	Lactoperoxydase
<b>LPS</b>	« Lysozyme Peroxydase System »
<b>LV</b>	Lait de vache
<b>LZ</b>	Lysozyme
<b>MGG</b>	Membrane du Globule Gras
<b>MM</b>	Masse moléculaire
<b>NPN</b>	Azote non protéique
<b>P/V</b>	Poids/volume
<b>PAGE</b>	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>PGRP</b>	Protéine de reconnaissance du peptidoglycane
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>pHi</b>	pH isoélectrique
<b>PP</b>	Protéose-peptones
<b>PP3</b>	Composant-3 des protéose-peptones
<b>PP5</b>	Composant-5 des protéose-peptones
<b>PP8F</b>	Composant -8 « rapide » des protéose-peptones
<b>PP8S</b>	Composant-8 « lent » des protéose-peptones
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>PS</b>	Protéines du lactosérum
<b>R</b>	Coefficient de corrélation
<b>SA</b>	Sérum albumine
<b>SDS</b>	Dodecyl sulfate de sodium
<b>STC</b>	Surnageant de thermocoagulation
<b>T %</b>	% d'acrylamide et de bis acrylamide dans un volume V de tampon
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TEMED</b>	N, N, N, N –tetramethyl-éthylène diamine.
<b>Tris</b>	Tris-hydroxy-methyl-amino-méthane.
<b>UDP</b>	Uridine-di phosphate
<b>WAP</b>	Protéine sérique acide

## LISTE DES FIGURES, TABLEAUX et ANNEXES

### FIGURES

		<b>Pages</b>
<b>Figure 01</b>	Organisation moléculaire de la micelle de caséine bovine.....	08
<b>Figure 02</b>	Comparaison des régions sensibles à la chymosine des CN-K cameline et bovine.....	09
<b>Figure 03</b>	Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -Lactalbumine .....	16
<b>Figure 04</b>	Alignement des séquences primaires des lactophorines camelines (A et B) et le PP3 bovin.....	23
<b>Figure 05</b>	Structure du PP3 du lait de vache.....	25
<b>Figure 06</b>	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al.</i> (1951).....	29
<b>Figure 07</b>	Etapes d'isolement des grands groupes des protéines camelines.....	31
<b>Figure 08</b>	Photographie d'une unité d'EPS (HOEFFER S260).....	33
<b>Figure 09</b>	Structure du SDS.....	33
<b>Figure 10</b>	Etapes suivies pour la réalisation de l'EPS sur gel de polyacrylamide.....	34
<b>Figure 11</b>	Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE SDS.....	33
<b>Figure 12</b>	Photographie d'une unité de chromatographie basse pression.....	36
<b>Figure 13</b>	Profil électrophorétique des protéines du lactosérum en PAGE native.....	46
<b>Figure 14</b>	Profil électrophorétique des protéines du lactosérum en PAGE-SDS.....	46
<b>Figure 15</b>	Chromatographie de permeation des protéines sériques camelines sur Sephacryl S200.....	49
<b>Figure 16</b>	Taux de dénaturation des protéines sériques après chauffage à 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 95°C/30mn.....	50
<b>Figure 17</b>	Electrophorègramme en PAGE native des protéines sériques camelines et bovines après traitement thermique (60, 70 et 80°C/30mn).....	51
<b>Figure 18</b>	Electrophorègramme en PAGE native et SDS des protéines sériques bovines après traitement thermique (90/10-20-30mn et 95°C/10-20-30-35-40-45mn 30mn).....	53
<b>Figure 19</b>	PAGE native et SDS des protéines sériques camelines après chauffage à (90/10-20-30mn et 95°C/10-20-30-35-40-45mn .....	54
<b>Figure 20</b>	Taux de denaturation thermique après chauffage à 90 et 95°C .....	55
<b>Figure 21</b>	Effet du sulfate d'ammonium et du TCA sur la précipitation des PP camelins.....	56
<b>Figure 22</b>	Profil électrophorétique en PAGE native des PP camelins.....	57
<b>Figure 23</b>	PAGE native des PPT après différents chauffages.....	58
<b>Figure 24</b>	PAGE SDS des PPT après différents chauffages.....	59
<b>Figure 25</b>	Structure primaire de la $\beta$ -CN des de vache et de chamelle.....	60

### TABLEAUX

<b>Tab. I</b>	Tableau synthétique des différents effets thérapeutiques étudiés sur le lait de chamelle.....	06
<b>Tab. II</b>	Caractéristiques physico-chimiques des caséines du lait camelin.....	10
<b>Tab. III</b>	Quelques exemples d'application des méthodes chromatographiques pour la séparation des caséines du lait de chamelle.....	11

<b>Tab. IV</b>	Caractéristiques physico chimiques des protéines sériques camelines.....	12
<b>Tab. V</b>	Quelques exemples d'application des méthodes chromatographiques pour la séparation des protéines sériques du lait de chamelle.....	13
<b>Tab. VI</b>	Tableau synthétique des différentes fonctions biologiques et technologiques du PP3 bovin.....	24
<b>Tab. VII</b>	Caractéristiques physico chimiques du PP3 camelin.....	24
<b>Tab. VIII</b>	Echantillons de lait de chamelle et de vache collectés pour l'étude.....	26
<b>Tab. IX</b>	Résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques des laits camelin collectés.....	40
<b>Tab. X</b>	Répartition de la fraction protéique dans les échantillons étudiés.....	43
<b>Tab. XI</b>	Taux moyens des différentes fractions protéiques dans les échantillons de lait camelin étudiés.....	44
<b>Tab. XII</b>	Comparaison des PM des protéines sériques camelines et bovines mesurés en PAGE SDS avec les PM rapportés par la littérature.....	47
<b>Tab. XIII</b>	Valeurs de PM des composants de la fraction PP cameline et bovine estimés par PAGE SDS.....	59

## ANNEXES

<b>Annexe 01</b>	Systematique des camelidés et distribution géographique des espèces : <i>C. dromedarius</i> et <i>C. bactrianus</i> dans le monde.
<b>Annexe 02</b>	Production du lait de chamelle dans le monde, données FAO (2009).
<b>Annexe 03</b>	Synthèse bibliographique sur le potentiel laitier des chameelles dans le monde.
<b>Annexe 04</b>	Protocole de détermination des teneurs en extrait sec totale (EST) et en extrait sec dégraissé (ESD).
<b>Annexe 05</b>	Protocole de détermination de la teneur en lactose par la méthode de la liqueur de Fehling.
<b>Annexe 06</b>	Protocole de détermination de la teneur en vitamine C par la méthode du 2-6-DPIP.
<b>Annexe 07</b>	Protocole de détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).
<b>Annexe 08</b>	Protocole d'électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native).
<b>Annexe 09</b>	Protocole d'électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence du SDS et du 2-mercaptoethanol (PAGE-SDS).

## Résumé

La présente étude se propose d'avoir une meilleure connaissance du lait de chamelle produit dans notre pays. A cet effet, 3 échantillons sont collectés dans les régions de Biskra, Ghardaïa et Ouargla. Les analyses physico-chimiques ont porté sur la mesure du pH, de l'extrait sec total et la détermination des teneurs en lactose, matière grasse, vitamine C ainsi que le contenu en différentes fractions protéiques (protéines totales, protéines sériques et caséines).

Les résultats de ces analyses montrent une certaine homogénéité dans la composition du lait de chamelle produit dans les régions étudiées, ainsi qu'une composition en nutriments de base similaire à celle du lait bovin. Le lait camelin se singularise, cependant, par une forte teneur en vitamine C (avec un taux moyen de 44,28 mg/l). L'apport en protéines de ce lait est non négligeable. Il est estimé en moyenne à 31 g/l, contre 29 g/l pour le lait bovin. Cette composante protéique se caractérise toutefois par une teneur relativement plus élevée en protéines sériques (7,36 g/l).

Les protéines sériques isolées sont caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en conditions natives et en présence de SDS et du  $\beta$ -mercapto-éthanol ; les électrophorogrammes ont révélé la présence de protéines homologues aux séroprotéines bovines majeures. Nous décelons sur les gels une variabilité génétique pour l' $\alpha$ -La et l'absence de la  $\beta$ -Lg, protéine majoritaire dans le sérum du lait de vache,

L'effet du traitement thermique suivi par PAGE montre des variations importantes selon l'espèce (bovin, camelin) considérée. Les changements dénaturants constatés augmentent avec l'élévation de la température du chauffage. Les protéines sériques camelines montrent une faible sensibilité à la thermodénaturation comparativement à leurs homologues bovines où un pourcentage de dénaturation de 63,78 % a été noté pour les séroprotéines camelines suite à un traitement de 95°C/30 mn, alors qu'il est de 86,27 % pour leurs homologues bovines.

L'isolement et la séparation des entités majeures de la fraction des protéines sériques a été réalisée en ayant recours à un protocole en une seule étape utilisant un gel de chromatographie en basse pression sur Sephacryl S200. Cette séparation a abouti à l'isolement de certaines protéines ( $\alpha$ -La, notamment) avec un haut degré de pureté. Les protéose-peptones totales ont été isolées par thermocoagulation, puis précipitées au TCA 12% et au sulfate d'ammonium. Leur comportement électrophorétique sur PAGE native a montré l'existence de bandes homologues aux entités bovines : PP3, PP5 et PP8. Le PP3 apparaît sur le gel de façon plus prononcée, confirmant ainsi sa teneur plus élevée dans le lait camelin.

**Mots clés :** Lait, bovin, camelin, protéines sériques, protéose-peptones ; analyses physico-chimiques ; comportement électrophorétique ; chromatographie de perméation ; traitements thermiques.

## **Abstract**

This study has as objective a better knowledge of camel milk produced in our country. To this end, 3 samples are collected in the South-Eastern areas (Biskra, Ghardaia and Ouargla). The physico-chemical analysis are carried on the measurement of the pH, and the determination of the contents of total dry extract, lactose, fat, vitamin C and the various proteic fractions (total proteins, whey proteins and caseins).

The results of these analyses showed homogeneity in the composition of camel milk produced in the studied areas. The physico-chemical composition was similar to that of cow milk, however, camel milk is characterized by a high content of vitamin C, a rate of 44,28 mg/l is noted.

The protein contribution of this milk is considerable. It is estimated on average at 31 g/l, against 29 g/l for cow milk. This fraction is characterized, however, by a high content of whey proteins whose average rate is estimated at 7,36 g/l.

The whey proteins are characterized by electrophoresis on polyacrylamide gel (PAGE) in native conditions and in presence of SDS and  $\beta$ -mercaptan. The electrophoregrams revealed the presence of whey proteins homologous to the major cow ones. We detected a genetic variability for  $\alpha$ -La.  $\beta$ -Lg, the most abundant protein in the cow milk, is absent in the analyzed camel milk.

The effect of heat treatment on whey proteins is evaluated by PAGE. Heat induced changes of whey proteins increased with increasing temperature and time of heating. The camel proteins showed a low sensitivity to the heat denaturation compared to their counterparts of cow milk. Then, 63,78 % of denaturation is noted for the camel proteins following a treatment of 95°C / 30 min, whereas, it was 86,27 % for the cow counterparts.

The separation of the major entities of whey proteins is realized by one step, using the low pressure chromatography on Sephacryl S200 gel. This method led to the isolation of  $\alpha$ -La with satisfactory degrees of purity. The proteose peptones are isolated by thermocoagulation and precipitated with the TCA 12% and ammonium sulphate. Their electrophoretic behavior on native-PAGE showed the presence of homologous bands to the cow entities (PP3, PP5 and PP8), with the predominance of PP3.

**Key words:** milk ; cow ; camel ; Whey proteins ; protéose peptone ; physico-chemical analysis ; electrophoretic behavior ; chromatography of permeation ; heat denaturation.

# *Introduction générale*



## **Introduction générale**

Le lait occupe une place importante dans la ration alimentaire de la population mondiale. En effet, ce produit, irremplaçable pour les nourrissons, est aussi vital pour les autres tranches d'âge, du fait de son apport important en nutriments de base (protides, lipides et glucides) et sa richesse en éléments minéraux, notamment le calcium et en vitamines.

Cette matière alimentaire, source de protéines animales relativement bon marché et ayant une bonne digestibilité connaît une hausse croissante de sa demande, soit en tant que produit commercialisé à l'état de lait frais ou transformé en produits dérivés (fromages, beurre, laits fermentés, crèmes glacées ...etc).

C'est pour ces raisons qu'un effort consistant est déployé de part le monde pour satisfaire ces besoins et répondre aux exigences de plus en plus affinées des consommateurs. Cet effort est surtout mené en amont de la production laitière, en améliorant les conditions internes et externes d'élevage, que ce soit pour la vache, qui domine la production mondiale, ou d'autres espèces laitières, non moins importantes et surtout connues pour leur rusticité et leur adaptation particulière à leur milieu d'implantation telles la chèvre, la brebis et la bufflonne.

Notre pays n'échappe pas à cette problématique d'ensemble d'autant que la production laitière est insuffisante (environ 40% des besoins) d'où le recours à l'importation de grosses quantités de lait sous forme de poudre pour combler ce déficit (d'environ 2 milliards de litres /an).

Parallèlement à cet effort à mener, il y a un regain d'intérêt ces dernières années pour le lait caprin, ovin et camelin. Des politiques incitatives d'élevage de ces espèces ont été entreprises par les pouvoirs publics et des petites unités de transformation commencent à voir le jour ça et là.

C'est dans ce cadre notamment qu'un recensement du cheptel camelin a été effectué et a débouché sur des résultats qui montrent que ce cheptel est loin d'être négligeable.

De plus, il est admis que le dromadaire est le seul herbivore qui est capable de valoriser les maigres pâturages des régions arides, car, contrairement aux autres animaux laitiers, il est capable dans des conditions de sécheresse extrêmes de procurer du lait de très bonne qualité nutritionnelle tout au long de l'année.

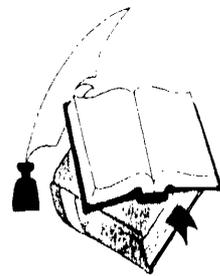
Le lait de chamelle renferme, comme le lait de vache, tous les nutriments essentiels. Il se singularise, cependant, par des teneurs élevées en certaines vitamines, particulièrement la vitamine C, ainsi que certains minéraux. Comme il possède une grande valeur biologique et des vertus « thérapeutiques » traditionnelles diverses que bon nombre de laboratoires de part le monde cherchent à vérifier scientifiquement.

Malgré cette remarquable carte de visite, le lait camelin est très peu utilisé dans notre pays pour fabriquer des produits dérivés, ce qui limite considérablement sa disponibilité dans l'espace et dans le temps.

Il est vrai par ailleurs que ses particularités physico-chimiques font que ce lait répond mal aux schémas technologiques de transformations appliqués sur le lait de vache. Cette donnée a incité plusieurs auteurs dans le monde à mener des études afin de mieux contourner ces difficultés et permettre aux populations vivants dans les régions arides et semi-arides de consommer sous forme de produit transformé cet aliment d'une valeur nutritionnelle reconnue.

C'est dans ce cadre que s'inscrit la thématique de recherche suivie depuis plus d'une décennie au laboratoire LABAB de l'UMMTO où notre contribution vise d'une part à mieux caractériser, sur les plans physico-chimique et biochimique, le lait camelin produit à travers 3 régions du sud de notre pays (Ouargla, Ghardaïa et Biskra) et, d'autre part, à évaluer, en prévisions des transformations technologiques évoquées plus haut, la sensibilité thermique des protéines sériques.

*Synthèse des données  
bibliographiques*



## 1. Synthèse des données bibliographiques

Le dromadaire est connu pour sa résistance aux conditions de sécheresse qui sévissent dans les régions arides et semi arides. Malgré son incontestable intérêt pour valoriser ces zones, le dromadaire reste une espèce relativement marginalisée.

### 1.1. Présentation du lait de chamelle

#### 1.1.1. Elevage du dromadaire et production laitière

Selon les statistiques de la FAO (2009), on estime à 20 millions la population mondiale de chameaux. La Somalie aurait le plus grand cheptel (ANONYME 2, 2009).

La population cameline recensée en Algérie est de 245 000 têtes (ANONYME 1, 2006), réparties avec un taux de 75% dans les régions steppiques et 25% dans le Sahara (BEN AISSA, 1989). Cette population est élevée surtout en mode semi nomade (ADAMOU, 2008).

Les dromadaires, contrairement aux autres animaux sont capables dans des conditions de sécheresse extrême et en manque de pâturage de produire du lait durant l'année et en grandes quantités (NARJISSE, 1989 ; ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; DELL ORTO, 2000 ; BAIDAR KHAN, 2001).

La contribution de la chamelle à la production laitière mondiale est assez limitée, mais elle est essentielle pour les populations des régions arides et semi arides (FAYE, 2003). Les chiffres parlent d'une production totale mondiale de lait de chamelle de 5,4 millions de tonnes. 1,3 millions de tonnes sont disponibles pour la consommation humaine, soit 500 fois moins que celle du lait de vache (ANONYME1, 2006). Le premier producteur mondial du lait de chamelle est la Somalie (850000 tonnes/an), suivie de l'Arabie saoudite (89000 tonnes/an) (ANONYME1, 2006) (annexe 02). En Algérie La production du lait de chamelle occupe 0,5% de la production laitière totale (estimée à 1.583.583 tonnes) durant la période allant de l'an 2000 à 2005 (ANONYME1, 2006).

Les données concernant le potentiel laitier de la chamelle sont assez nombreuses et présentent une grande variabilité (annexe 03). De faibles rendements sont rapportés par TEFERA (2001) en Ethiopie (2 litres /jour), alors que des taux de plus en plus importants sont publiés par ELLOUZE et KAMOUN (1989) (11 litres/jour), YAGIL *et al* (1994) (15 litres/jour) ainsi que HASHIM *et al* (2009) qui ont enregistré un rendement de 40 litres/jour dans les élevages intensifs.

Cette variation est la conséquence de plusieurs facteurs : la race, le stade de lactation (FAYE, 2003 ; ZELEKE, 2007), le statut sanitaire de la chamelle (FAYE, 2003) ainsi que la fréquence de la traite (BAIDAR KHAN et IQBAL, 2001). Les durées de lactation sont également variables selon l'alimentation : 8 à 12 mois dans les plaines désertiques, et 12 à 18 mois dans les plaines côtières où l'alimentation est abondante (RICHARD, 1984).

## 1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques

### 1.1.2.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait de dromadaire est d'une couleur blanc mat. Il a un goût assez doux, légèrement âpre et parfois salé (YAGIL, 1982 ; FARAH, 1996 ; PACHOLECK *et al*, 2000). À la traite et lors des transvasements, il forme une mousse abondante (KAMOUN, 1995).

Comparé au lait de vache, le lait de chamelle s'acidifie très peu. Il peut être conservé longtemps sans réfrigération (3 jours à 30°C et 2 semaines à 7°C) (HAROUN OMER et ELTINAY, 2009).

### 1.1.2.2. Caractéristiques physico-chimiques

La viscosité du lait de chamelle est plus faible que celle du lait de vache (KAMOUN, 1995). Son pH qui varie de 6,2 à 6,5 (FARAH, 1996) est plus bas que celui du lait de vache (6,8) ou du lait de femme (7,6) (YAGIL *et al*, 1994). Sa densité oscille entre 1,026 et 1,038 (KAMOUN, 1995), KHASKHELI *et al* (2005) ont rapporté des valeurs plus faibles (1,015).

### 1.1.3. Propriétés nutritionnelles

Le lait de chamelle présente des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base. Ce lait présente des taux de protéines variant de 2,5 à 4,5% (KHASKHELI *et al*, 2005 ; HADDADIN *et al*, 2007 ; HASHIM *et al*, 2009). Les teneurs en matière grasse dans ce lait sont estimées en moyenne à 3,15% (ELAMINE et WILCOX, 1992). La matière grasse cameline est caractérisée par la richesse en acides gras mono-insaturés à longue chaîne (acides stéarique et oléique) (KARRAY *et al*, 2005), avec une teneur de 27,6% (FAYE *et al*, 2008) ; et en acides gras essentiels (linoléique et linoléique) avec des teneurs respectives de 1,2% et 21,3% (KAMOUN, 1995). Le taux des acides gras saturés est estimé à 55% (DREIUCKER et VETTER, 2011) avec comme composants majeurs les AG à C14, C16 et C18 (EREIFEJ *et al*, 2011).

Cette matière grasse est aussi caractérisée par une grande proportion en triglycérides (FARAH, 1989 ; RUEGG et FARAH, 1991 ; KARRAY *et al*, 2006) estimée à 96% des lipides totaux (EREIFEJ *et al*, 2011), qui présentent un point de fusion très élevé, ce qui explique l'adaptation particulière du dromadaire au climat chaud du désert (KARRAY *et al*, 2004 ; 2005 ; EREIFEJ *et al*, 2011).

Le lactose constitue le sucre principal dans le lait. Sa concentration dans le lait camelin varie de 2,8 à 5,8% (YAGIL, 1982 ; FARAH, 1996).

Par ailleurs, les grandes concentrations en vitamines et en minéraux font de ce lait un véritable aliment à finalité diététique (HADDADIN *et al*, 2007). A ce propos le lait de chamelle présente de faibles teneurs en vitamines A et B<sub>2</sub> par rapport au lait de vache et de fortes teneurs en vitamines E et B<sub>1</sub> dans le colostrum (ZHANG *et al*, 2005) tandis qu'il présente un apport important en vitamine C (FARAH *et al*, 1992 ; HADDADIN *et al*, 2007).

Quant à sa composition minérale, des teneurs élevées en sodium et en potassium (HADDADIN *et al*, 2007) et surtout en phosphore (KONUSPAYEVA *et al*, 2008) ont été rapportées par la littérature.

Le lait de chamelle est très riche en oligoéléments (Cu, Fe, Zn, Ni, Mn) qui jouent un rôle important dans la structure des protéines du lait et affectent ainsi sa qualité nutritive, ces derniers peuvent agir aussi comme catalyseurs de certaines réactions biochimiques. Dans une étude comparative du contenu en oligoéléments des laits camelin et bovin, SAITMURATOVA *et al* (2001) ont révélé que les teneurs en fer et en zinc dans le lait de chamelle sont respectivement 53 et 20 fois supérieures que celles du lait de vache.

La composition en acides organiques du lait de dromadaire a été déterminée par HADDADIN *et al* (2007) qui ont noté une grande diversité dans la nature et la quantité de ces acides comparativement au lait de vache. Dans ce contexte, ces auteurs ont signalé le rôle que pourraient jouer les acides acétique et propionique dans la conservation et la stabilité de ce lait sous les conditions climatiques du désert. La valeur nutritionnelle directe de ce lait est attribuée à la teneur élevée en acide orotique (76,1 mg/l) qui jouerait un rôle dans la réduction du risque des maladies cardiovasculaires (KORYCKA *et al*, 1979).

#### **1.1.4. Propriétés thérapeutiques**

On prête au lait de chamelle bien des vertus, mais les confirmations scientifiques restent à mettre en œuvre dans bien des cas. Traditionnellement le lait de chamelle est utilisé dans la prévention et le traitement de plusieurs maladies (cirrhoses du foie, maladies parasitaires, diarrhées virales, tuberculose...).

Les allégations santé de ce lait, peuvent être attribuées à certains de ses composants (richesse en acides gras insaturés, acides aminés essentiels, vitamine C et en protéines à activité antibactérienne puissante) (KONUSPAYEVA *et al*, 2004)).

Le tableau (I) résume les différentes études entreprises sur les effets thérapeutiques du lait de chamelle.

#### **1.1.5. Aptitudes technologiques du lait de dromadaire**

La transformation en beurre ou en fromage constitue un moyen classique de conservation du lait. Cette forme de stockage permet de reporter dans l'espace et dans le temps la consommation du lait (PACHOLECK *et al*, 2000). Dans ce cadre, la transformation du lait de chamelle est réputée difficile au vue de ses particularités :

- comme le colostrum, le lait de chamelle contient des facteurs antimicrobiens en grandes quantités ce qui rend difficile son acidification, même après thermisation (KAMOUN, 1995 ; ELAGAMY, 2000 ; ATTIA *et al*, 2001).

- la faible teneur en extrait sec (KAMOUN et RAMET, 1989 ; KAMOUN, 1995), particulièrement en caséines (*K*-CN) ainsi que la grande taille des micelles de caséines (ATTIA *et al*, 2000) alliée à la pauvreté du lait en calcium, ne rendent la coagulation possible qu'après l'ajout de grandes quantités de présure.

- la matière grasse est difficilement séparée par écrémage à cause de la petite taille des globules gras (KAMOUN et RAMET, 1989 ; FARAH et RUEGG, 1991 ; KAMOUN, 1995 ; MEHAIA, 1995).

Cependant ces difficultés ont été contournées par des adaptations technologiques. En effet, des études ont rapporté l'existence de produits laitiers divers : fromages (RAMET, 2001 ; MEHAIA, 2006 ; EL-ZUBEIR et JABREEL, 2008), lait fermenté (ISHII et SAMEJIMA, 2006 ; FARAH *et al*, 1990), crèmes glacées (HAMMAD, 1992), beurre (FARAH *et al*, 1989 ; KAMOUN, 1995) et yaourt (HASHIM *et al*, 2009).

**Tableau I : Tableau synthétique des différents effets thérapeutiques étudiés dans le cas du lait de chamelle.**

<b>Aspect étudié</b>	<b>Effet observé et interprétations</b>	<b>Auteurs</b>
Diabète	Hypoglycémie (Teneurs élevées d'insuline dans le lait).	ZAGORSKY <i>et al</i> (1998) AGRAWAL <i>et al</i> (2003 ; 2005a ; 2005b) WERNERY <i>et al</i> (2006)
Complications du diabète	Diminution du stress oxydatif et prévention des néphropathologies (Teneurs élevées en antioxydants)	AGRAWAL <i>et al</i> (2009) EL-SAID EL-SHERBINI <i>et al</i> (2010) AMAL HASSAN et BAYOUMI (2010)
Allergies au lait	Effet hypoallergique (absence de la $\beta$ -Lg et présence d'une caséine $\alpha$ S différente de la caséine bovine)	SHABO <i>et al</i> (2005)
Infections	Effet anti-infectieux (activité anti-bactérienne et anti- virale)	MAL <i>et al</i> (2006) MONA <i>et al</i> (2010)
Tumeurs	Effet anti- tumoral (contrôle des processus tumoraux par stimulation de la défense immunitaire)	MAGJEED <i>et al</i> (2005) QUITA SALWA et KURDI LINA (2005)
Toxicité aux métaux lourds	Effet protecteur contre la toxicité à l'aluminium et au cadmium	AL-HASHEM (2009) AL HASHEM <i>et al</i> (2009)

## 1.2. Présentation du système protéique du lait de chamelle

La distribution des protéines laitières diffère d'une espèce animale à une autre. Cette distribution est particulière dans le lait de dromadaire, car certaines protéines importantes du lait bovin telles que la  $\beta$ -lactoglobuline ne sont pas retrouvées dans le lait camelin (OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ; MERIN *et al*, 2001). Par contre, d'autres protéines lui sont spécifiques et ne sont pas détectées dans le lait de référence. Cette particularité pourrait être le résultat d'adaptations aux conditions environnementales qui caractérisent l'habitat naturel du dromadaire (KAPPELER *et al*, 2003).

### 1.2.1. Les caséines

Les caséines sont définies comme des phosphoprotéines qui précipitent à partir du lait cru par acidification à pH 4,6 à 20°C pour le lait bovin (FARRELL *et al*, 2004) et à pH 4,3 pour le lait camelin (WANGOH *et al*, 1998).

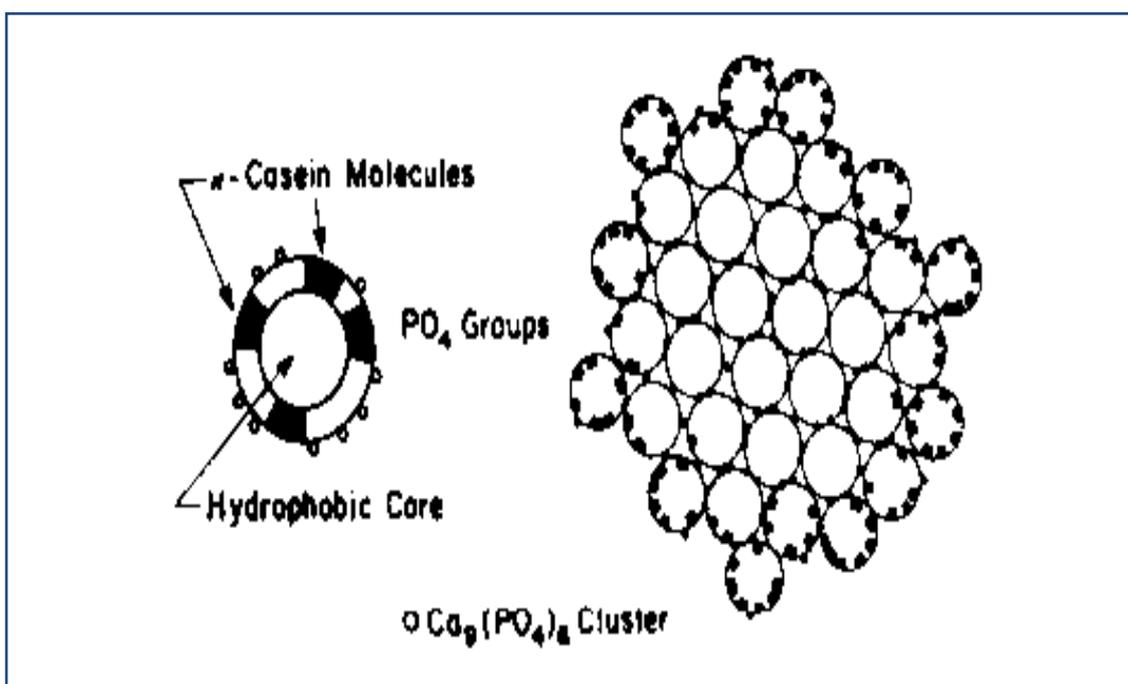
La fraction caséinique du lait de dromadaire a été caractérisée (tableau II), ainsi des homologues aux caséines  $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$  et  $K$  bovines ont été isolés et purifiés (FARAH et FARAH-RIESEN, 1985 ; FARAH et RUEGG, 1989 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ; KAPPELER *et al*, 1998 ; KHEROUATOU *et al*, 2003 ; ALIM *et al*, 2005 ; KHEROUATOU et ATTIA, 2008). Leur composition en acides aminés ainsi que leurs séquences primaires ont été déterminées (FARAH et RUEGG, 1989 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ; KAPPELER *et al*, 1998).

Les caséines représentent la fraction protéique la plus abondante dans le lait camelin à savoir 73 à 81% des protéines totales, contre 83% dans le lait bovin (MEHAIA *et al*, 1995). Leur composition en acides aminés est similaire à celle de leurs homologues bovins. Elle est caractérisée cependant par un taux faible en glycine et en cystéine (FARAH et RUEGG, 1989 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997).

La littérature a révélé une certaine variabilité dans les taux des différentes fractions caséiniques. La caséine  $\beta$  est la plus abondante avec un taux de 65%, alors que la  $K$ -CN est présente en très faible quantité 3,5% contre 13% dans le lait de vache (KAPPELER *et al*, 1998 ; AL HADJ *et al*, 2010), Les autres caséines  $\alpha$ S1 et  $\alpha$ S2, elles sont présentes à des taux respectifs de 38% et 21% selon OCHIRKHUYAG *et al* (1997) et à des proportions de 22% et 9,5% selon KAPPELER *et al* (1998).

#### 1.2.1.1. La structure micellaire des caséines

Les caséines du lait camelin présentent une organisation micellaire similaire à celles du lait de vache (FARAH et RUEGG, 1989 ; ATTIA *et al*, 2000 ; KHEROUATOU *et al*, 2001). Le modèle le plus adopté pour cette organisation est celui de SCHMIDT (1982) (figure 01), qui présente les micelles sous forme de complexes moléculaires appelés submicelles unies par du phosphate de calcium colloïdal  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  (PAYENS, 1982). Dans ce modèle, la  $K$ -CN se trouve en surface avec son extrémité C-terminale et agit comme interface entre les caséines hydrophobes (à l'intérieur de la micelle) et le milieu aqueux, gardant ainsi les micelles en suspension (LEONIL *et al*, 2007).



**Figure 01 : Organisation moléculaire de la micelle de caséine bovine (Modèle de SCHMIDT (1982) (RUETTIMANN et LADISCH, 1987)**

Les travaux de FARAH et RUEGG (1989) ; ATTIA *et al* (2000) et de KHEROUATOU *et al* (2001) ont rapporté que le diamètre moyen des micelles de caséines camelines (260-300 nm) est nettement supérieur à celui mesuré dans le lait bovin qui est de 100 à 140 nm (BUCHHEIM *et al*, 1989).

#### 1.2.1.2. Distribution minérale dans les micelles

La fraction micellaire des caséines camelines présente relativement de faibles proportions en caséines et un haut contenu en minéraux et en citrate qui est estimé à 98 mg/g de caséines (ATTIA *et al*, 2000) contre 67 mg/g pour les micelles d'origine bovine. Cette différence est surtout prononcée au niveau du taux de citrate (30 mg/g contre 4 mg/g) (PIERRE *et al*, 1995).

Comme pour les caséines du lait bovin, ces minéraux assurent les liaisons intra et inter submicellaires (HOLT, 1998 ; BAK *et al*, 2001).

Le taux de calcium micellaire dans le lait de dromadaire est similaire à son équivalent bovin. Il est estimé à environ 66,6% (FARAH et RUEGG, 1989 ; KHEROUATOU *et al*, 2003). Toutefois le taux de Magnésium, du phosphore et du citrate se trouvent en quantités plus importantes dans la phase colloïdale du lait de chamelle (2/3, 2/3 et 1/3). Dans le lait de vache les proportions sont de 2/5, 3/5 et 1/10 (ATTIA *et al*, 2000).

### 1.2.1.3. Caractéristiques structurales des caséines

La caséine est sécrétée sous forme immature avec un peptide signal de 15 acides aminés la conduisant à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Les séquences de ce peptide signal sont hautement conservées entre les caséines  $\alpha S_1$ ,  $\alpha S_2$  et  $\beta$  bovines et camelines (KAPPELER *et al*, 1998 ; FARRELL *et al*, 2004).

KAPPELER *et al* (1998) ont montré l'existence d'un polymorphisme génétique des caséines camelines. La caséine  $\alpha S_1$  et la caséine  $\beta$  se présentent sous forme de deux variants (A et B) (BEG *et al*, 1986 ; KAPPELER *et al*, 1998).

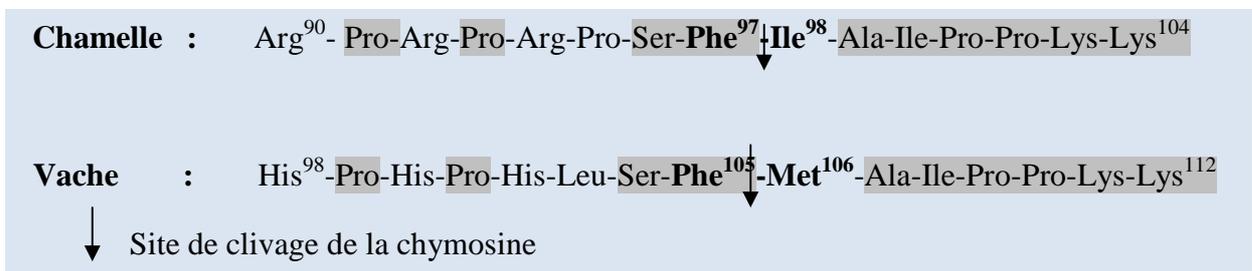
La comparaison des séquences primaires des caséines camelines et bovines montre de faibles différences structurales. Cependant,  $\alpha S_1$ -CN exprime un faible pourcentage de similitude (39%), alors qu'il est de 56% pour  $\alpha S_2$ -CN et *K*-CN et 64% pour la  $\beta$ -CN (KAPPELER *et al*, 1998).

Le nombre des acides aminés constituant ces protéines est de 207 pour les caséines  $\alpha S_1$  et  $\beta$ , 178 aa pour  $\alpha S_2$  et 162 aa pour *K*-CN. La distribution des acides aminés apolaires et chargés des caséines  $\alpha S_1$ ,  $\alpha S_2$  et  $\beta$  camelines est similaire à celle des caséines bovines où les hélices- $\alpha$  prédominent surtout pour  $\alpha S_2$ -CN, ce qui explique son caractère hydrophile par rapport aux autres caséines (KAPPELER *et al*, 1998).

Quant à la caséine-*K*, sa structure est caractérisée par la conservation des résidus Pro. Cette protéine se distingue néanmoins par la substitution d'un résidu Pro<sup>95</sup> à la place de Leu<sup>103</sup> qui semble, selon KAPPELER *et al* (1998) contribuer à la stabilisation de sa conformation.

Selon KAPPELER *et al* (1998), l'action de la chymosine sur la *K*-CN cameline est facilitée suite à la substitution des résidus His dans la structure bovine par des résidus Arg, qui sont plus basiques et flexibles (figure 02).

Les caséines camelines sont moins phosphorylées que leurs équivalentes bovines. KAPPELER *et al* (1998) ont noté 6 sites de phosphorylation sur  $\alpha S_1$ -CN ; 9 résidus phosphoseryls dans  $\alpha S_2$ -CN ; 4 pour la  $\beta$ -CN et 2 sites pour la *K*-CN. Concernant la glycosylation, ce caractère ne se retrouve que dans le cas de la *K*-CN ; 5 sites ont été identifiés par ces auteurs sur les résidus Thr (105, 109, 149, 152 et 153).



**Figure 02 : Comparaison des régions sensibles à la chymosine des caséines-*K* cameline et bovine (KAPPELER *et al*, 1998).**

**Tableau II : Caractéristiques physico chimiques des caséines du lait de chamelle, comparées à celles du lait de vache selon KAPPELER *et al* (1998).**

Espèce	Protéine	Taux (g/Kg des CNT)	MM calculée (kDa)	pHi	Résidus d'aa	Modifications post traductionnelles	Homologie avec caséines bovines (%)
<i>Camelus dromedarius</i>	$\alpha$ S <sub>1</sub> -CN	220	24,27	4,41	207	6 Ser- P	39
	$\alpha$ S <sub>2</sub> -CN	95	21,26	4,58	178	9 Ser-P	56
	$\beta$ - CN	650	24,65	4,76	217	3 Ser- P	64
	K- CN	35	18,25	4,11	162	1 Ser- P ; 10 Thr-NANA	56
<i>Bos taurus</i>	$\alpha$ S <sub>1</sub> -CN	nd	22,97	4,26	199	8 Ser -P	100
	$\alpha$ S <sub>2</sub> -CN	nd	24,34	4,78	207	11 Ser- P	100
	$\beta$ - CN	nd	23,58	4,49	209	6 Ser- P	100
	K- CN	nd	18,97	3,97	169	1 Ser- P ; 12 Thr-NANA	100

CNT : caséines totales ; NANA : acide N-acetyl neuraminique ; P : phosphorylation ; nd : non déterminé.

#### 1.2.1.4. Isolement et intérêt des caséines

Les caséines présentent un grand intérêt biologique. Leur étude suscite le développement de protocoles adéquats pour leur purification. Les plus utilisés, sont la précipitation à l'urée et les méthodes chromatographiques. Plusieurs auteurs ont consacré leurs études à l'isolement des caséines du lait de chamelle. Les méthodes utilisées par certains d'entre eux sont résumées dans le tableau (III).

A côté de leur intérêt technologique, particulièrement dans la fabrication des fromages, les caséines solubilisent et transportent de grandes quantités de calcium, et contribuent ainsi à la minéralisation des tissus calcifiés (MAUBOIS et LEONIL, 1989 ; BAK *et al*, 2001 ; JAUHAINEN et KORPELA, 2007).

D'un autre côté, les caséines peuvent agir comme des molécules chaperonnes qui préviennent l'agrégation des séroprotéines (BAK *et al*, 2001). Cette activité semble être plus importante dans la  $\beta$ -CN bovine que dans l'analogue camelin (BARZEGAR *et al*, 2008).

Enfin, l'hydrolyse enzymatique des caséines libère des fragments peptidiques à différentes activités biologiques (anti-hypertensive, anti-thrombotique, anti-cariogènes) (MAUBOIS et LEONIL, 1989 ; ANDREWS *et al*, 2006 ; JAUHAINEN et KORPELA, 2007).

**Tableau III : Quelques exemples de méthodes appliquées pour l'isolement des caséines dans le lait de chamelle.**

Auteur	Méthode	Protéine
FARAH et FARAH-RIESEN (1985)	Précipitation à l'urée 3,3M	Séparation $\alpha$ S-CN et $\beta$ -CN
OCHIRKHUYAG <i>et al</i> (1997)	Chromatographie échange d'anions sur QAE-sepharose Elution : gradient 2 tampons : A (0.02M imidazole pH 7+3,3 M urée + 0,3% mercapto éthanol.) B (0.02M imidazole pH 7+3,3 M urée + 0,3% mercapto éthanol+1M NaCl)	Séparation $\alpha$ S <sub>1</sub> -CN et $\alpha$ S <sub>2</sub> -CN tandis que $\beta$ -CN et K-CN sont co-éluées
KAPPELER <i>et al</i> (1998)	Précipitation à l'urée 10M	Séparation de l' $\alpha$ S-CN et K-CN
	Précipitation au sulfate d'ammonium	Séparation de la $\beta$ -CN
	HPLC –RP sur C18 Elution : solvant A : TFA 1‰ dans H <sub>2</sub> O. Solvant B : TFA 1‰ dans acetonitrile.	Purification des fractions individuelles
ALIM <i>et al</i> (2005)	HPLC –RP sur C4 Elution : solvant A : TFA 1‰ dans H <sub>2</sub> O. Solvant B : TFA 1‰ dans acetonitrile.	Séparation des caséines $\alpha$ S <sub>1</sub> -CN, $\alpha$ S <sub>2</sub> -CN et $\beta$ -CN

HPLC-RP : chromatographie liquide haute performance phase inverse ; TFA : acide trifluoroacétique.

### 1.2.2. Les protéines du lactosérum

Le terme protéines sériques désigne les protéines du lait qui restent solubles après précipitation des caséines à pH isoélectrique (FARRELL *et al*, 2004). Ce sont des protéines globulaires diversifiées en structure et en propriétés (DE WIT et KLARENBECK, 1984). Les entités protéiques les plus représentatives de cette fraction sont la  $\beta$ -lactoglobuline, l' $\alpha$ -lactalbumine, l'albumine sérique, les immunoglobulines, les protéose peptones et les protéines mineures (lysozyme, lactoperoxydase, lactoferrine) (FARRELL *et al*, 2004).

Le tableau (IV) résume les principales caractéristiques physico-chimiques des séroprotéines du lait de dromadaire.

**Tableau IV : Tableau synthétique des principales caractéristiques physico-chimiques des protéines sériques camelines et bovines.**

Protéines	Lait de chamelle				Lait de vache				Homologie (%)
	Taux	MM (kDa)	pHi	Résidus d'aa	Taux	MM (kDa)	pHi	Résidus d'aa	
$\alpha$ -La	2,2 <sup>a</sup> mg/ml	14,6 <sup>b</sup>	5,1 A 5,3 B	123	0,6-1g/l	14	4,2 <sup>i</sup> - 4,5	123	68%
SA	8,5 mg/ml <sup>a</sup>	69,6 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	0,4mg/l	66,2	4,3- 4,9	582	n.d.
lactoferrine	220 mg/l <sup>e</sup>	75,25 <sup>e</sup>	8,14 <sup>e</sup>	689 <sup>e</sup>	140 <sup>f</sup> mg/ml	76,14 <sup>i</sup>	8,18 <sup>i</sup>	689 <sup>i</sup>	74,9 <sup>i</sup> %
lysozyme	15 <sup>d</sup> µg/100 ml	14,4 <sup>d</sup>	n.d.	n.d.	7µg/100 ml <sup>d</sup>	14,4	10,2 <sup>g</sup>	129	n.d.
lactoperoxydase	n.d.	78 <sup>d</sup>	8,63	612 <sup>i</sup>	30mg/l <sup>i</sup>	69,56 <sup>i</sup>	7,9 <sup>i</sup>	612 <sup>i</sup>	94,9 <sup>i</sup> %
WAP	157 mg/l <sup>h</sup>	12,56 <sup>i</sup>	4,70 <sup>i</sup>	117 <sup>i</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CWBP	n.d.	20 <sup>j</sup>	Basique	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

a : EL-HATMI *et al* (2006b) ; b : BEG *et al* (1987) ; c : CONTI *et al* (1985) ; d : ELAGAMY (1996) ;  
e : KAPPELER *et al* (1999a) ; f : BEG *et al* (1984 ; 1986) ; g : BENKERROUM (2008) ;  
h : WERNERY (2007) ; i : KAPPELER *et al* (1998) ; j : OCHIRKHUYAG *et al* (1998).

#### 1.2.2.1. Isolement et intérêt des protéines sériques

Les protéines du sérum du lait présentent d'excellentes propriétés nutritionnelles ainsi que plusieurs propriétés fonctionnelles, les rendant meilleurs candidats pour le développement de nouveaux produits.

Dans ce cadre, plusieurs études se sont intéressées au fractionnement et à la purification des protéines du lactosérum par l'usage de différentes méthodes analytiques (tableau V).

La bibliographie a rapporté que le lait de chamelle présente une forte activité antimicrobienne. Cette propriété est attribuée aux protéines sériques dites «protectives» (lactoferrine, lactoperoxydase, lysozyme, immunoglobulines et la PGRP) (KAPPELER *et al*, 1999a ; ELAGAMY, 2000). Ces protéines promettent d'être le meilleur choix dans la conservation des produits alimentaires et cosmétiques (LEVIEUX *et al*, 2006).

**Tableau V : Quelques exemples d'application des méthodes chromatographiques pour la séparation des protéines sériques du lait de chamelle.**

Protéines	Support chromatographique	Conditions d'élution	Auteurs
α-lactalbumine	Sephadex G100	Acétate de Na 0,1M, pH 4,8	BEG <i>et al</i> (1984 ; 1985)
	CM-cellulose	Acétate de Na 20mM, pH 4,0	
	HPLC-RP C18	Gradient linéaire d'acetonitrile 0,1% dans TFA.	
lysozyme	Héparine –sepharose 4B	Tampon véronal-HCl 5mM, pH7, 4+NaCl 0,05-1M	DUHAIMAN (1988)
	Sephadex G75	Acétate de Na 0,1M ; pH 6,5	
	hydroxyapatite	Gradient tampon phosphate de K	
Lactoferrine + CWBP	HS-poros (20μ) (échange de cations)	A : 25mM tris-HCl, pH 7,5+5mM CaCl <sub>2</sub> B : (en gradient 0-80%) 25mM tris-HCl, pH 7,5+5mM CaCl <sub>2</sub> +1M NaCl	OCHIRKHUYAG <i>et al</i> (1998)
Fractionnement des protéines sériques	HS-poros (20μ) (échange de cations)	A : 25mM tris-HCl, pH 8,5+5mM CaCl <sub>2</sub> B : (en gradient 0-30%) 25mM tris-HCl, pH 8,5+5mM CaCl <sub>2</sub> +1M NaCl	

Lactoferrine	Héparine –sepharose Hitrap	Phosphate de Na 10mM+ gradient NaCl	KAPPELER <i>et al</i> (1999a)
	HPLC C18	Gradient des solvants : A : 0,1% TFA-H <sub>2</sub> O B : 0,1% TFA dans acetonitrile	
Fractionnement des protéines sériques	HPLC (exclusion stérique) GF 250 et GF 450	Phosphate de Na, pH 7 + 200 mM NaCl	MERIN <i>et al</i> (2001)
IgG et CSA	Sephadex G200	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4	EL- HATMI <i>et al</i> (2006b)
	Q-sepharose FPLC	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4+ NaCl 0-0,75M	
α-lactalbumine	Sephadex G100	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4	EL- HATMI <i>et al</i> (2006b)
	Q-sepharose	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4+ NaCl 0-0,5M	
	Mono Q HR -HPLC	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,6+ NaCl 0-0,1M	
Lactoferrine	Sephadex G200	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4	EL- HATMI <i>et al</i> (2006b) KONUSPAYEVA <i>et al</i> (2007)
	Héparine Hitrap - HPLC	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4+ NaCl 0-3M	
Fractionnement des protéines sériques	Echange d'anions- FPLC protein PaK SP-5PW	Imidazole 0,01M- HCl, pH 7+ NaCl 0-1M.	EL- HATMI <i>et al</i> (2007)
Igs	Sephadex G200	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4	KONUSPAYEVA <i>et al</i> (2007)
	Q-sepharose FPLC	Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4+ NaCl 0-0,75M	

HPLC-RP : chromatographie liquide haute performance phase inverse ; TFA : acide trifluoroacétique.

### **1.2.2.2. Caractéristiques des séroprotéines majeures**

#### **1.2.2.2.1. $\alpha$ -lactalbumine**

Cette protéine est détectée dans le lait de plusieurs mammifères. Elle possède une fonction biologique bien définie dans la glande mammaire, en interagissant avec la  $\beta$  (1,4) galactosyl transférase pour former le complexe lactose synthase (BEG *et al*, 1985 ; FARRELL *et al*, 2004). Certaines formes de l' $\alpha$ -La peuvent induire l'apoptose dans les cellules tumorales. Des peptides issus de son hydrolyse enzymatique possèdent des propriétés bactéricides (PERMYAKOV et BERLINER, 2000).

L' $\alpha$ -La est aussi identifiée comme une métalloprotéine transportant le calcium (HIROAKA, 1980). Cette propriété est due à la présence de 4 résidus d'acide aspartique (BEG, 1986), dont les groupements carboxyle permettent le transport des ions  $Ca^{++}$  et de métaux divalents tels que le  $Zn^{++}$  (PERMYKOV et BERLINER, 2000). Dans ce contexte, CHRYSINA *et al* (2000) ont noté la nécessité d'avoir du  $Ca^{++}$  pour le repliement et la formation des ponts disulfure dans la protéine native.

L' $\alpha$ -La est riche en acides aminés essentiels (Trp, Phe, Tyr, Leu, Ile, Thr, Met, Cys et Val) qui représentent un taux de 63,2% de l'ensemble des acides aminés qui la constituent (FARRELL *et al*, 2004). Cette propriété nutritionnelle ainsi que les similitudes de structure avec l' $\alpha$ -La humaine (70%) rendent cette protéine idéale pour la préparation de laits maternisés et d'autres produits infantiles.

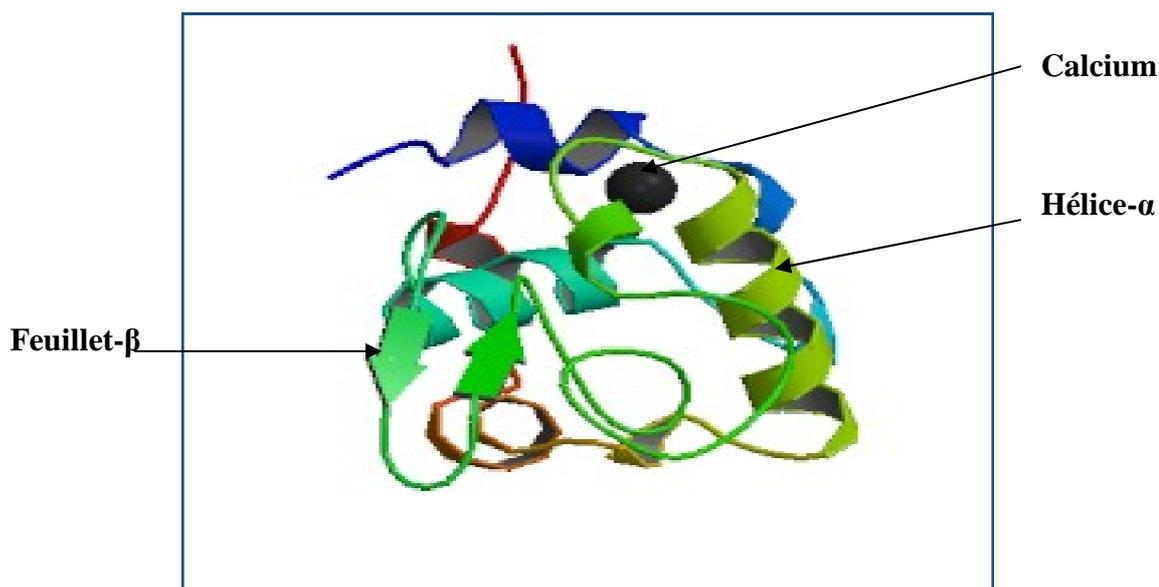
Dans le lait de chamelle, l' $\alpha$ -La est présente à des taux allant de 1,62 mg/ml (LEVIEUX *et al*, 2006) jusqu'à 3,19 mg/ml (EL-HATMI *et al*, 2006b).

BEG *et al* (1985) ont publié la séquence primaire de l' $\alpha$ -La du lait de dromadaire. Comme l' $\alpha$ -La bovine ainsi que celle de plusieurs espèces animales, l' $\alpha$ -La cameline est constituée de 123 acides aminés avec 8 résidus cystéine formant 4 ponts disulfure.

L'analyse des séquences primaires de ces deux protéines bovine et cameline révèle des différences dans 39 résidus, présentant ainsi un taux de similitude séquentielle de 68,29%. Sur le plan structural, l' $\alpha$ -La est apparentée au lysozyme, ce qui démontre l'origine ancestrale commune de ces deux protéines (BEG *et al*, 1985 ; MCKENZIE et WHITE, 1991 ; TING et JERNIGAN, 2002).

L' $\alpha$ -La bovine est présente sous forme de 2 variants génétiques A et B. Le variant A contient un résidu Glu en position 10 substitué par le résidu Arg dans le variant B (FARRELL *et al*, 2004). De même, pour l' $\alpha$ -La cameline, 2 variants génétiques ont été détectés et qui diffèrent dans leurs points isoélectriques estimés respectivement à 5,1 et 5,2, ainsi que dans leurs extrémités N-terminales (BEG *et al*, 1985 ; CONTI *et al*, 1985 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998).

Un faible pourcentage (5%) d' $\alpha$ -La est glycosylée dans le lait bovin (CANTISANI *et al*, 1990). Cependant, la forme glycosylée de cette protéine n'a pas été détectée dans le lait de chamelle (BEG *et al*, 1985 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998).



**Figure 03 : Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ -Lactalbumine, liée au Ca déterminée par PIKE *et al* (1996).**

#### 1.2.2.2.2. L'albumine sérique

C'est une protéine d'origine sanguine. C'est la seule protéine du lactosérum qui n'est pas synthétisée par la glande mammaire. Elle passe dans le lait par diffusion passive. Cette protéine est connue particulièrement pour son rôle transporteur des acides gras insolubles dans le sang. Elle constitue un taux de 1,5% des protéines totales du lait et 8% des protéines sériques (FARRELL *et al*, 2004).

L'albumine sérique cameline (CSA) constitue la protéine sérique majeure dans le lait de chamelle (MERIN *et al*, 2001 ; EL-HATMI *et al*, 2007). Sa concentration est estimée à 9,2 g/l par EL-HATMI *et al* (2007), alors que LEVIEUX *et al* (2006) ont rapporté un taux de 1,62 g/l.

L'albumine sérique représente la plus longue chaîne peptidique de toutes les protéines sériques. Sa séquence est constituée de 583 résidus d'acides aminés, avec un PM de 66 339 (FARRELL *et al*, 2004). Le peptide signal de cette protéine est composé de 189 acides aminés. Sa séquence primaire révèle une identité de 76% avec l'albumine sérique humaine.

Cette protéine est caractérisée par un haut niveau d'organisation, Les données cristallographiques par rayons X ont montré que sa structure est constituée de 3 domaines stabilisés par un réseau de 17 ponts disulfure intra moléculaire avec un groupement thiol libre. Sa structure secondaire est constituée principalement de 76% d'hélices- $\alpha$  (CARTER et HO, 1994).

### **1.2.2.2.3. La $\beta$ - lactoglobuline**

La  $\beta$ -Lg est la protéine la plus abondante dans le sérum du lait de plusieurs espèces animales (DE WIT et KLARENBECK, 1984 ; FARRELL *et al*, 2004) ; Elle appartient à la famille des lipocalines (KONTOPIDIS *et al*, 2002) et présente une homologie structurale avec la protéine plasmatique transporteuse du rétinol (RBP: rétinol binding protein). La  $\beta$ -Lg possède la capacité de fixer des molécules hydrophobes et amphiphiles (hexane, acide palmitique, vitamine D) (NARAYAN et BERLINER, 1997 ; SAWYER *et al*, 1998).

En plus de son rôle dans le transport des molécules hydrophobes et des métaux, la  $\beta$ -Lg semble avoir un effet mitogénique sur la culture des hybridomes (MOULTI-MATI *et al*, 1991).

La présence de la  $\beta$ -Lg dans le lait de chamelle est controversée. Certains auteurs FARAH (1986) ; ELAGAMY (2000) et ALOUI-LOMBARKIA *et al* (2007) ont signalé sa présence à une faible quantité. D'autres mentionnent son absence dans ce lait (OCHIRKHUYAG *et al*, 1998 ; RESTANI *et al*, 1999 ; MERIN *et al*, 2001 ; LEVIEUX *et al*, 2006 ; EL-HATMI *et al*, 2006b ; 2007).

L'absence de la  $\beta$ -Lg dans le lait de chamelle a été confirmée par KAPPELER *et al* (2003) qui n'ont pas détecté les gènes codant pour cette protéine dans la glande mammaire de la chamelle. Plus récemment, YOUCEF *et al* (2009) en se basant sur des techniques immunologiques n'ont pas mis en évidence de réactions croisées entre le sérum du lait de chamelle et les anticorps anti-  $\beta$ -Lg.

L'absence de cette protéine dans le lait de chamelle amplifie son intérêt. Ce lait par cette spécificité se rapproche du lait humain, et pourrait, donc, être le meilleur substitut au lait de femme pour les nourrissons.

### **1.2.2.3. Les séroprotéines mineures**

#### **1.2.2.3.1. La lactoferrine**

La lactoferrine c'est une protéine d'origine mammaire, mais qui se trouve également en grande quantité dans les liquides biologiques (larmes, salive, liquide séminal, urines..). Elle est particulièrement abondante dans le colostrum (KAPPELER *et al*, 1999a ; TSUDA et SEKINE, 2000 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2007).

Cette protéine appartient à la famille des transferrines qui possèdent comme propriété commune le transport de 2 cations métalliques, préférablement l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) (KAPPELER *et al*, 1999a ; TSUDA et SEKINE, 2000).

La concentration de la lactoferrine est plus élevée dans le lait camelin. Son taux est 30 à 100 fois supérieur que dans le lait bovin (KONUSPAYEVA *et al*, 2004 ; 2007). Une concentration de 0,7g/l a été rapportée par EL-HATMI *et al* (2006b ; 2007). Tandis que AL-MAJALI *et al* (2007) ont noté des taux allant de 20 à 2100  $\mu$ g/ml.

La lactoferrine est connue pour être une protéine multifonctionnelle. En effet, différentes fonctions biologiques lui sont attribuées : antimicrobiennes conférées par la lactoferrine, un peptide basique de 25 acides aminés (HOEK *et al*, 1997 ; VOGEL *et al*, 1999) ; antivirales ; anti-tumorales (ZHANG *et al*, 2010) et antifongiques (KAPPELER *et al*, 1999a ; KONUSPAYEVA *et al*, 2004 ; STELWAGEN *et al*, 2009). L'activité antibactérienne exercée

par la protéine cameline sur *E. coli* est importante à faible concentration (CONESA *et al*, 2008).

Ces activités biologiques peuvent s'expliquer par la séquestration de l'ion ferrique nécessaire pour la croissance microbienne ainsi que la stimulation du système immunitaire par activation des cellules NK « Natural killer » et l'augmentation de la cytotoxicité des macrophages (TSUDA et SEKINE, 2000).

Les propriétés antivirales de la lactoferrine cameline étudiées par EL-RASHDY et TABLL (2007) et EL-FAKHARANY *et al* (2008) s'expliquent par le blocage de l'invasion des cellules par les virus, particulièrement le virus de l'hépatite (PAN *et al*, 2006).

KAPPELER *et al* (1999a) ont isolé et séquencé la Lf du lait de chamelle. Comme son homologue bovin, cette protéine possède une chaîne monomérique de 689 résidus d'acides aminés, glycosylée (FARRELL *et al*, 2004). Le peptide signal est constitué de 19 acides aminés. Il présente 94,7% de similitude avec celui retrouvé dans le lait bovin. Son PM est estimé à 75 250 (KAPPELER *et al*, 1999a).

La séquence primaire de la Lf cameline présente une homologie de 74,9% avec la Lf bovine (KAPPELER *et al*, 1999a). Cette protéine est dite basique en raison de son point isoélectrique qui est estimé à 8,14.

Les N-glycosylations de la Lf contribuent à 5,6% de la masse de la protéine. Ces glycosylations augmentent la solubilité de cette protéine.

La chaîne peptidique de la Lf se replie en 2 lobes globulaires asymétriques comportant les sites de fixation des métaux lourds (JAVED KHAN *et al*, 2001 ; FARRELL *et al*, 2004).

#### **1.2.2.3.2. La lactoperoxydase**

Le LPS « lactoperoxydase enzyme system » c'est un ensemble d'enzymes qui appartiennent aux systèmes non immuns normaux de la défense antimicrobienne du lait (KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

La lactoperoxydase c'est une oxydoréductase sécrétée dans le lait et joue un rôle important dans la glande mammaire ainsi que dans le tractus digestif du nouveau né contre les bactéries pathogènes. Cette enzyme catalyse l'oxydation des thiocyanates endogènes (SCN<sup>-</sup>) en hypothiocyanates ayant une action antibactérienne (UGUZ et OZDEMIR, 2005).

La lactoperoxydase c'est une chaîne glycoprotéique de 612 résidus d'acides aminés, avec 15 résidus cystéine. La fraction glucidique occupe 10% du poids de la molécule (UGUZ et OZDEMIR, 2005). Le poids moléculaire de cette protéine cameline est estimé à 78 000, tandis que celui de son homologue bovin est de 72 500 (ELAGAMY *et al*, 1996).

Cette protéine présente une forte stabilité aux traitements thermiques par rapport à son homologue bovin (KONUSPAYEVA *et al*, 2004). Elle présente également une forte activité antibactérienne, même en absence du complexe (thiocyanates – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dans le milieu (UGUZ et OZDEMIR, 2005). Cette protéine possède un large spectre d'action qui est bactéricide sur les bactéries à gram négatif et bactériostatique sur les bactéries à gram positif (BENKERROUM *et al*, 2004).

### 1.2.2.3.3. Le lysozyme

Le lysozyme est une enzyme bactériolytique présente naturellement dans le lait des mammifères (KONUSPAYEVA *et al*, 2004). Cette enzyme clive la liaison glycosidique  $\beta$  (1-4) du peptidoglycane de la paroi des cellules bactériennes engendrant ainsi leur lyse (BENKERROUM, 2008).

Des études ont confirmé la présence du lysozyme dans le lait de chamelle, mais à des concentrations significativement basses (ELAGAMY *et al*, 1992 ; 2000). Cette protéine a été purifiée et caractérisée par DUHAIMAN (1988) et ELAGAMY *et al* (1996). Cependant KAPPELER *et al* (2003) n'ont pas détecté par des techniques de biologie moléculaire cette enzyme dans le lait camelin au cours de la deuxième moitié de la période de lactation.

Le lysozyme du lait de dromadaire résiste à un chauffage de 85°C/30 mn (ELAGAMY, 2000). Sa concentration est élevée durant les premiers stades de lactation (BENKERROUM *et al*, 2004). Son taux varie de 62 à 648  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  (ELAGAMY *et al*, 1996).

Par PAGE-SDS, sa MM est évaluée à 14,4 kDa qui est similaire à celle de l'homologue bovin (ELAGAMY *et al*, 1996).

La structure tertiaire du lysozyme est riche en hélices- $\alpha$ . Elle est identique à celle caractérisant les peptides à activité antimicrobienne (BROGDEN, 2005 ; JENSSEN *et al*, 2006).

En plus de son action lytique, le lysozyme interfère par sa nature cationique lipophile avec la membrane plasmique des bactéries (EPAND et VOGEL, 1999 ; REDY *et al*, 2004 ; JENSSEN *et al*, 2006). Cette protéine possède également une activité chitinolytique lui permettant d'agir sur les levures et les champignons, ainsi qu'une activité antivirale rapportée par certains auteurs (NWE *et al*, 2008).

### 1.2.2.3.4. Les immunoglobulines

Différentes classes d'Igs (A, M et G) ont été isolées et purifiées à partir du lait de chamelle par ELAGAMY (1996). La concentration en IgG dans ce lait est supérieure à celle rapportée dans le lait de vache (ELAGAMY, 2000 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2008). Un taux moyen de 100,7 mg/ml a été enregistré en premier stade de lactation. Ce taux baisse ensuite à 2,3 mg/ml après le 14<sup>ème</sup> jour.

ELAGAMY (2000) a noté que les IgG du lait camelin sont plus stables aux traitements thermiques. Ils sont actifs après un chauffage de 75°C/30 mn. Ces IgG semblent ne pas être restreints à une seule sous classe comme dans le lait bovin, mais ils englobent trois sous classes (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgG<sub>3</sub>) où les IgG<sub>2</sub> et IgG<sub>3</sub> constituent 50% du sérum des camelidaees (DESMYTER *et al*, 2001) et présentent une structure unique qui est dépourvue des chaînes légères, avec une partie très étendue portant les CDR « Complementary Determining Region » (DALEY *et al*, 2005).

Ces immunoglobulines présentent une activité inhibitrice sur les enzymes et ils agissent comme de vrais inhibiteurs compétitifs en pénétrant dans leurs sites actifs (LAUWERAYS *et al*, 1998). Ces protéines sont de petite taille. Elles passent dans la circulation sanguine via les intestins et peuvent être considérées comme de meilleurs candidats pour la thérapie humaine

(HOLT *et al*, 2003), particulièrement dans le diagnostic et le traitement des tumeurs (RETAMOZO *et al*, 2002).

#### **1.2.2.4. Les protéines spécifiques au lait de chamelle**

En plus des protéines sus-citées, différents auteurs signalent la présence dans le lait camelin de fractions protéiques sans équivalents dans le lait de référence. La WAP généralement décrite comme un constituant majeur dans le lait des rongeurs et la PGRP, une protéine intracellulaire se fixant aux bactéries sont détectées comme des entités majeures dans le lactosérum camelin que ce soit au niveau génomique que protéomique (KAPPELER *et al*, 2004).

##### **1.2.2.4.1. La PGRP « Peptidoglycan recognition protein »**

La famille des PGRP (protéines de reconnaissance du peptidoglycane) sont des molécules du système immunitaire inné possédant une fonction antibactérienne (KAPPELER *et al*, 2003 ; DZIARSKI et GUPTA, 2006). Plusieurs protéines de cette famille ont été identifiées chez les vertébrés et invertébrés.

La PGRP1 est connue comme un composant intracellulaire des neutrophiles (KAPPELER *et al*, 2003 ; DZIARSKI et GUPTA (2006). Elle est également produite dans les cellules épithéliales et les sécrétions corporelles (LU *et al*, 2006).

Cette protéine a été isolée dans le lait de dromadaire par précipitation acide, suivie d'une chromatographie d'affinité sur héparine-sepharose (KAPPELER *et al*, 2004). Elle est particulièrement identifiée dans ce lait avec un taux allant de 107 à 120 mg/l (KAPPELER *et al*, 2003 ; WERNERY, 2007). Ce taux décroît durant la lactation avec une fréquence de 19% et augmente par 45% en cas de mammites chez la chamelle (KAPPELER *et al*, 2004).

La séquence de l'extrémité N terminale de la PGRP cameline a été identifiée. Elle est constituée de NH<sub>2</sub>-Arg-Glu-Asp-Pro-Pro-CO<sub>2</sub>H. Cette protéine est caractérisée par un point isoélectrique fortement élevé, estimé à 9,02. Sa masse moléculaire est évaluée à 19,1 kDa (KAPPELER *et al*, 2004).

La PGRP du lait de chamelle a été purifiée et cristallisée. Il s'avère que le cristal de cette molécule est constitué de 4 entités indépendantes (SHARMA *et al*, 2008). Son repliement lui confère 2 sites fonctionnels, le premier est impliqué dans la fixation du peptidoglycane, alors que sur le second site se fixent d'autres molécules (SHARMA *et al*, 2008).

La PGRP possède une action bactéricide sur les bactéries pathogènes et non pathogènes à gram positif (LU *et al*, 2006). Elle agit en synergie avec les enzymes bactériolytiques et les peptides antimicrobiens (CHO *et al*, 2005 ; LU *et al*, 2006).

Cette protéine exerce son effet antibactérien par inhibition de la synthèse du peptidoglycane en se liant à ses précurseurs ou en limitant l'accès des enzymes catalyseurs de la biosynthèse de ce polymère à leurs substrats (LU *et al*, 2006).

##### **1.2.2.4.2. La WAP « Whey acidic protein »**

Cette protéine acide du lactosérum a été identifiée dans le lait d'un nombre limité d'espèces animales. Elle constitue la protéine sérique majeure dans le lait des rongeurs et dans

le lait de chamelle (SIMPSON *et al*, 2000). Son taux dans ce dernier est estimé à 157 mg/l (KAPPELER *et al*, 1998).

Dans le lait camelin, cette protéine a été détectée par BEG *et al* (1984 ; 1986). Des similitudes structurales entre la WAP et la région N-terminale des parties phosphorylées des caséines  $\alpha$  et  $\beta$  bovines ont été enregistrées (BEG *et al*, 1986 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998).

L'analyse de la séquence primaire de la WAP a montré qu'elle est constituée de 117 résidus d'acides aminés avec 16 Cystéines pouvant former 7 ponts disulfure, conférant ainsi une conformation étroite à la protéine (BEG *et al*, 1986 ; BEG, 1986). Son poids moléculaire est estimé par PAGE-SDS à 14000 (BEG *et al*, 1986).

La comparaison de la structure de la WAP avec celle des autres protéines préalablement caractérisées a révélé des relations intéressantes car il a été noté que la protéine cameline est homologue à certaines phosphoprotéines rapportées dans le sérum du lait des rongeurs ayant un rôle dans la régulation de la croissance de la glande mammaire, ainsi qu'une relation probable avec la neurophysine des souris (BEG *et al*, 1986). De plus, il a été rapporté que la WAP serait indispensable pour le maintien de la stabilité de la sécrétion des protéines du lait (TRIPLETT *et al*, 2005).

#### **1.2.2.4.3. La CWBP « Camel whey basic protein »**

La CWBP a été identifiée pour la première fois dans le lait camelin par OCHIRKHUYAG *et al* (1998). Elle a été isolée et purifiée par chromatographie échangeuse d'ions sur DEAE-sephacel.

Sa masse moléculaire est évaluée par PAGE-SDS à 20 kDa. Cette protéine basique est riche en résidus Gln, Arg et Gly et son point isoélectrique est estimé à 9,30. Aucune homologie structurale n'a été enregistrée en comparant la séquence de l'extrémité N-terminale de cette protéine avec d'autres protéines du lait des camélidés (OCHIRKHUYAG *et al*, 1998).

La CWBP est également détectée par EL-HATMI *et al* (2006b) 48 heures après la mise-bas de la chamelle à un taux de 1,7 g/l, son taux augmente jusqu'à atteindre 3,1g/l dans le lactosérum.

### 1.3. Les protéose-peptones du lait

#### 1.3.1. Définition

Les protéose-peptones (PP) sont définis comme la fraction des protéines du lait qui restent solubles après chauffage du lait à 95°C/30 minutes et après précipitation acide des caséines à leurs points isoélectriques (PAQUET et ALAIS, 1982 ; PAQUET, 1989).

Dans le lait de vache, la fraction PP occupe 1 à 2 mg/ml (10 à 20 % des séroprotéines) (ANDREWS *et al*, 2006). Cette fraction peut être divisée en 2 groupes distincts selon leur origine. Le premier, est un mélange complexe de peptides qui est le résultat de l'action de la plasmine sur la caséine  $\beta$  (EIGEL *et al*, 1984). Le second groupe est composé des protéines et polypeptides présents à l'état natif dans le lactosérum et dont le composant PP3 est le constituant majeur (PAQUET *et al*, 1985).

#### 1.3.2. Les fragments d'hydrolyse de la caséine- $\beta$

L'hydrolyse de la caséine- $\beta$  par la plasmine endogène du lait conduit à la formation de 2 groupes de peptides : les  $\gamma$ -CN ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ ) qui sont très hydrophobes, et leurs parties N terminales complémentaires (PP5, PP8S et PP8F) qui sont très solubles (SWAISGOOD, 1993).

Les connaissances acquises à ce jour sur la fraction PPT ont été établies en majeure partie sur le lait de vache. Des analogues aux composants majeurs de cette fraction ont été détectés dans le lait ovin et caprin (MATI *et al*, 1991). Cependant, La mise en évidence et la caractérisation de cette fraction dans le lait de chamelle n'a fait l'objet que de rares études.

#### 1.3.3. Le composant -3 des PPT (PP3)

Toutes les études rapportées dans la littérature sont réalisées sur le PP3 du lait de vache où plusieurs fonctions lui sont assignées (l'emulsification, la mitogénèse, l'inhibition de la lipolyse et le rôle antibactérien) (tableau VI). Très peu d'études sont consacrées au PP3 du lait camelin malgré sa présence à un taux très important dans ce lait (KAPPELER *et al*, 1999b). Les seules études menées sur cette protéine cameline se sont intéressées à son isolement et à l'étude de son l'activité antibactérienne (EL-HATMI *et al*, 2006a ; 2007 ; SIBOUKEUR et MATI, 2008).

Dans ce cadre, EL-HATMI *et al* (2006a ; 2007) ont observé que la concentration du PP3 dans le lait de chamelle augmente du simple au double lorsque celle des IgGs chute, ce qui pourrait confirmer le rôle antibactérien que pourrait jouer le PP3 à la place des IgGs lorsque le lait remplace le colostrum chez la chamelle.

Le tableau (VII) résume les principales caractéristiques physico-chimiques du PP3 dans le lait de chamelle.

Le PP3 a été isolé et séquencé pour la première fois dans le lait de chamelle par BEG *et al* (1987), qui l'ont dénommé : la nouvelle protéine du lactosérum camelin « novel camel milk whey protein ». Cette protéine, appelée également lactophorine, présente 60,4% d'identité séquentielle en acides aminés avec le PP3 bovin (KAPPELER *et al*, 1999b) et 30,3% d'homologie avec la Gly CAM-1 murine (JOHNSEN *et al*, 1995).

L'analyse de la séquence N-terminale du PP3 camelin révèle une hétérogénéité structurale (BEG *et al*, 1987 ; KAPPELER *et al*, 1999b) qui est le résultat d'un repliement alternatif de l'ARNm de cette protéine. À la lumière de ces résultats, la lactophorine cameline est exprimée sous forme de 2 variants génétiques isolés par BEG *et al* (1987) et KAPPELER *et al* (1999b). Cette variabilité génétique du PP3 camelin a été confirmée par GIRARDET *et al* (2000).

Le variant A est le plus abondant (75% de la protéine). Il comprend une séquence de 137 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire de 15,7 kDa. Tandis que les 25% restants représentent le variant B avec 122 acides aminés et une masse moléculaire de 13,8 kDa (KAPPELER *et al*, 1999b).

La lactophorine cameline est synthétisée sous forme immature avec un peptide signal de 19 aa montrant 72,2% d'identité avec le peptide signal du PP3 bovin et 66.7% avec celui de la GlyCAM-1 murine (KAPPELER *et al*, 1999b).

Comme son homologue bovin, la lactophorine cameline présente 5 sites de phosphorylation. Dans le variant A (Ser 30, 35, 39, 41, 83), dans le variant B (Ser 15, 20, 24, 26, 68) (KAPPELER *et al*, 1999b).

Contrairement au lait bovin, un site faiblement glycosylé (Thr16) a été suggéré dans la lactophorine du lait de chamelle par GIRARDET *et al* (2000).

Le variant A du PP3 camelin est de nature acide avec un point isoélectrique de 5,10. Tandis que le pHi du variant B est similaire à celui du PP3 bovin, il est estimé à 6,01 (KAPPELER *et al*, 1999b).

La lactophorine est la deuxième protéine majeure dans le lactosérum camelin après L' $\alpha$ -La. Son taux est estimé à 900 mg/l durant la période de lactation. Ce taux est 3 fois supérieur à celui de son homologue bovin. Quant au variant B, il présente 1/4 de la concentration du variant A (KAPPELER *et al*, 1999b).

Chamelle A: 19	SLNEPKDEIYMESQPTDT	SAQVIMSNHQVSSDLSMEPSISRED LVSKDDVV	70 (52)
Chamelle B: 19	SLN	AAQVIMSNHQVSSDLSMEPSISRED LVSKDDVV	56 (37)
Vache : 19	ILNKPEDETHLEAQPTDA	SAQFI RNLQ ISNEDLSK EPSIEREDL I SKEQ I V	70 (51)
Chamelle A: 71	IKSARRHQNQNPKLLHPVPQESSFRNTATQSEETKELTPGAATTLEGKLVELTH		124 (106)
Chamelle B: 57	IKSARRHQNQNPKLLHPVPQESSFRNTATQSEETKELTPGAATTLEGKLVELTH		111 (91)
Vache : 71	IRS SRQPQSQNPKLPLSILKEKQHLRNATLGSEETTEHTPSDASTTEGKLMELGH		125 (105)
Chamelle A: 125	KI IKNLENTMRETMDFLKSLFPHASEVVKPQ		155 (137)
Chamelle B: 112	KI I KNLENTMRETMDFLKSLFPHASEVVKPQ		142 (122)
Vache : 126	KIMRNLENTV KET I KYLKSLSFS HAFEVVKT		155 (135)

**Figure 04 : Alignement des séquences primaires des lactophorines A et B camelines et le PP3 bovin (KAPPELER *et al*, 1999b). Le nombre des aa constituant les chaînes matures sont entre parenthèses, les régions conservées sont ombrées. Chamelle A : lactophorine A de *Camelus dromedarius* ; chamelle B : lactophorine B de *Camelus dromedarius* ; vache : PP3 du lait de vache.**

La lactophorine cameline et le PP3 bovin sont caractérisés par une extrémité N-terminale acide riche en Glu, Ser et Thr. Tandis que l'extrémité C-terminale, elle est riche en résidus hydrophobes qui forment une hélice- $\alpha$  amphiphile avec un mélange de résidus acides et basiques du côté polaire (KAPPELER *et al*, 1999b).

**Tableau VI: Tableau synthétique des différentes fonctions biologiques et technologiques du PP3 dans le lait de vache.**

<b>Propriété étudiée</b>	<b>Mode d'action</b>	<b>Auteurs</b>
<b>Inhibition de la lipolyse</b>	Inhibition de l'activité de la lipoprotéine lipase par adsorption compétitive sur l'interface huile-eau du globule gras empêchant l'action de la LPL	CARTIER et CHILIARD (1990) GIRARDET et LINDEN (1996) INNOCENTE <i>et al</i> (1998) CAMPAGNA <i>et al</i> (1999)
<b>Propriétés moussantes et émulsifiantes</b>	Réduction de la tension interfaciale et stabilisation des émulsions et des mousses	INNOCENTE <i>et al</i> (2002) GIRARDET et LINDEN (1996) VANDERGHEM <i>et al</i> (2007) CAMPAGNA <i>et al</i> (1999)
<b>Propriétés antibactériennes</b>	Inhibition de la croissance des bactéries gram + et gram -	CAMPAGNA <i>et al</i> (2004)
<b>Activité bifidogène</b>	Stimulation de la croissance des Bifidobacteries	ETIENNE <i>et al</i> (1994)
<b>Activité mitogénique et immunostimulantes</b>	Activation mitotique des hybridomes	MATI <i>et al</i> (1993) SUGAHARA <i>et al</i> (2005)
<b>fixation des arômes</b>	Fixation des molécules aromatiques hydrophobes sur leur extrémité hydrophobe	INNOCENTE <i>et al</i> (2011)

Tableau VII : Caractéristiques physico-chimiques du PP3 camelin (KAPPELER *et al*, 1999b).

Espèce	Protéine	Concentration (mg/l)	MM (kDa)	Résidus d'aa	pHi	Homologie (%)
<i>Camelus dromedarius</i>	Lactophorine A	900	15,706	137	5,10	100
	Lactophorine B	225 (1/4 de A)	13,822	122	6,01	99,2
<i>Bos taurus</i>	lactophorine	300	18,700	135	6,03	60,4

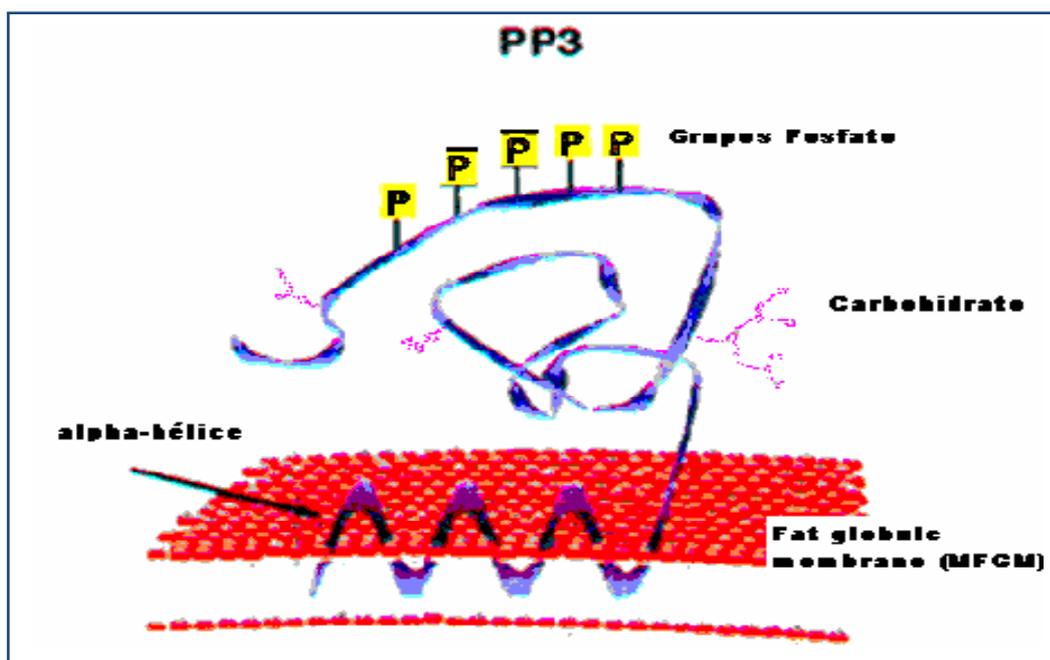


Figure 05 : Structure du PP3 du lait de vache (RASMUSSEN *et al*, 1998)



*Matériel et méthodes*



## 2. Matériel et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU. Elle a été sous tendue par le matériel énuméré ci- dessous.

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Matière première

Les échantillons de lait utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de troupeaux de chamelles implantés dans 3 régions du Sud-Est du pays : Biskra, Ouargla et Ghardaïa. Ces échantillons sont collectés au cours des années 2009 et 2010 (tableau VIII).

Parallèlement, du lait de vache collecté localement a été utilisé comme référence.

**Tableau VIII : Echantillons de lait de chamelle et de vache collectés pour cette étude.**

lait	N° donné à l'échantillon	Période de collecte	région d'origine
Lait de dromadaire	E1	Décembre 2009	Biskra
	E2	Septembre 2009	Ouargla
	E3	Mars 2010	Ghardaïa
Lait de vache	LV	Janvier 2010	Tizi Ouzou

#### 2.1.2. Produits chimiques

- Solvants : acide acétique, acide chlorhydrique, acide sulfurique, acide trichloracétique, glycérol, méthanol.
- Sels et tampons : acétate de zinc, azide de sodium, carbonate de sodium, chlorure de sodium, hexacyanoferrate de potassium, sulfate d'ammonium, sulfate de cuivre, sulfate de sodium, tartrate double de sodium et de potassium.
- Colorants et réactifs spécifiques : acide ascorbique, acrylamide, bleu de bromophenol, bleu de coomassie R250, 2,6-dichlorophenolindophenol, dodecyl sulfate de sodium, glycine, lactose, 2-mercaptoethanol, N, N-méthylène-bis-acrylamide, persulfate d'ammonium, réactif de folin ciocalteu, trishydroxyméthylaminomethane (Tris), TEMED.

#### 2.1.3. Supports chromatographiques

- Sephacryl S200 (BIOCHEMICA, Switzerland).

#### 2.1.4. Matériel biologique

- Sérum albumine bovine (BSA), (SIGMA; USA).

- Kit pour étalonnage des gels d'électrophorèse en PAGE- SDS (gamme de PM : 10 – 250 kDa), (BIO- RAD, USA).
- Bleu dextrane (BIOCHEMICA, Switzerland).

### **2.1.5. Appareillage**

- Unité d'électrophorèse sur mini- cuves verticales (HOEFFER SE 260, USA) comprenant : couleur de gel, cuves d'électrophorèse ; générateur de courant (max 250V, 100mA) ; plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10×12cm) ; espaceurs de 1mm d'épaisseur.
- Unité de chromatographie basse pression (BUCHI, Switzerland) constituée de : détecteur UV ; pompe péristaltique ; enregistreur graphique ; collecteur de fractions et colonne de séparation (1,5 × 30cm).
- Balance de précision (0.01 mg) (OHAUS, USA) et balances analytiques à affichage digital (0.01 g).
- Spectrophotomètre UV- visible (SHIMADZU, Japon)
- pH mètre (METROHM, Suisse).
- Lyophilisateur à ballons et à plateaux.
- Centrifugeuse réfrigérée, max 28000 g (SIGMA, USA).
- Agitateurs variés (de tubes, à plateaux, à barreaux magnétiques chauffants et non chauffants)
- Dessiccateur.
- Bain- marie (MEMMERT, Allemagne).

### **2.1.6. Petit matériel**

Un certain nombre d'accessoires et petit matériel est également nécessaire : micropipettes, micro-seringue Hamilton, membranes de dialyse (seuil d'exclusion 8000 Da), gants et masques pour la manipulation de l'acrylamide et autres produits dangereux.

## **2.2. Méthodes**

### **2.2.1. Collecte du lait**

Le lait provient de petits mélanges à partir de chamelles saines. Il est additionné aussitôt après la traite d'un antimicrobien (azide de sodium 0.002% p/v) et acheminé au laboratoire dans une glacière.

A l'arrivée, une mesure du pH est réalisée, Le reste du lait est réparti en petites fractions (250 ml) et congelé pour une utilisation ultérieure.

### **2.2.2. Méthodes chimiques**

L'analyse physico-chimique des échantillons a porté sur la mesure de certains paramètres (extrait sec total (EST), matière grasse (MG), lactose, vitamine C et protéines). Toutes les mesures sont réalisées sur du lait entier en 3 essais.

### **2.2.2.1. Mesure du pH**

La mesure du pH est effectuée à une température du lait de +20°C, La valeur du pH est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser. Les mesures sont précédées d'une étape d'étalonnage qui consiste en un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution de pH connue (solution de pH étalon).

### **2.2.2.2. Détermination des teneurs en extrait sec total (EST), en extrait sec dégraissé (ESD) et en matière grasse (MG)**

Le principe de la méthode utilisée consiste en une dessiccation par évaporation à l'étuve ( $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 3h) d'une certaine quantité de lait entier (pour l'EST) ou écrémé (pour l'ESD) (ANONYME3, 1980), suivie d'une pesée du résidu sec total après refroidissement dans un dessiccateur (annexe 04).

Après pesée, les valeurs obtenues correspondent aux taux de l'EST ou l'ESD. Le taux de la matière grasse est déduit par différence ( $\text{MG} = \text{EST} - \text{ESD}$ ).

### **2.2.2.3. Détermination de la teneur en lactose**

Elle est réalisée par une méthode titrimétrique basée sur la réduction à chaud d'une solution cupro alcaline (liqueur de Fehling).

Les conditions opératoires suivies sont celles décrites par AUDIGIE *et al* (1978). Pour ce dosage, une opération de défécation par addition au lait d'une solution d'hexacyanoferrate de potassium et d'acétate de zinc est préalablement effectuée.

L'étalonnage de la solution de Fehling est fait par une solution étalon de lactose de concentration connue (annexe 05).

### **2.2.2.4. Détermination de la teneur en vitamine C**

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie. Il est basé sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2-6-dichlorophenolindophenol (2-6-DPIP) qui est rouge en milieu acide et bleu en milieu neutre. Les conditions utilisées sont celles recommandées par AUDIGIE *et al* (1978) (Annexe 06). La solution du 2-6-DPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue.

### **2.2.2.5. Détermination de la teneur en protéines**

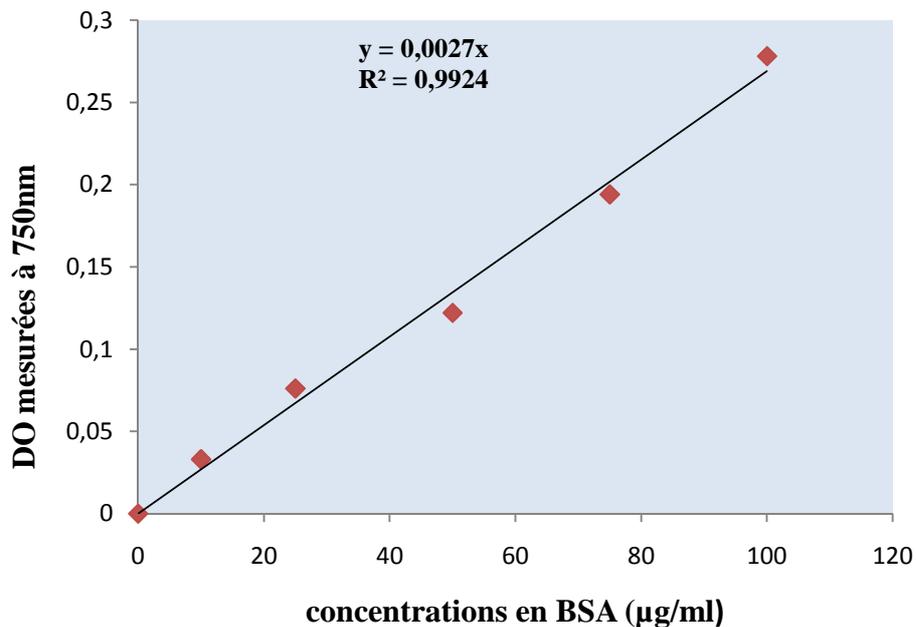
Le taux des protéines dans le lait et dans ses différentes fractions est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de LOWRY *et al* (1951), en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine de référence.

Cette méthode est basée sur l'obtention d'un composé chromogène par une réaction d'oxydo réduction. Cette dernière a lieu entre, d'une part, des groupements de la protéine notamment les groupements phénoliques du tryptophane, de la tyrosine et dans une moindre mesure ceux de la cystéine, cystine et histidine (la liaison peptidique est aussi impliquée) et d'autre part, le réactif de Folin Ciocalteu dont l'acide phosphomolybdo-tungstique est le constituant actif.

Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène (couleur bleu foncée) dont l'intensité est mesurée à 750 nm (annexe 07).

Ainsi les D.O obtenues à cette longueur d'onde permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage  $DO = f(C)$  (figure 06).

Le taux des protéines sériques est estimé dans le surnageant de l'isoélectroprécipitation des caséines après abaissement du pH du lait à 4,3 (figure 07); alors que la teneur en caséines, elle est obtenue par différence entre les protéines totales et les protéines du lactosérum.



**Figure 06: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951) ; réalisée avec l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine de référence.**

### 2.2.3. Préparation des échantillons

Les grands groupes des lactoprotéines camelines et bovines sont séparés à partir du lait entier suivant les étapes illustrées par la figure (07).

#### 2.2.3.1. Ecrémage

L'écémage du lait entier est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 20 minutes. La crème qui apparaît en surface est écartée, alors que le lait écrémé est filtré sur la laine de verre. Cette opération est répétée deux fois afin d'éliminer totalement la matière grasse.

### **2.2.3.2. Séparation des grands groupes de lactoprotéines (protéines sériques et caséines)**

Le principe de la séparation repose sur l'acidification du lait écrémé jusqu'au pH isoélectrique des caséines permettant leur précipitation. Cette dernière est réalisée par ajout d'une solution de HCl 4N jusqu'à pH 4,3 comme préconisé par WANGO *et al* (1998) pour le lait camelin et 4,6 pour le lait bovin. Le lait ainsi acidifié est centrifugé à 3500 g pendant 15 minutes à 20°C.

Le culot de centrifugation constitué de la fraction caséinique est récupéré dans un volume minimum d'eau distillée, ajusté au pH 7 avec une solution de NaOH 1N pour une meilleure solubilisation de ces protéines.

Quant au surnageant, il représente la totalité des protéines sériques. Son pH est neutralisé à 7 puis acidifié dans une seconde étape à pH 4,3 avec HCl 4N, recentrifugé à 3500 g pendant 15 minutes afin d'éliminer les caséines résiduelles qui risquent de contaminer les protéines sériques.

### **2.2.3.3. Dialyse**

Cette étape permet de débarrasser les échantillons des molécules dont la taille est inférieure à 8000 Da (lactose, sels minéraux, composés azotés non protéiques).

Les échantillons des protéines sériques et de caséines obtenus sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 48 à 72 heures à +4°C et sous agitation douce, en utilisant des membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 8000 Da. L'eau de contre dialyse est changée 2 fois par jour.

### **2.2.3.4. Congélation et lyophilisation**

Après dialyse, les solutions de protéines obtenues sont étalées en fines couches dans des coupelles, congelées à -18°C pendant 72 heures, puis lyophilisées. Les protéines sont ainsi récupérées sous forme de poudre et conservées ainsi dans un dessiccateur.

## **2.2.4. Méthodes électrophorétiques**

### **2.2.4.1. Définition et 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'électrophorégramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

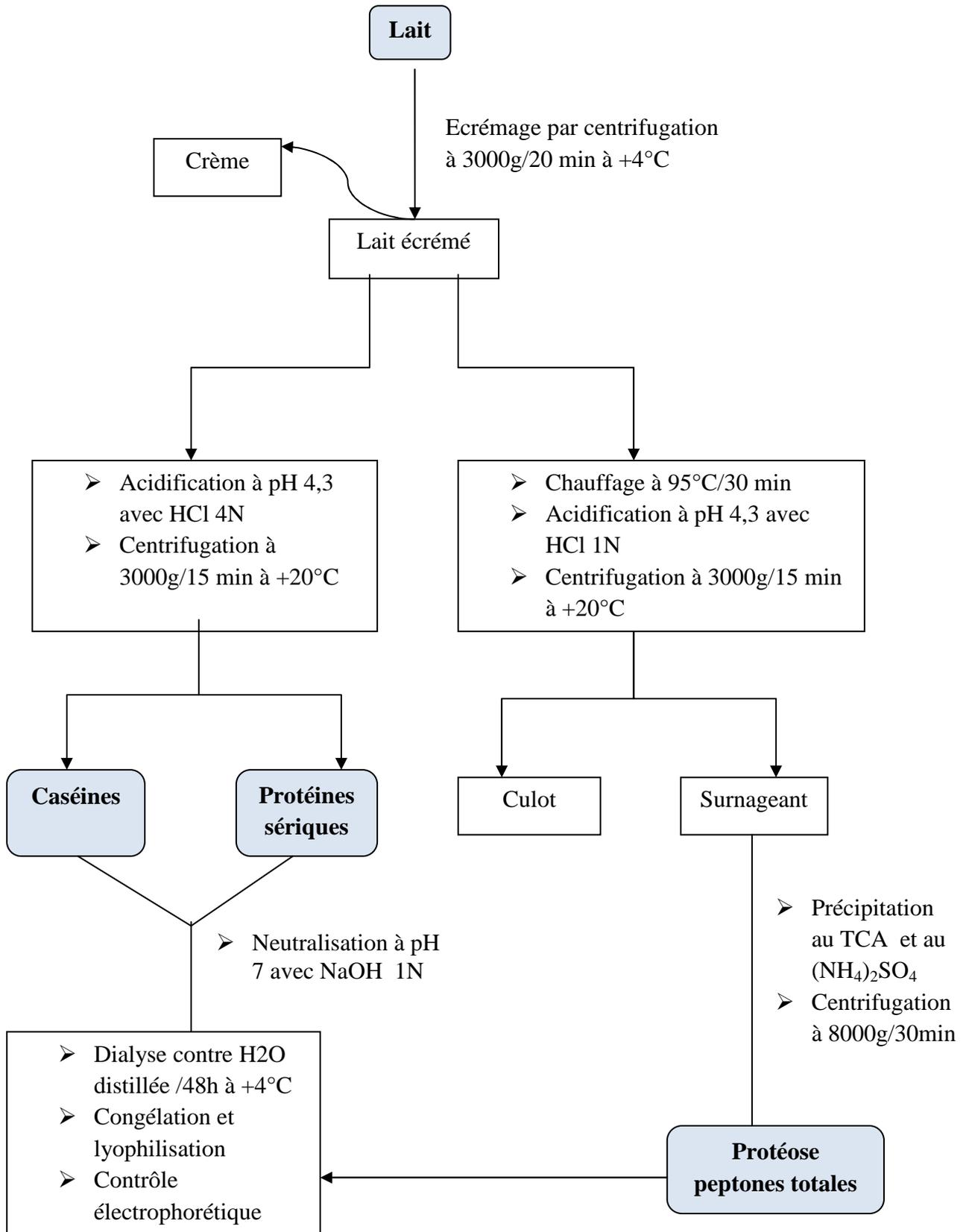


Figure 07 : étapes suivies pour l'isolement des grands groupes des protéines du lait de chamelle.

## 2.2.4.2. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

### 2.2.4.2.1. Conditions générales

La PAGE, est la technique la plus utilisée en raison des avantages qui sont offerts par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité.

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibres et de pores résultant du greffage d'unités de N, N-méthylène-bisacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ ) bi fonctionnelles sur des chaînes de polyacrylamide ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) adjacentes. la polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  et de N,N,N,N- tetraméthylènediamine (TEMED).

La structure du gel est définie par les indices T et C. Sa porosité 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)

### 2.2.4.2.2. Conduite de l'électrophorèse

Le gel est préparé en mélangeant les solutions d'acrylamide et de bis acrylamide avec une solution tampon, l'ensemble est dégazé puis additionné des agents initiateurs (persulfate d'ammonium et de TEMED) (figure 10).

Le mélange est immédiatement coulé entre 2 plaques (en verre et en alumine) séparées par des espaceurs et enfin un peigne y est introduit permettant la formation des puits après polymérisation du gel.

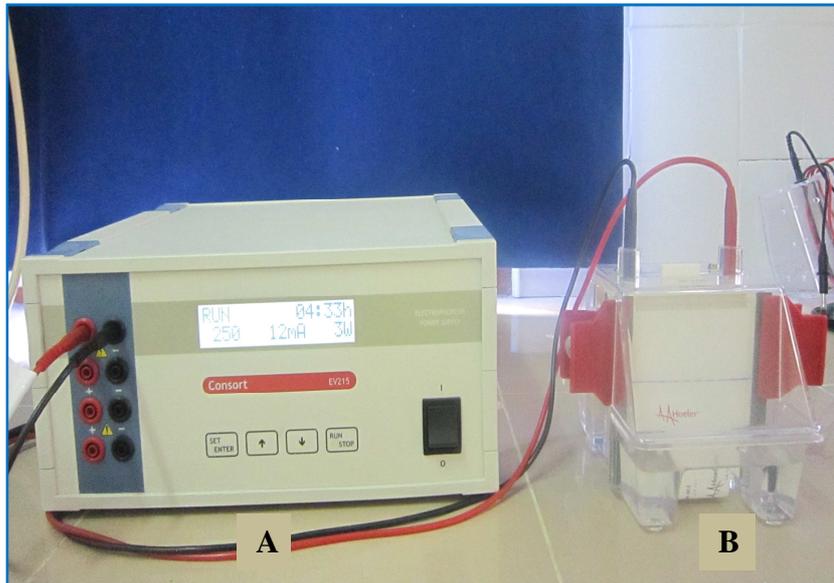
Les échantillons à analyser sont dissous à raison de 1 à 2 mg/ml dans un tampon approprié et additionnés du bleu de bromophenol qui est un indicateur coloré qui détermine le front de migration des protéines et permet de repérer la fin de l'électrophorèse.

Les échantillons ainsi préparés sont déposés à raison de 10 à 20  $\mu\text{l}$  dans chaque puits après avoir monté sur l'unité d'électrophorèse les 2 plaques renfermant le gel et remplis les cuves inférieures et supérieures de tampon d'électrode. L'unité est alors mise sous tension, courant et voltage constants : 20 mA, 250V (figure 08).

### 2.2.4.2.3. En conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native)

La PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOFFER au niveau du laboratoire LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T= 12% ; C= 2,7%).

Le tampon de gel est constitué de Tris 0,75 M, pH 8,9. Le tampon d'électrode contient du Tris 5 mM, glycine 77 mM, pH 8,3. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillon composé du tampon de gel (1/10 v/v), de l'eau distillée (7/10 v/v) et du glycérol 10% (v/v) (annexe 08).

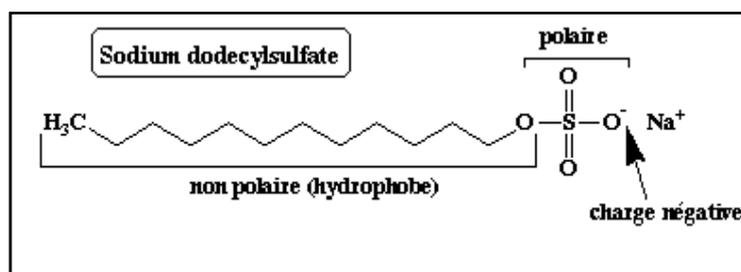


**Figure 08: Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260)**  
**A : générateur de courant ; B : cuve de migration**

#### 2.2.4.2.4. En présence du SDS et de 2-β ME (PAGE-SDS)

##### 2.2.4.2.4.1. Principe

Un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5 min, en présence d'un détergent anionique le SDS (10% p/v) (figure 09) et d'un agent réducteur chargé de rompre les liaisons disulfure, le 2-βME (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 acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.



**Figure 09: Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).**

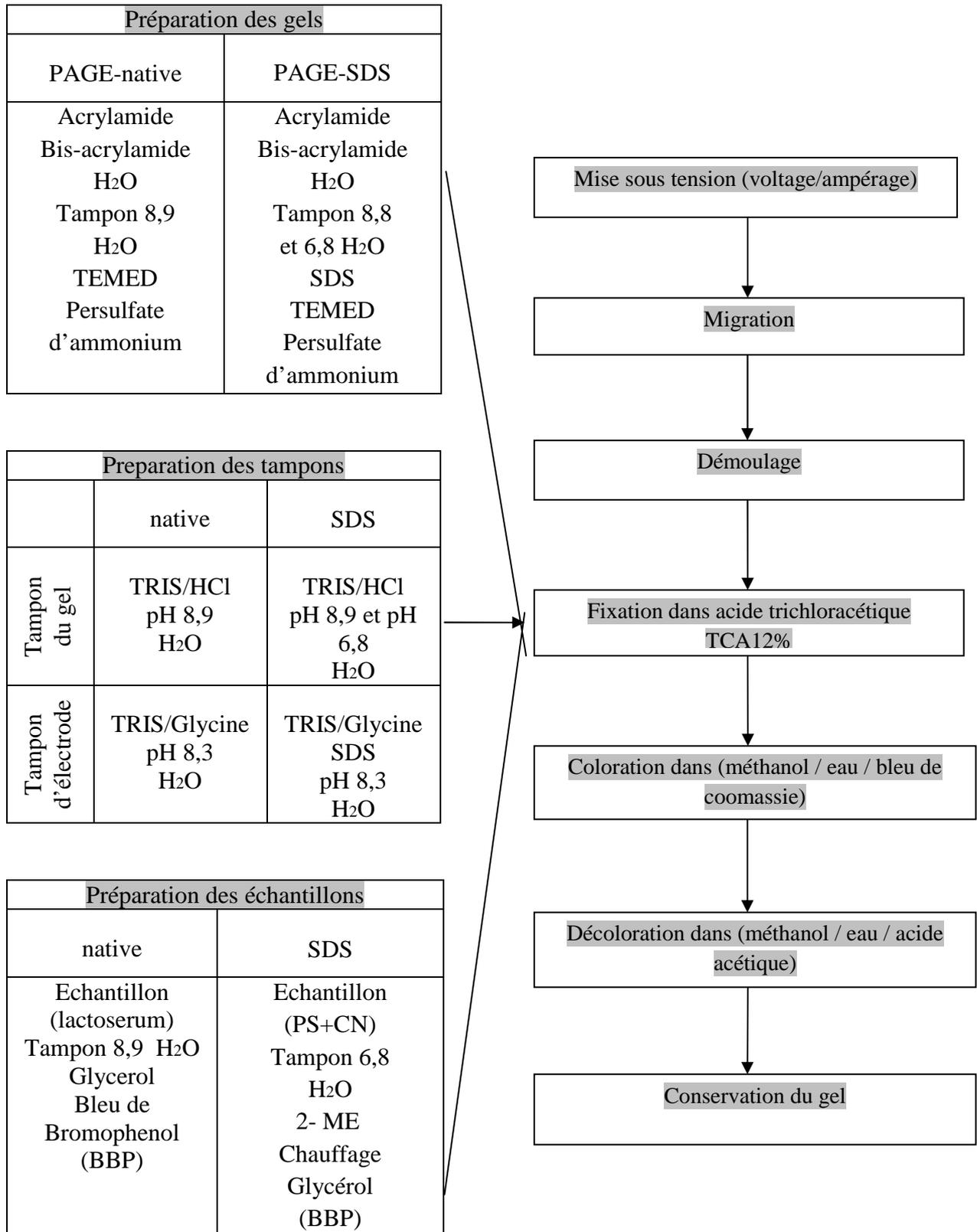
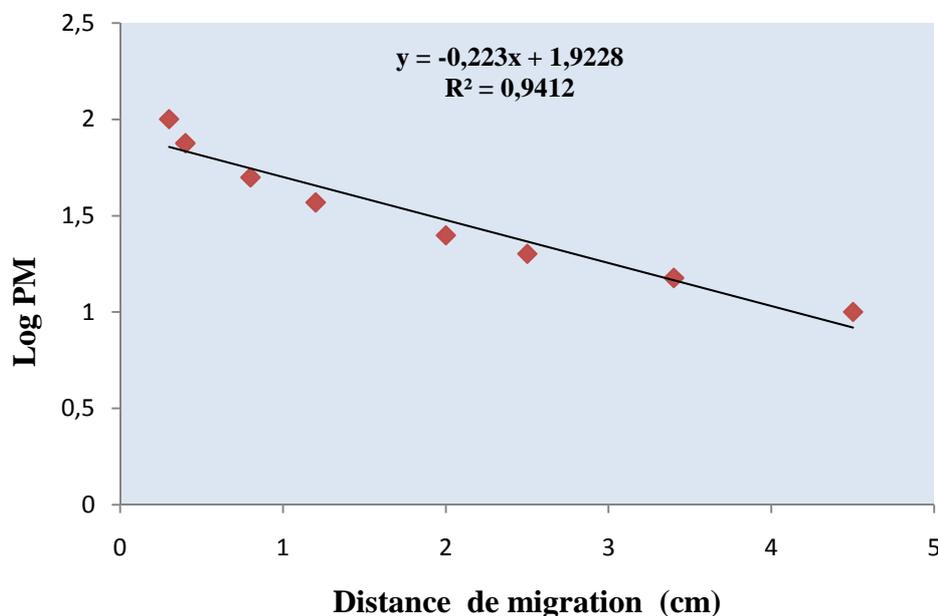


Figure 10 : Etapes suivies pour la réalisation de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).

#### 2.2.4.2.4.2. Conditions expérimentales

La PAGE-SDS utilise un système de tampons discontinus selon LEAMMLI (1970), comprenant un gel de concentration (T=4% et C=2,7%) en tampon (Tris 0,49M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T= 15,4 % et C=2,7%) en tampon (Tris 1,5M pH 8,8). Le tampon d'électrode est composé du Tris 49 mM ; glycine 384 mM et SDS 1% (p/v), pH 8,3 (annexe 09).

Le premier gel faiblement réticulé n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines et tend plutôt à les concentrer, en les mettant sous forme de fines bandes qui arrivent au gel de séparation en même temps. La séparation a lieu au cours de la migration dans le deuxième gel. Ce dernier est calibré avec des protéines de poids moléculaires connus s'étendant de 10 à 250 kDa (figure 11).



**Figure 11: Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS, en utilisant un standard protéique de PM allant de 10 à 250 kDa (kit BIO-RAD).**

#### 2.2.4.3. Détection des protéines dans le gel

A la fin de l'électrophorèse et après démoulage du gel, les protéines sont premièrement fixées dans une solution de TCA 12% (p/v) pendant 45 minutes, puis colorées pendant 2 heures par le bleu de coomassie R250 à raison de 0,2% (p/v) dissous préalablement dans une solution contenant de l'eau distillée (1 volume), du méthanol (1 volume) et du TCA 2% (p/v). Enfin la décoloration du gel s'effectue dans le mélange (eau / méthanol / acide acétique) dans les proportions (3,12/1,50/0,37, v/v/v) (figure 10).

## 2.2.5. Méthodes chromatographiques

### 2.2.5.1. Principe de la chromatographie de filtration sur gel

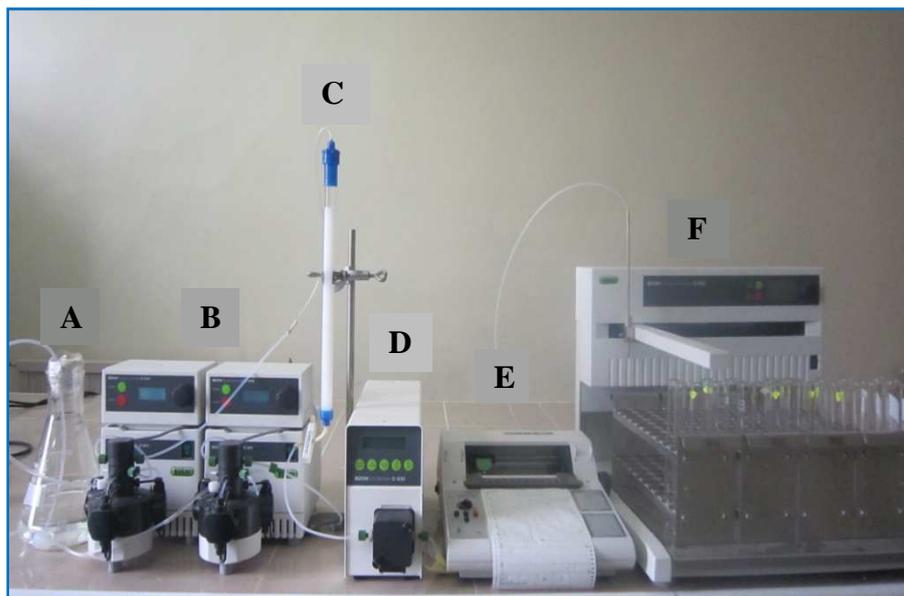
La chromatographie de filtration sur gel permet de séparer des molécules selon leur taille et leur forme moléculaire, elle peut être grossièrement comparée à un tamis. Cette méthode utilise une phase stationnaire composée de billes poreuses de dimensions précises et uniformes dans lesquelles les molécules de dimensions appropriées peuvent s'insérer et être retenues un certain temps. Les molécules de grande taille passent quant à elles entre les sphères et sont rapidement éluées de la colonne par la phase mobile.

### 2.2.5.2. Conditions expérimentales

Pour la séparation des protéines du lactosérum camelin nous avons suivi le protocole de YOSHIDA (1990) appliqué sur les séroprotéines bovines.

Les conditions de la chromatographie sont modifiées et ajustées aux protéines étudiées. La séparation est effectuée sur une colonne de dimensions :  $30 \times 1,5$  cm (figure 12).

Nous avons utilisé comme phase stationnaire le Sephacryl S200 (poly allyle dextrane-CO-N- $\dot{N}$ -méthylène bisacrylamide). C'est un gel mixte composé d'acrylamide et d'un agent de pontage : le N- $\dot{N}$ -méthylène bisacrylamide. Ce gel présente un taux de réticulation élevé et une grande résistance aux contraintes mécaniques. Le seuil de coupure du Sephacryl S 200 est de 5 à 250 kDa.



**Figure 12 : Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (BUCHI, Switzerland)**

**A : tampon d'éluion ; B : pompes péristaltiques ; C : colonne ( $30 \times 1,5$  cm) ; D : détecteur UV ; E : enregistreur ; F : collecteur de fractions.**

La phase mobile utilisée est une solution tampon composée du Tris 0,05 M-HCl avec 0,2 M NaCl à pH 6,8 ; additionnée d'un antimicrobien, l'azide de sodium à 0,02%.

### **Préparation de la colonne**

La colonne est préparée avec un grand soin pour assurer un compactage homogène du gel. Le remplissage s'effectue avec environ (10 g) du gel mis en contact (30 min à 25°C) avec l'éluant (tampon de chromatographie) dégazé. Le remplissage est effectué de façon régulière.

Après équilibrage de la colonne et stabilisation du débit à 28 ml/heure, le volume mort ( $V_0$ ) est estimé par chromatographie du bleu de dextrane à raison de 1mg/ml, qui a une masse moléculaire élevée ( $10^6$  Da). De ce fait, il n'est pas retenu dans le gel. Le volume nécessaire pour l'éluion de cette molécule correspond au volume de liquide se trouvant entre les billes.

Le volume interstitiel observé pour la colonne utilisée est de 15 ml. Le volume total est de 45 ml.

### **Préparation des échantillons**

Les protéines sériques lyophilisées sont dissoutes à raison de 100 mg/5 ml de tampon de chromatographie. Les protéines sont éluées par passage du tampon dans la colonne avec un débit constant de 28 ml/h. L'absorbance de l'éluat est contrôlé à 280 nm. Les fractions de (5ml) sont collectées et contrôlées par électrophorèse.

#### **2.2.6. Traitement thermique**

Les échantillons de lait de chamelle et de vache écrémés sont répartis dans des tubes en verre (8 mm de diamètre interne) fermés hermétiquement à raison de 5 ml par tube. Ces tubes ne sont placés dans le bain-marie qu'une fois que ce dernier a atteint la température voulue. Les températures et les durées du chauffage sont bien déterminées.

Pour ces essais, nous avons testé des températures de 60, 70 et 80°C pendant 30 min ; puis ce traitement est rendu extrême en élevant les températures du chauffage à 90 et 95°C pendant des temps allant de 10 à 45 minutes.

Le traitement est arrêté en portant les tubes à refroidissement immédiat sous un jet d'eau froide. Les protéines du lactosérum sont ensuite préparées suivant les étapes précédemment décrites (figure 07) puis analysées en électrophorèse.

Les pourcentages de dénaturation thermique sont déterminés par la formule :

$$\text{PrD} = (\text{Pr} - \text{PrT}) \times 100 / \text{Pr}$$

PrD : % des protéines dénaturées ; Pr : quantité des protéines avant chauffage ; PrT : quantité des protéines après chauffage à la température T pour une durée déterminée.

#### **2.2.7. Isolement de la fraction protéose-peptones totales**

Pour l'isolement de la fraction PPT cameline, nous avons adopté le protocole de PAQUET et ALAIS (1982) appliqué sur le lait bovin et modifié par MATI *et al* (1991) (figure 07).

Les protéose-peptones sont extraites à partir du lait camelin écrémé soumis à un traitement thermique de 95°C pendant 30 min. Les échantillons ainsi chauffés sont acidifiés à pH 4,3 avec une solution de HCl 1N, puis centrifugés à 4000 g pendant 30 min.

Le culot contenant les protéines dénaturées est rejeté, tandis que le surnageant est soumis à une précipitation par l'utilisation de l'acide trichloracétique (TCA) à des concentrations finales différentes (4, 6, 8, 10 et 12%). Une précipitation au sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) est également testée sur les PP camelins avec des seuils de 30, 50 et 70% de saturation. Le surnageant de thermocoagulation ainsi traité est soumis à une centrifugation de 8000 g pendant 30 min à 4°C. Les culots ainsi obtenus sont récupérés dans un volume minimal d'eau distillée et soumis à une analyse électrophorétique (après dialyse dans le cas de la précipitation au sulfate d'ammonium).

## ***Résultats et discussion***



### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Qualité physico chimique du lait de chamelle collecté

Les paramètres physico-chimiques mesurés (matière sèche, matière grasse, lactose, protéines et vitamine C), sont rapportés dans le tableau (IX).

**Tableau IX : Résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques des laits camelin collectés.**

paramètres	Lait de chamelle			Lait de vache local
	E1	E2	E3	
<b>pH (20°C)</b>	6,45* ± 0,01	6,36* ± 0,00	6,49* ± 0,02	6,67 ± 0,01
<b>Extrait sec total (EST) (g/l)</b>	130,0* ± 3,46	90,6* ± 3,05	168,6* ± 8,08	105,0 ± 13,31
<b>Matière grasse (MG) (g/l)</b>	42,66 ± 1,15	28,86* ± 1,50	46,00 ± 5,29	30,66 ± 1,15
<b>Lactose (g/l)</b>	32,23 ± 1,23	34,23 ± 1,89	33,24 ± 0,94	42,70 ± 2,48
<b>Protéines (g/l)</b>	30,66 ± 0,57	29,66 ± 1,15	31,83 ± 1,15	29,00 ± 0,76
<b>Vitamine C (mg/l)</b>	41,29 ± 0,91	48,09* ± 1,95	43,46 ± 2,23	20,26 ± 0,64

\* Différence significative (seuil 5%).

#### 3.1.1. Mesure du pH

Comparativement au lait de vache, le lait de chamelle s'avère légèrement plus acide. Les valeurs de pH mesurées pour les trois échantillons sont différentes. La valeur moyenne est de 6,43. SIBOUKEUR (2005) a signalé une valeur de pH se situant dans la même gamme (6,31).

Tandis que d'autres auteurs ont rapporté des valeurs de pH plus élevées : 6,51 et 6,69 (ALLOUI-LOMBARKIA *et al*, 2007) ; 6,52 (KAMOUN, 1995) et 6,77 (KHASHKHELI *et al*, 2005).

Cette valeur relativement faible du pH du lait camelin semble être corrélée à son contenu élevé en vitamine C (FARAH *et al*, 1992 ; HADDADIN *et al*, 2007), qui procure au lait un goût légèrement acide (YAGIL *et al*, 1994). Comme on pourrait attribuer aussi cette acidité à la richesse de ce lait en acides organiques divers (acide citrique, acide orotique et acide butyrique) (HADDADIN *et al*, 2007).

#### 3.1.2. Taux de matière sèche

L'extrait sec total (EST) montre que les échantillons E1 et E3 présentent les teneurs les plus élevées (130 et 168 g/l respectivement) supérieures à celles du lait bovin (105 g/l). L'échantillon E2 donne le taux en extrait sec le plus faible (90,66 g/l).

La teneur moyenne de ces trois échantillons (129,77 g/l) se rapproche de celle rapportée par ALLOUI-LOMBARKIA *et al* (2007) sur du lait provenant des régions steppiques de notre pays ( $129,98 \pm 4,75$ ) ainsi que celle signalée par HADADDIN *et al* (2007) en Jordanie ( $123 \text{ g/l} \pm 12,7$ ). Cette teneur est par contre supérieure à celle rapportée par certains auteurs en Tunisie (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; KAMOUN, 1995 et ATTIA *et al*, 2001) dont les taux varient entre 96 et 116 g/l.

ZHANG *et al* (2005) ont noté que les grandes variations dans la composition du lait camelin touchent surtout la matière sèche, dont le taux est affecté par la teneur en eau du lait qui lui est inversement proportionnelle. Dans ce contexte, l'étude réalisée par HADDADIN *et al* (2007) sur les variations de la composition du lait de chamelle durant la période d'une année a montré que le contenu en eau passe de 861 g/l en hiver (Décembre) à une teneur plus élevée (898 g/l) en été (Aout). En contre partie, la teneur en matière sèche chute de 139 g/l en hiver à 102 g/l en été. Cette différence de 37 g/l semble plus importante que celle notée par TAMIME et ROBINSON (1999) pour le lait de vache (4,0 g/l).

En effet, cette dilution du lait en période chaude traduit un phénomène d'adaptation au désert du dromadaire et par lequel le chamelon est supplémenté en éléments nutritifs suffisants et en eau (NARJISSE, 1989 ; KHASHKHELI *et al*, 2005 ; HADDADIN *et al*, 2007). D'un autre côté, la teneur en eau du lait camelin est affectée par le contenu en eau des plantes ingérées par la chamelle (KHASHKHELI *et al*, 2005).

En tenant compte de ces données, nous pourrions suggérer que la pauvreté de l'échantillon E2 en matière sèche, en matière grasse et en protéines est dûe probablement à la période de la collecte (mois de Septembre) qui survient juste après une période de sécheresse.

### **3.1.3. Teneur en matière grasse**

La teneur en MG, comme pour la MS (matière sèche) des échantillons E1 et E3 est plus élevée que celles de l'échantillon E2 (42,6 et 46,00 g/l contre 28,86 g/l pour E2). Le taux moyen de la MG (3,91 g/100 ml) des échantillons de lait étudiés est supérieur au contenu en matière grasse du lait de vache collecté localement.

En analysant les données rapportées par la littérature à travers le monde, nous observons une fluctuation des teneurs en MG : 25 à 35 g/l en Jordanie (HADDADIN *et al*, 2007) ; 29 g/l en Mauritanie (MEILOUD *et al*, 2011) ; 32 à 35g/l en Tunisie (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; GORBAN et IZZELDIN, 2001) ; 37,8 g/l en Egypte (KAMAL *et al*, 2007).

En plus des variations sus-mentionnées relatives à l'état d'hydratation de l'animal et à son alimentation (KHASKHELI *et al*, 2005), ELAMINE et WILCOX (1990) ont estimé que d'autres facteurs comme la saison, le stade de lactation et le nombre de mises bas sont susceptibles d'interférer sur les taux obtenus.

### **3.1.4. Teneur en lactose**

D'après les résultats du tableau (IX), les teneurs en lactose des échantillons analysés sont très proches l'une de l'autre (moyenne de 33,23g/l). Ces valeurs sont toutefois inférieures à celles du lait de vache (42,7g/l).

Les taux en lactose enregistrés dans la présente étude sont proches de ceux rapportés par ALLOUI-LOMBARKIA *et al* (2007) sur le lait de la région saharienne (34,20 g/l), alors

qu'ils sont inférieurs à ceux rapportés pour la région steppique (42,69 g/l). D'autres auteurs ont avancé des teneurs plus élevées : 36,5 g/l au Pakistan (KHASKHELI *et al*, 2005) ; 43,87 g/l dans la région de Ouargla (SIBOUKEUR, 2005) ; 47 à 54 g/l en Tunisie (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; ATTIA *et al*, 2001 ; SBOUIE *et al*, 2009) ; 58,5g/l en Egypte (KAMAL *et al*, 2007).

Les modifications dans les teneurs en lactose, sont responsables du goût sucré et parfois amer du lait de chamelle (YAGIL, 1982). Ces variations sont très faibles en fonction de la saison (HADDADIN *et al*, 2007). Elles dépendent, cependant, de la race animale, et du stade de lactation (ELLOUZE et KAMOUN, 1989 ; KAMAL *et al*, 2007). Car, comme pour le lait bovin, la teneur en lactose est faible durant le premier jour de lactation puis elle augmente jusqu'à se stabiliser à partir du 5<sup>ème</sup> jour (KAMAL *et al*, 2007).

Enfin, notons que des études comparatives en cours sur la tolérance au lactose de certains sujets, ont montré que le lait camelin serait plus digeste et plus apte à être métabolisé par les sujets sensibles (CARDOSO *et al*, 2010).

### **3.1.5. Teneur en vitamine C**

Les teneurs en vitamine C des échantillons E1 et E3 sont proches (41,29 et 43,46 mg/l), alors que celle de E2 (48,09 mg/l) est la plus élevée. Le taux moyen de cette vitamine dans le lait camelin (44,28 mg/l) s'élève à 2 fois la valeur mesurée pour le lait de vache (20,26 mg/l).

Les résultats de cette étude sont concordant avec ceux cités dans la littérature : 41,4 mg/l (SIBOUKEUR, 2005) ; 46 mg/l (SHAMSIA, 2009) ; 58,2 mg/l (BAIDAR KHAN et IQBAL, 2001) ; 48 à 256 mg/l (KONUSPAYEVA *et al*, 2009b).

Toutefois, certains auteurs ont enregistré des taux plus faibles : 24,9 mg/l (MEHAIA, 1994) ; 3 à 36 mg/l (ZHANG *et al*, 2005) ; 37,4 mg/l (FARAH *et al*, 1992).

Les concentrations en vitamine C varient en fonction de la race animale, du stade de lactation où elles augmentent après 180 jours de lactation (MOHAMED, 2002). STAHL *et al* (2006) ont rapporté que la teneur en cette vitamine est plus faible dans le colostrum que dans le lait de chamelle (35,6 mg/l et 52,5 mg/l respectivement), mais reste 3 fois supérieure à celle du lait de vache (10,5 mg/l), ce qui constitue un supplément pour le chameau qui ne synthétise cette vitamine qu'après le 4<sup>ème</sup> mois.

MOHAMED (2002) a observé que les taux en vitamine C sont plus élevés chez les femelles multipares. Cet auteur a également rapporté que la synthèse de cette vitamine est réduite en cas de stress causé par les maladies (26,8 mg/l chez des chameaux atteints de mammites alors qu'il est de 47,4 mg/l chez des chameaux sains).

Le contenu élevé en vitamine C dans le lait de chamelle est d'un grand intérêt pour les populations du désert.

### **3.1.6. Teneur en protéines totales**

L'analyse des résultats figurant dans le tableau (X), montre que les teneurs en protéines sont relativement similaires entre les trois laits (30,66 ; 29,66 et 31,83 g/l pour E1 ; E2 et E3 respectivement). De même, cette teneur ne révèle pas une grande différence avec celle enregistrée pour le lait de vache (29,0 g/l).

Le taux moyen de la matière protéique totale enregistré dans cette étude (30,77 g/l), est comparable aux résultats rapportés par la bibliographie : 29,42 g/l et 29,48 g/l respectivement pour les échantillons de lait des régions saharienne et steppique du pays (ALLOUI-LOMBARKIA *et al*, 2007) ; 30,72 g/l (ATTIA *et al*, 2001) ; 30,8 et 33,1 g/l (WANGO, 1997) ; 33,0 g/l (KAMAL *et al*, 2007) ; 34,6 g/l (SHAMSIA, 2009) et 35,6 g/l (SIBOUKEUR, 2005).

Par ailleurs, des valeurs plus faibles ont été avancées : 22,26 g/l (ELLOUZE et KAMOUN, 1989) ; 25,4 g/l (KHASKHELI *et al*, 2005) ; 28,0 g/l (ELAMINE et WILCOX, 1992). D'autres auteurs ont évoqué des teneurs plus importantes: 42 g/l (HADDADIN *et al*, 2007) ; 53 g/l (MEHAIA *et al*, 1995).

Les variations dans les teneurs en protéines dans le lait de chamelle suivent la même tendance que celles de l'extrait sec total et la matière grasse, mais elles sont moins prononcées.

Ces variations sont attribuées à la saison, au stade de lactation et au nombre de mises bas. HADDADIN *et al* (2007) et WANGO (1997) ont observé que le taux protéique augmente en saison pluviale, alors que ZELEKE (2007) a noté un taux élevé en période sèche. Les taux les plus élevés sont notés en début de lactation (KAMAL *et al*, 2007 ; ZELEKE, 2007 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2009). Quant à ZELEKE (2007), il a observé un taux important en protéines après la troisième parturition.

**Tableau X : Répartition de la fraction protéique (g/l) des échantillons de lait étudiés.**

Paramètres	Lait de chamelle			Lait de vache local
	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>	
PT	30,66 ± 0,57	29,66 ± 1,15	31,83 ± 1,15	29,00 ± 0,55
PS	8,42* ± 0,03	6,67 ± 0,58	7,00 ± 0,10	4,42 ± 0,03
CN	22,25 ± 0,56	23,00 ± 1,73	24,83 ± 1,24	24,40 ± 0,79

PT : protéines totales ; PS : protéines sériques ; CN : caséines

### 3.1.7. Teneur en protéines sériques

La teneur en protéines sériques des échantillons E2 et E3 sont proches (6,67 et 7,00 g/l) (tableau X), tandis qu'elle est plus élevée pour E1 (8,42 g/l). Ces protéines présentent un taux moyen de 25 % des protéines totales qui est supérieur à celui mesuré pour le lait de vache (15%) (tableau XI).

Ces résultats auxquels nous sommes parvenus sont conformes à ceux obtenus par SIBOUKEUR (2005) (7,5 g/l) ; ATTIA *et al* (2001) (7,55 g/l). Un taux légèrement supérieur est noté par ALLOUI-LOMBARKIA *et al* (2007) (8,4 g/l). Alors que HADDADIN *et al* (2007), ont signalé le taux le plus faible (4,3 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).

**Tableau XI : Taux moyens des différentes fractions protéiques dans les échantillons de lait étudiés.**

Paramètres	Lait de chamelle étudié	(%)	Lait de vache local	(%)
PS	7,36 ± 0,93	25	4,41 ± 0,02	15
CN	23,36 ± 1,27	75	24,40 ± 0,79	85

PT : protéines totales ; PS : protéines sériques ; CN : caséines

### 3.1.8. Teneur en caséines

Les teneurs en caséines des échantillons de lait de chamelle analysés sont relativement proches. Le taux moyen enregistré est de 23,36 g/l (tableau X). Ce taux est légèrement inférieur à celui noté pour le lait de vache (24,40 g/l).

Des teneurs similaires ont été évoquées par KHASKHELI *et al* (2005) (22,1 g/l) et par ATTIA *et al* (2001) (20,60 g/l).

Toutefois, certains auteurs ont rapporté des teneurs inférieures : 19,7 g/l (KAMOUN, 1995) ; 19,8 g/l (HADDADIN *et al*, 2007) ; 19,8 et 21,3 g/l (ALLOUI-LOMBARKIA *et al*, 2007). SIBOUKEUR (2005) a signalé un taux important (28,15 g/l).

Il est admis que, comparativement au lait bovin, le lait de dromadaire est pauvre en caséines, protéines responsables de la consistance du lait coagulé et son équilibre minéral, ce qui amplifie son inaptitude à la coagulation (KAMOUN, 1995).

En plus, de l'effet saison qui constitue un facteur déterminant dans la variation de la composition physico-chimique du lait de chamelle, les variations enregistrées reflètent également, des différences de race, de stade de lactation, d'échantillonnage ainsi que des méthodes analytiques utilisées.

### 3.2. Isolement et caractérisation électrophorétique des protéines sériques totales

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-native (figure 13) montre une grande similitude et homogénéité entre les trois échantillons de lait étudiés. Sur l'électrophorogramme figurent cinq bandes principales (A, B, C, D et E).

Dans le cas du lait bovin, les protéines sériques migrent également en cinq bandes. En s'appuyant sur des données bibliographiques, nous pouvons les distinguer selon l'ordre croissant de leurs mobilités : Igs < BSA <  $\alpha$ -La <  $\beta$ -Lg.

Les Igs ont une mobilité très faible, vue leur PM très élevé qui ne leur permet pas de migrer plus loin. Une bande bien focalisée constituant la BSA, suivie de l' $\alpha$ -La, et enfin 2 autres bandes intenses correspondent aux 2 variants génétiques de la  $\beta$ -Lg.

Dans le cas du lait camelin, la bande (A) de très faible intensité se trouvant au même niveau que les Igs bovins pourrait correspondre à leurs homologues camelins. La bande (B) intense et qui migre au même niveau que la BSA pourrait correspondre à cette protéine dans le lait de dromadaire (CSA). Quant à la bande (D), elle désigne l' $\alpha$ -La cameline. Celle-ci se situe au même niveau que la protéine bovine. Les deux bandes (C) et (E) qui n'ont pas d'homologues bovins, pourraient correspondre aux variants génétiques de l' $\alpha$ -La cameline. En effet, plusieurs travaux (CONTI *et al*, 1985 ; BEG *et al*, 1985 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998) ont fait état de la présence de deux formes génétiques de l' $\alpha$ -La cameline. Ces deux variants diffèrent dans leur pHi (estimés à 5,1 et 5,3 par CONTI *et al* (1985) et dans leurs séquences N-terminales (OCHIRKHUYAG *et al*, 1998). Trois variants ont été détectés dans le lait de Lama par CANTISANI *et al* (1990), ce qui montre la variabilité génétique de cette protéine dans la famille des Camelidae.

Notons que, ces mêmes entités protéiques majeures du lait camelin ont été détectées et identifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide par FARAH (1986) ; OCHIRKHUYAG *et al* (1998) et LEVIEUX *et al* (2006).

Nous notons également l'absence de la bande homologue à la  $\beta$ -Lg bovine, rejoignant ainsi les résultats publiés par plusieurs auteurs (FARAH, 1986 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998 ; MERIN *et al*, 2001 ; FARAH *et al*, 2004). YOUCEF *et al* (2009), à partir de techniques immunologiques, ont noté aussi l'absence de cette protéine dans les échantillons de lait issus de dromadaires algériens.

En PAGE-SDS, les profils électrophorétiques obtenus (figure 14), révèlent la présence de bandes bien focalisées, d'intensités variables. Ces bandes sont notées (de I à XI) selon l'ordre de leur migration croissante. La distribution de ces bandes est légèrement hétérogène. On remarque que les bandes I, II, III et VII sont communes pour les 3 échantillons, La bande VI se trouve dans E2 et E3, alors que la bande V, ne caractérise que l'échantillon E2.

Les MM des entités protéiques détectées sont estimées par une courbe de calibration du gel par le moyen de protéines standards, avec un facteur de corrélation de 0,941 (figure 11). Ces MM sont rapportées dans le tableau (XII).

La PAGE-SDS des protéines sériques du lait de vache révèle 6 bandes dénommées I, II, III, V, IX et XI selon leurs mobilités croissantes.

Les bandes (I), (II), (III), (V) sont très fines avec des MM de 71,6 ; 67,9 ; 61,37 et 45,08 kDa, respectivement. Alors que les bandes (IX) et (XI) sont très intenses, la bande (IX) avec une MM de 17,9 kDa caractérise la  $\beta$ -Lg. la bande (XI) migre au même niveau que l' $\alpha$ -La alors que sa MM est estimée à 12,5 kDa qui est très inférieure à la MM de l' $\alpha$ -La bovine rapportée généralement par la bibliographie (14 kDa). Cependant, cette valeur concorde avec les résultats de ZHANG *et al* (2005) qui ont estimé la MM de cette protéine à 11,2 kDa.

L'examen du profil électrophorétique caractérisant les échantillons de lait camelin étudiés, révèle que les 3 bandes communes aux 3 échantillons (I, II, VII) qui sont très intenses.

La bande (VII) de 14,5 kDa correspondrait à l' $\alpha$ -La cameline. La MM de cette protéine déterminée dans cette étude, est similaire à celle rapportée par BEG *et al* (1985) (14,6 kDa).

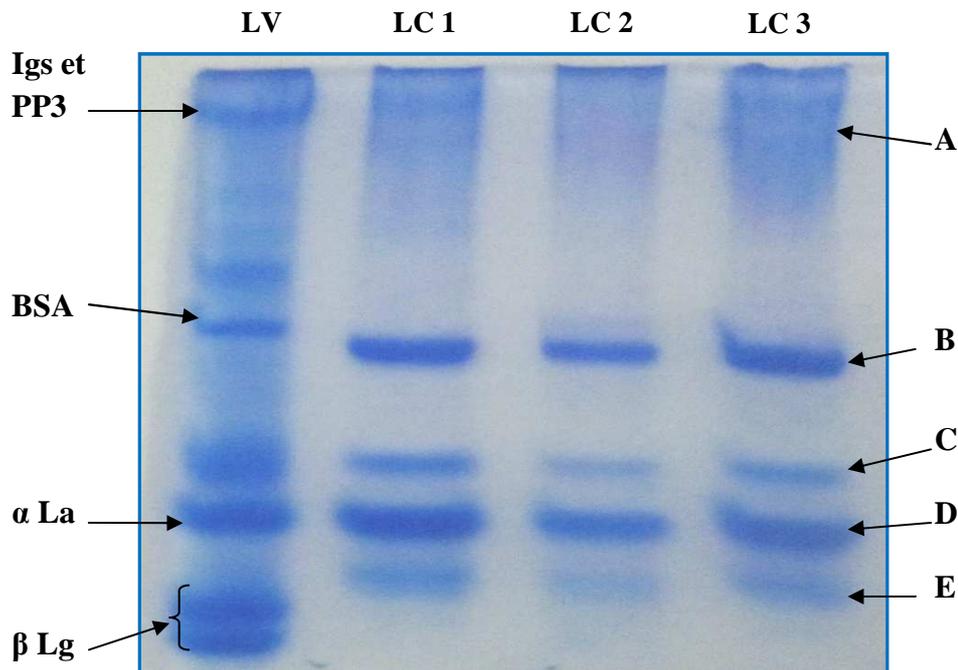


Figure 13 : Profil électrophorétique des protéines du lactosérum en PAGE-native (T= 12% ; C=2.9% ; pH 8.9) ; LV : lait de vache ; LC1, LC2 et LC3 : échantillons de lait de chamelle collectés.

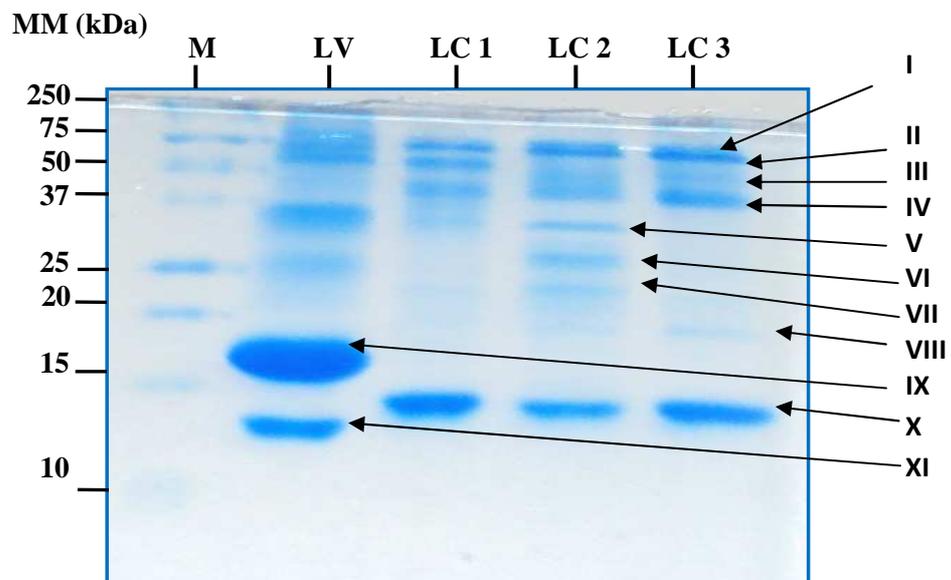


Figure 14 : Profil électrophorétique des protéines du lactosérum en PAGE-SDS ; gel de séparation (T= 15.4% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ; gel de concentration (T= 4% ; C= 2.7 % ; pH 6.8) ; LV : lait de vache ; LC1, LC2 et LC3 : échantillons de lait de chamelle collectés ; M : protéines étalons.

**Tableau XII : Comparaison des MM des protéines sériques camelines et bovines mesurées (kDa) en PAGE-SDS avec les MM rapportées dans la bibliographie.**

Protéines seriques	Lait de chamelle						Lait de vache		
	Présente étude	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	Présente étude	(6)	(7)
<b><math>\alpha</math>-La</b>	14,5	14,6	14	nd	nd	nd	12,5	11,2	14,4
<b>SA</b>	67,9	nd	66	69,6	66	70	67,9	65,4	69
<b><math>\beta</math>-Lg</b>	-	nd	nd	nd	nd	nd	17,9	nd	18
<b>Lf</b>	71,6	nd	nd	79,5	nd	nd	71,6	76,9	nd

(1) : BEG *et al* (1985) ; (2) : FARAH (1986) ; (3) : ELAGAMY (1996) ; (4) : MERIN *et al* (2001) ; (5) : LEVIEUX *et al* (2006) ; (6) : ZHANG *et al* (2005) ; (7) : PATY *et al* (2003) ; nd : non déterminé.

Les 2 bandes (I et II) sont contigües et très intenses. Leurs MM respectives sont évaluées à 71,6 et 67,9 kDa. Selon les données bibliographiques, ces bandes correspondraient à la lactoferrine (71,6 kDa) et à l'albumine sérique cameline (67,9 kDa).

La CSA et la BSA migrent au même niveau. Leurs MM sont très proches. La MM de la CSA déterminée dans la présente étude est proche de celle rapportée par ELAGAMY (1996) (69,6 kDa), mais elle est supérieure à celle avancée par FARAH (1986) ; MERIN *et al* (2001) et par EREIFEJ *et al* (2011) à savoir 66 kDa.

Quant à la lactoferrine, elle est présente dans le lait camelin en quantités détectables (EL HATMI *et al*, 2007 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2008). En PAGE- SDS elle migre avec la CSA en bandes très contigües (ZHANG *et al*, 2005 ; EL HATMI *et al*, 2006a ; 2006b). Dans les échantillons analysés, le PM de cette protéine est estimé à 71 600. Il est relativement inférieur aux PM rapportés par différents auteurs (75 200 selon KAPPELER *et al* (1999a) ; 79 500 selon ELAGAMY (1996) et 80 000 selon EREIFEJ *et al* (2011)).

Comme révélé en PAGE native, aucune bande homologue à la  $\beta$ -Lg bovine n'a été détectée dans les échantillons analysés. L'absence de cette protéine semble être une spécificité au lait camelin (FARAH, 1986 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1998 ; MERIN *et al*, 2001 ; LEVIEUX *et al*, 2006 ; EL HATMI *et al*, 2006a ; YOUCEF *et al*, 2009).

En plus de ces bandes identifiées par comparaison aux données bibliographiques, nous notons la présence de 4 bandes très fines de PM respectifs évalués à : 28 370 ; 30 000 ; 50 000 et 61 370 dont la nature reste à déterminer. La littérature a fait état de présence d'entités protéiques inconnues de MM très variables selon les auteurs. Dans ce contexte, FARAH (1986) a détecté par PAGE-SDS deux protéines de 23 et 43 kDa, en plus de la CSA et de l' $\alpha$ -La. De même, MERIN *et al* (2001) ont révélé la présence de 3 bandes inconnues de 23, 32 et

43 kDa. De leur côté, EREIFEJ *et al* (2011) ont détecté plusieurs bandes de PM différents (10 000, 11 400, 11 800, 16 300, 17 000, 18 000, 29 200 et 56 500) sur des échantillons de lait de chamelle en Jordanie.

Il faut aussi signaler que les MM des chaînes lourdes et légères des IgG1 sont estimées par ELAGAMY (1996) à 28,5 et 60 kDa, ce qui semble correspondre aux MM des bandes signalées plus haut.

### **3.3. Isolement des séroprotéines par chromatographie**

Vu le grand intérêt que présentent les protéines du lactosérum sur le plan fonctionnel et biologique, la mise en œuvre de méthodes faciles et peu coûteuses pour leur isolement et purification est toujours un objectif analytique qui suscite de l'intérêt. Pour cela, plusieurs protocoles d'isolement ont été développés initialement sur les protéines sériques bovines avant d'être appliqués sur d'autres laits de différentes espèces.

A côté des méthodes de fractionnement classiques utilisant le plus souvent la précipitation des protéines par les sels qui aboutissant généralement à des niveaux de pureté faibles, les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et la purification des protéines que ce soit en basse ou à haute pression.

Dans ce cadre, nous avons essayé de fractionner les protéines sériques camelines en une seule étape en utilisant la chromatographie de perméation sur Sephacryl S200. Après plusieurs essais d'optimisation des paramètres de séparation, les séroprotéines camelines ont été éluées comme indiqué dans le chromatogramme (figure 15-A) en trois pics notés I, II et III.

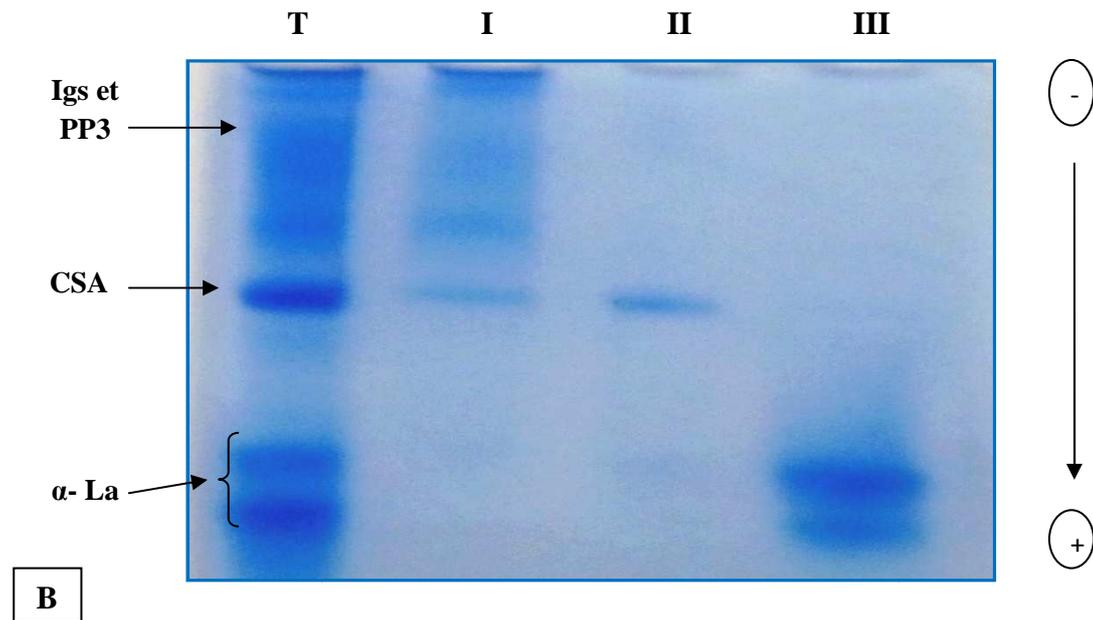
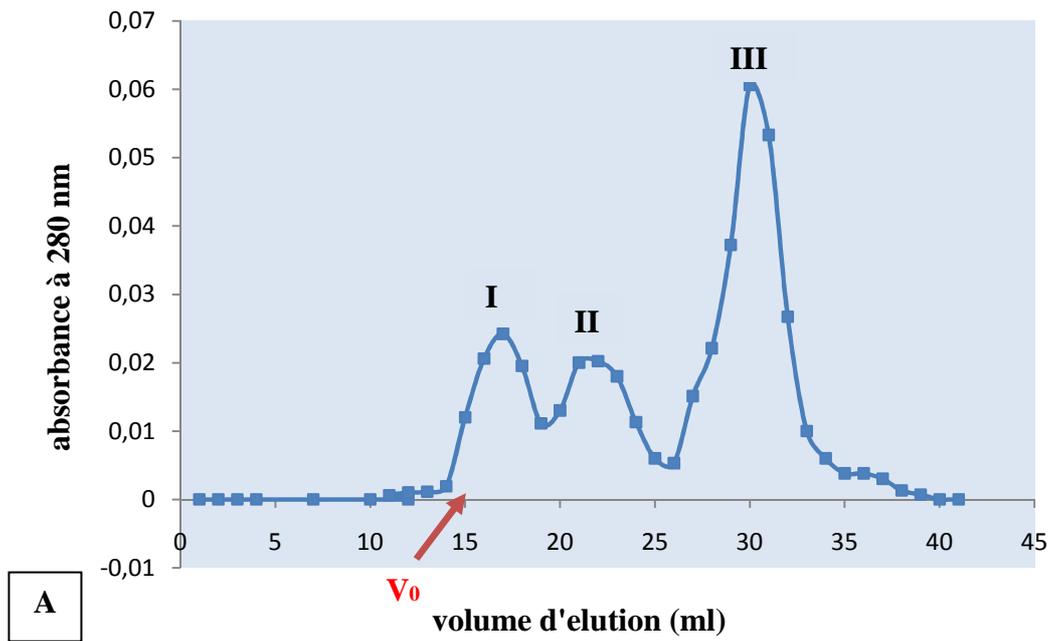
Le contrôle électrophorétique (figure 15-B) réalisé sur ces fractions a montré que la fraction (I), correspondrait principalement aux Igs élués avec des traces de CSA. La fraction (II) correspond à la CSA. Et enfin, la fraction (III) contiendrait l' $\alpha$ -La avec ses deux variants.

Il ressort de ces résultats que le procédé de séparation utilisé est intéressant sur les séroprotéines camelines, du fait qu'il permet d'obtenir en une seule étape les deux variants de l' $\alpha$ -La avec un haut degré de pureté.

Plus généralement, cette chromatographie a été utilisée de façon avantageuse pour le fractionnement des protéines sériques du lait de plusieurs espèces. Ainsi, FELIPE et ANDREW (1997) ont appliqué le Superdex en FPLC pour séparer les séroprotéines du lait de vache, de brebis et de chèvre aboutissant à une très bonne séparation de la  $\beta$ -Lg et de l' $\alpha$ -La. YOSHIDA (1990), en utilisant le Sephacryl S200, a obtenu 5 pics principaux sur le lait bovin qui ont été par la suite purifiés par d'autres méthodes. NEYESTANI *et al* (2003) de leur côté, ont utilisé le Sephadex G50 pour l'isolement de l' $\alpha$ -La bovine après avoir précipité les globulines au sulfate d'ammonium à un seuil de 50% .

Sur le lait camelin, BEG *et al* (1984 ; 1985) ; EL-HATMI *et al* (2006) ainsi que KONUSPAYEVA *et al* (2008) ont utilisé la perméation sur le Sephadex G100 / G200 pour séparer certaines protéines sériques.

Le protocole utilisé dans cette étude est intéressant, cependant, la séparation des protéines sériques avec une pureté plus élevée impose le recour à d'autres méthodes chromatographiques plus fines (chromatographie d'affinité, HPLC...).



**Figure 15 : Chromatographie de perméation des protéines sériques camelines sur Sephacryl S200 ; Colonne (1,5 × 30 cm) ; Tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8 ; 0,2 M NaCl ; Dépôt 20 mg de protéines ; Débit d'élution : 28 ml/h.**  
**A : chromatogramme obtenu ; B : image en électrophorèse PAGE-native des fractions éluées (I ; II et III).**

### 3.4. Dénaturation thermique des protéines sériques

La connaissance de l'effet du traitement thermique sur les protéines sériques est d'une importance considérable pour la compréhension des changements dans les propriétés biologiques et fonctionnelles du lait qui apparaissent durant les processus technologiques (LEVIEUX *et al.*, 2006). Ces modifications ont été largement étudiées sur les protéines sériques du lait de vache, alors que très peu d'études ont été consacrées aux séroprotéines du lait de chamelle.

#### 3.4.1. Sensibilité au chauffage des protéines sériques totales

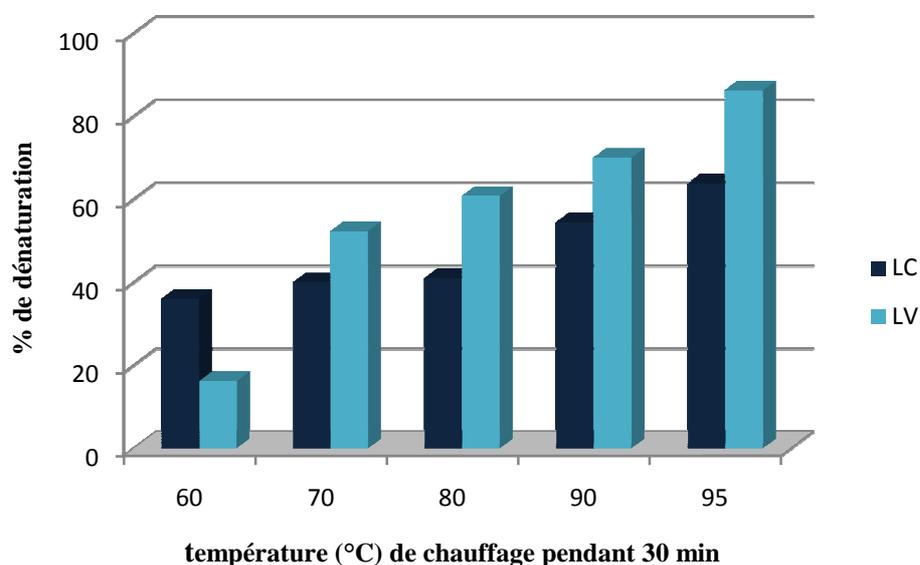
##### 3.4.1.1. Taux de dénaturation thermique

Comme il apparaît sur la figure (16), les effets de la thermodénaturation sont proportionnels à l'élévation du temps et de la température du chauffage. Les protéines sériques du lait de vache montrent des pourcentages de dénaturation les plus élevés.

A 60°C/30 mn, un faible taux de dénaturation (environ 16,27%) est noté pour le lait de vache. Alors qu'il est plus important dans le lait de chamelle (36,06%).

A 80°C pendant la même durée, nous observons que plus de la moitié (environ 60,80%) des séroprotéines bovines sont dénaturées. Dans le lait de chamelle ce taux est de 41%.

La dénaturation thermique des protéines sériques camelines a tendance à progresser lentement. Alors qu'elle est plus prononcée dans le lait de vache.



**Figure 16 : Représentation des taux de dénaturation des protéines sériques après traitement thermique à : (1) 60°C ; (2) 70°C ; (3) 80°C ; (4) 90°C ; (5) 95°C pendant 30min. LC : lait de chamelle ; LV : lait de vache.**

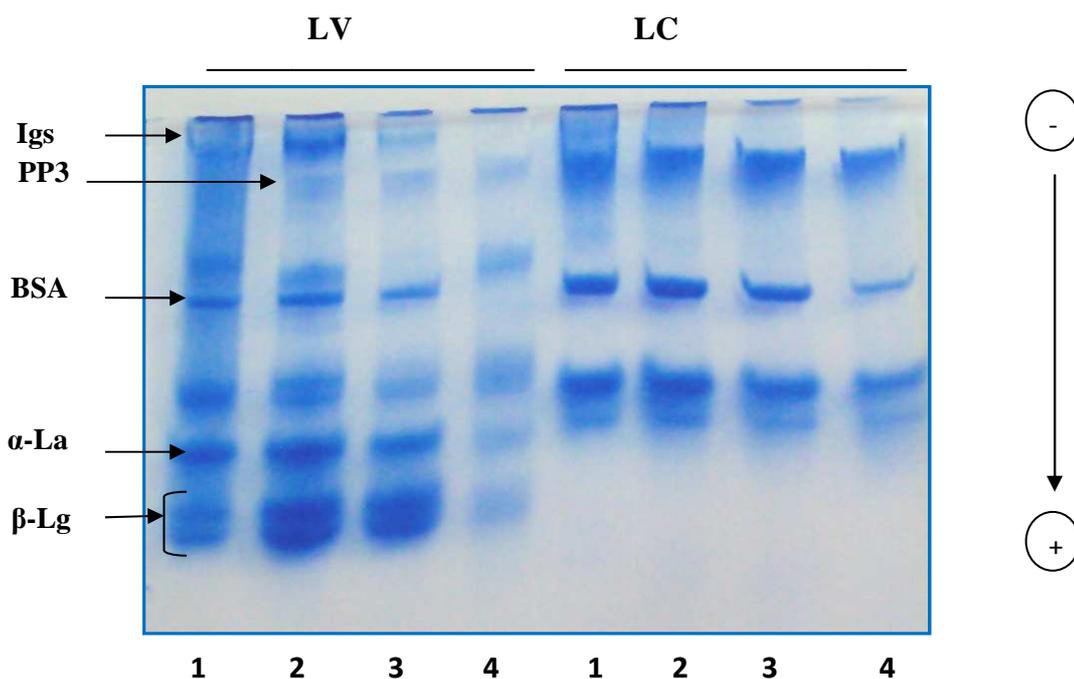
A 90 et 95°C pendant 30 minutes, les taux de la dénaturation thermique mesurés dans le lait de dromadaire sont de 54,40 et 63,78% respectivement. Dans le lait de vache, la dénaturation des protéines est estimée dans ces conditions à 70,00 et 86,27% respectivement (figure 20).

La sensibilité au chauffage des protéines sériques s'explique selon (JENESS, 1954 ; PARRIS *et al*, 1991 ; OLDFIELD *et al*, 1998) par la présence de la  $\beta$ -Lg. La fonction thiol de cette protéine est activée par le chauffage et réagit avec d'autres protéines par formation de complexes, tel que le complexe  $\beta$ -Lg- $\alpha$ -La. L'absence de cette protéine dans le lait de chamelle expliquerait en partie la stabilité des séroprotéines sériques dans ce lait.

Les résultats des taux de dénaturation de la présente étude se rapprochent de ceux rapportés par FARAH (1986) ; AL SALEH (1996) ; WANGOH (1997) et WERNERY *et al* (2003).

### 3.4.1.2. Comportement électrophorétique

Comme signalé précédemment par FARAH (1986) et ELAGAMY (1996), le chauffage des échantillons de lait à 60°C pendant 30 minutes n'apporte aucun changement dans les profils électrophorétiques (figure 17).



**Figure 17 : Electrophorègramme en PAGE-native (T= 12% ; C= 2.9% ; pH 8.9) des protéines sériques camelines et bovines après différents traitements thermiques. LV : lait de vache ; LC : lait de chamelle ; 1 : lait cru ; 2, 3 et 4 : chauffages à 60°C, 70°C et 80°C/30 min respectivement.**

L'élévation des températures de chauffage à 70 et 80°C pendant 30 minutes, montre un changement net dans le comportement de ces protéines où l'intensité des bandes caractéristiques a tendance à baisser. Ceci est surtout dans le cas du lait de vache (surtout à 80°C/30 minutes).

Dans ces conditions, nous notons la disparition de la bande caractéristique de l'albumine sérique bovine. Cependant, cette bande n'est pas affectée par ce traitement thermique dans le lait camelin. Il apparaît clairement que la CSA résiste à un traitement thermique plus poussé.

Ces essais ainsi que les conclusions de FARAH (1986); ELAGAMY (2000) et LEVIEUX *et al* (2006), indiquent que la dénaturation de cette protéine survient après un traitement thermique de 90°C/30 minutes.

L' $\alpha$ -La cameline montre une thermostabilité importante. Cette protéine résiste à un traitement au delà de 95°C/30 minutes (figure 19). Quant à son homologue dans le lait bovin, elle est dénaturée après un chauffage de 90°C/20 minutes (figure 18). Cependant, LIN *et al* (2010) ont signalé, que cette protéine bovine résiste à un traitement plus poussé. Cette thermostabilité de l' $\alpha$ -La est expliquée selon CAYOT et LORIENT (1998) par la réversibilité de sa dénaturation. Ces auteurs ont observé qu'à partir d'un chauffage de 65°C, un taux de 80 à 90% de cette protéine revient à sa structure native. Une dénaturation irréversible est obtenue après un chauffage de 100°C/10 minutes.

La résistance au traitement thermique de l' $\alpha$ -La cameline a été rapportée par WERNERY *et al* (2003) et LEVIEUX *et al* (2006).

En plus de ces observations, nous décelons suite au chauffage du lait de chamelle deux bandes électrophorétiques de très faible intensité (figure 19-B). Les masses moléculaires de ces entités protéiques sont estimées à 44 500 et 15 100 Da. Ces bandes pourraient correspondre à des complexes protéiques résultants du chauffage (JOVANOVIC *et al*, 2007).

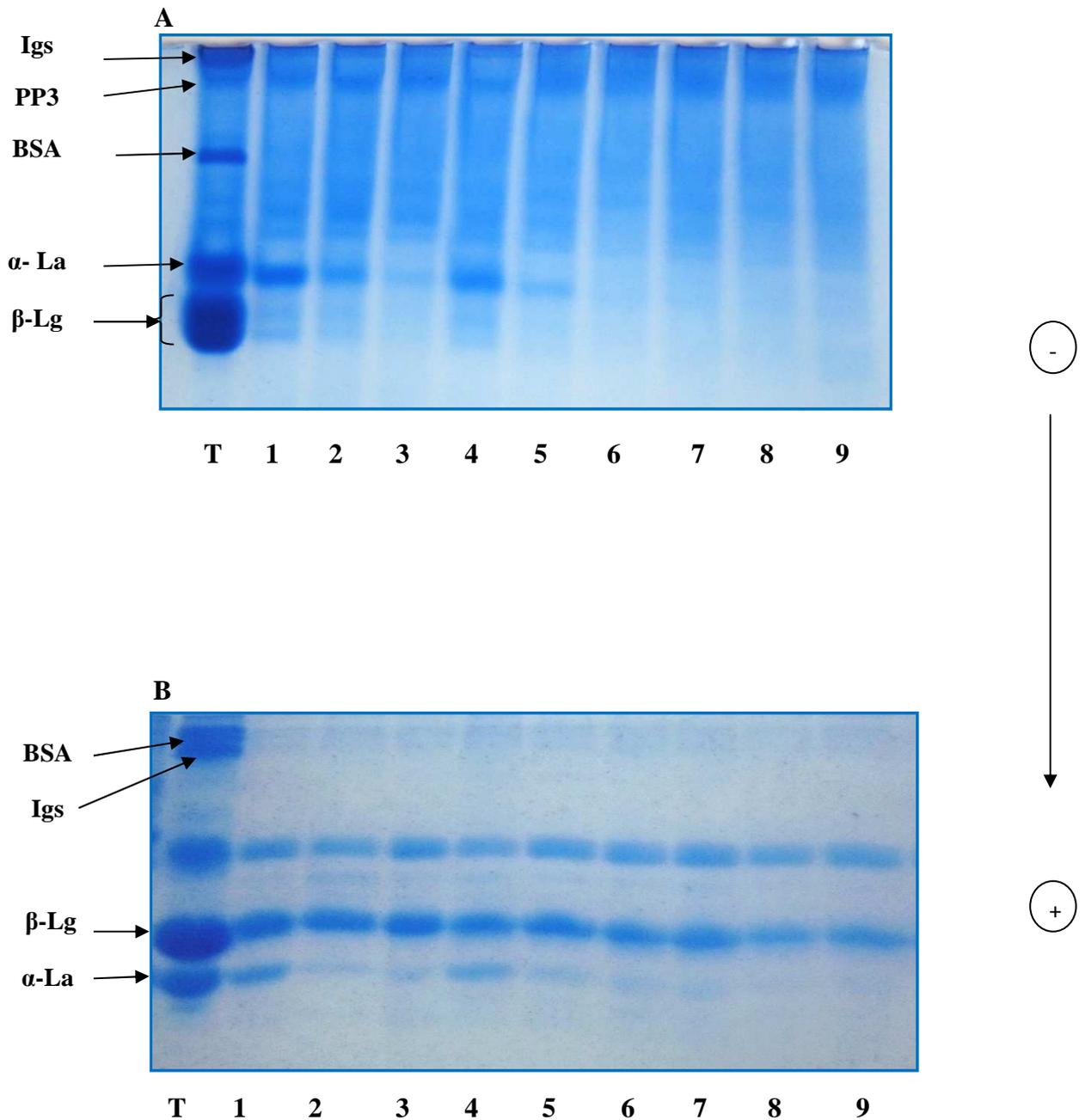
### **3.4.2 Sensibilité au chauffage des protéose peptones**

La thermosensibilité des protéose-peptones a été testée en effectuant des chauffages à des températures extrêmes : 90 et 95°C pendant 10, 20 et 30 minutes. Dans ces conditions, seule cette fraction du lactosérum qui reste soluble.

Il apparaît clairement sur les diagrammes en PAGE-SDS (figures 18 et 19), que cette fraction protéique résiste à un chauffage de 95°C/45 minutes dans les deux laits bovin et camelin.

Le composant-3 dans cette fraction présente la plus grande stabilité thermique dans les deux laits étudiés.

En poussant le chauffage de 95°C pendant 40, 50 et 60 minutes (figure 23), nous avons observé une diminution progressive de l'intensité des bandes caractérisant les PPT. Ce constat est d'autant plus prononcé sur le lait de chamelle après un traitement de 95°C/60 minutes.

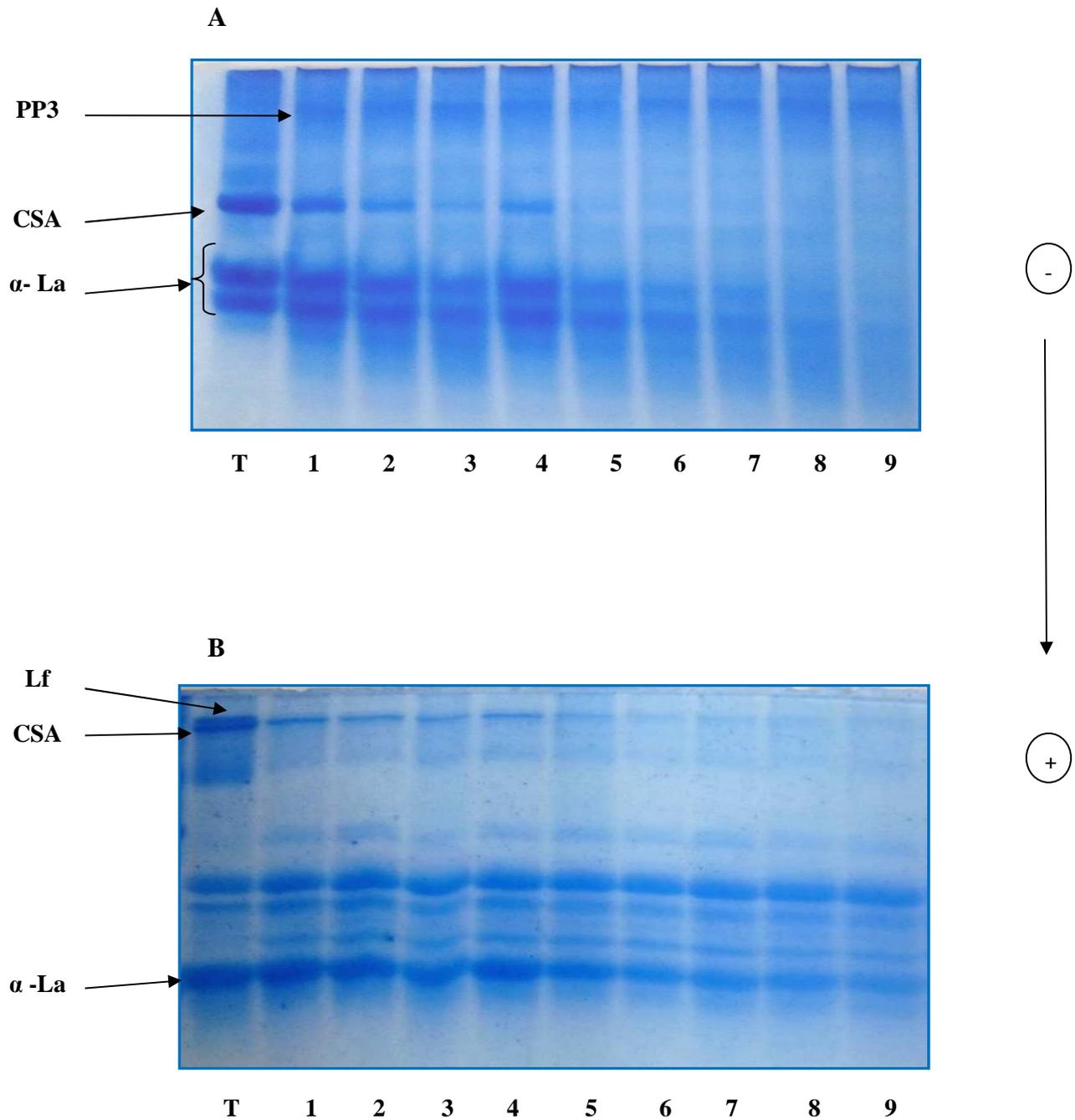


**Figure 18 : Electrophorègrammes des protéines sériques bovines après traitement thermique.**

**A : PAGE native (T= 12% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ;**

**B : PAGE-SDS ; gel de séparation (T= 15.4% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ; gel de concentration (T= 4% ; C= 2.7 % ; pH 6.8) ;**

**T : lait de vache cru ; 1, 2, 3 : chauffages à 90°C /10, 20 et 30 min respectivement ; 4, 5, 6, 7, 8 et 9 : chauffages à 95°C/ 10, 20, 30, 35, 40 et 45 min respectivement**



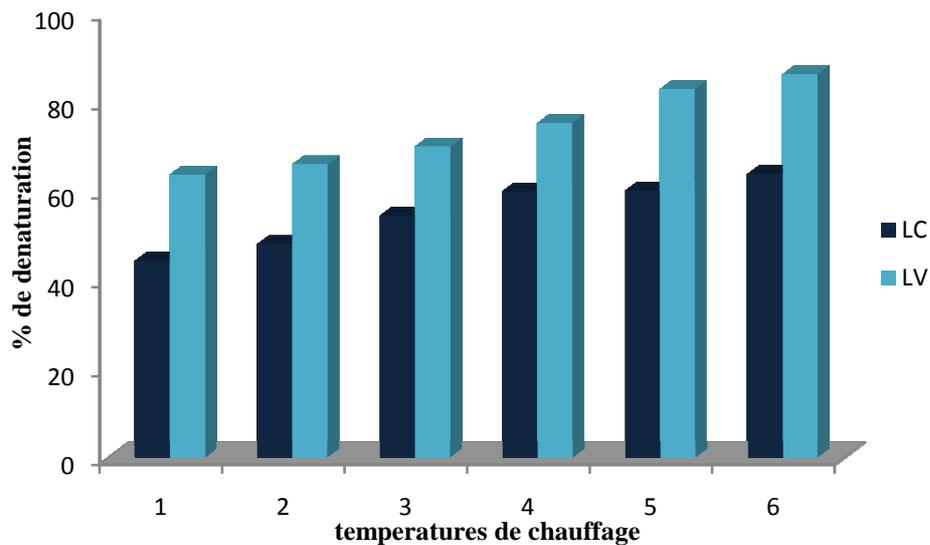
**Figure 19 : Electrophorègrammes des protéines sériques camelines après traitement thermique.**

**A : PAGE native (T= 12% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ;**

**B : PAGE-SDS ; gel de séparation (T= 15.4% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ; gel de concentration (T= 4% ; C= 2.7 % ; pH 6.8) ;**

**T : lait de chamelle cru ; 1, 2, 3 : chauffages à 90°C /10, 20 et 30 min respectivement ; 4,**

**5, 6, 7, 8 et 9 : chauffages à 95°C/ 10, 20, 30, 35, 40 et 45 min respectivement.**



**Figure 20 : Représentation des taux de dénaturation des protéines sériques après traitements thermiques à : (1) 90°C/10 ; (2) 90°C/20 ; (3) 90°C/30 ; (4) 95°C/10 ; (5) 95°C/20 ; (6) 95°C/30min.**

### 3.5. Isolement et caractérisation électrophorétique des protéose-peptones

#### 3.5.1. Protocole d'isolement

A l'issue des résultats de la dénaturation thermique des protéines sériques, nous avons essayé de caractériser les protéose-peptones totales du lait camelin. Le protocole adopté pour cela est celui de PAQUET et ALAIS (1982) appliqué sur le lait de vache et repris par MATI *et al* (1991) sur le lait de chèvre et de brebis.

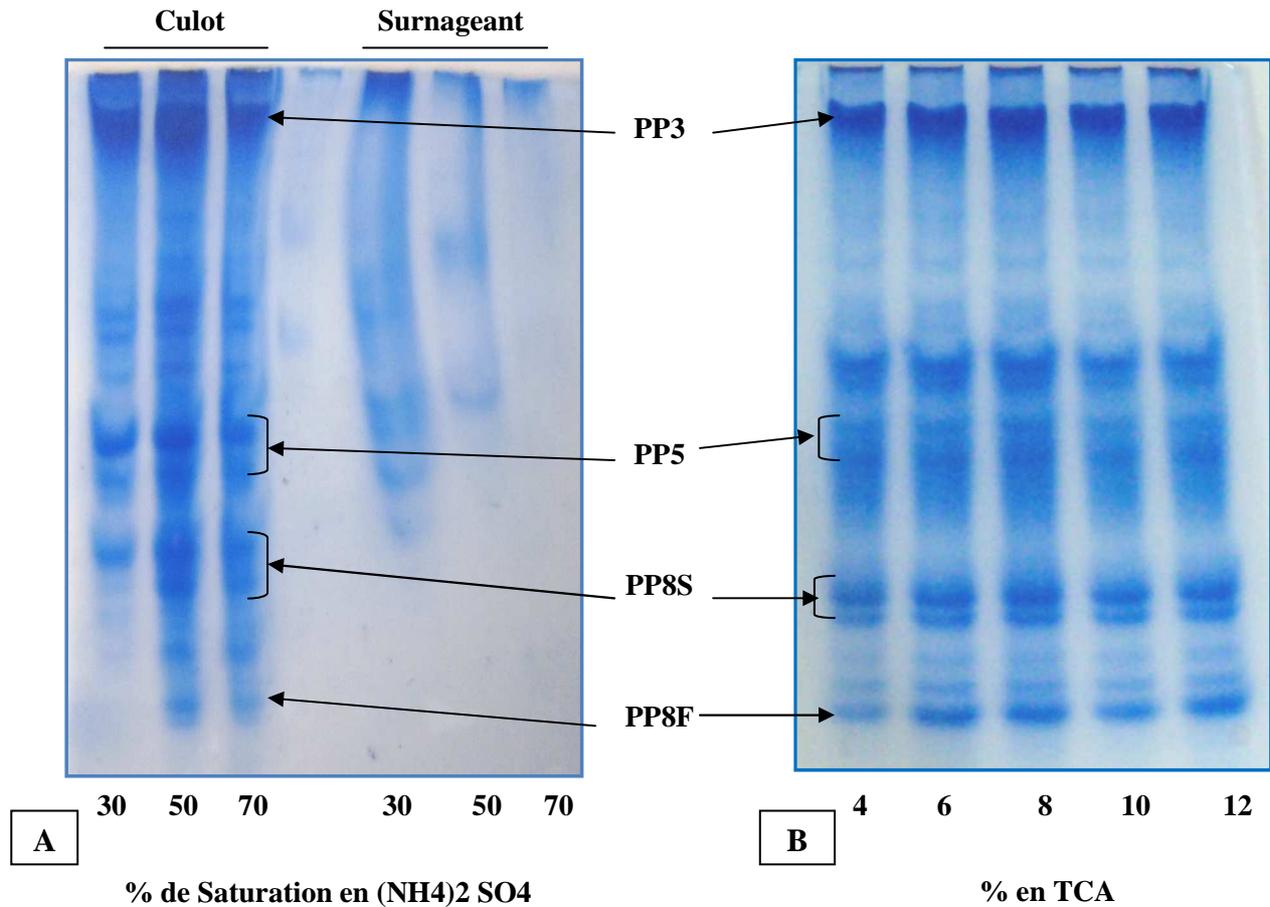
Ce protocole repose sur la sélection des PPT par chauffage à 95°C/30 minutes. Les PPT sont isolés par précipitation au sulfate d'ammonium et au TCA. De ces essais, il ressort que le sulfate d'ammonium à 70% précipite la totalité des PPT contenus dans le surnageant.

A 50% de saturation, la presque totalité des PPT précipite, mais certains résidus sont observés dans le surnageant de centrifugation.

Le traitement du même STC au TCA à différentes concentrations aboutit à l'insolubilisation de la totalité des composants des PP à partir de 6% de TCA (P/V).

Selon MATI (1992), les PPT du lait bovin et caprin précipitent au sulfate d'ammonium au seuil de 50% de saturation et au TCA à 12%.

Le profil électrophorétique en PAGE native de la fraction PPT du lait de chamelle obtenu par l'action du TCA à 12% en concentration finale ressemble à celui obtenu avec du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 70 et à 50%.



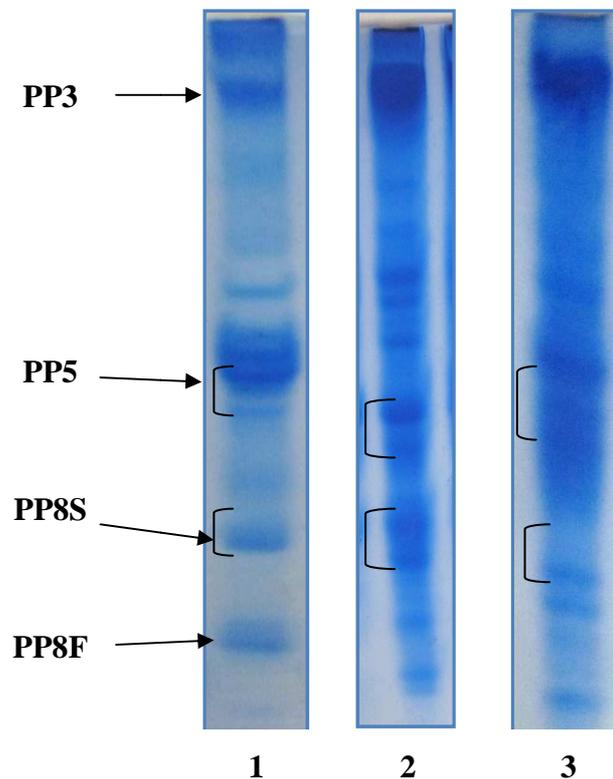
**Figure 21 : Effet du sulfate d'ammonium (A) et du TCA (B) à différentes concentrations sur la précipitation des protéose peptones totales du lait de chamelle, profils électrophorétiques des différentes préparations obtenues en PAGE native (T= 12%, pH 8, 9).**

De ces essais, nous concluons que le protocole d'isolement des PPT par thermocoagulation appliqué sur le lait de vache (PAQUET et ALAIS, 1982), ainsi que sur le lait de chèvre (MATI, 1992) peut être appliqué avec succès sur le lait de chamelle.

### 3.5.2. Caractérisation électrophorétique

Les profils électrophorétiques des PPT du lait de chamelle et du lait de vache sont caractérisés par l'apparition de plusieurs bandes d'intensités différentes. En se référant aux données bibliographiques, nous avons essayé de situer les composants majeurs des PPT.

Dans le lait bovin, nous distinguons : le PP3 sous forme d'une bande intense et de très faible mobilité. Le doublet central est assimilé au PP5 alors que PP8 « S » et PP8 « F » ont les mobilités les plus élevées.

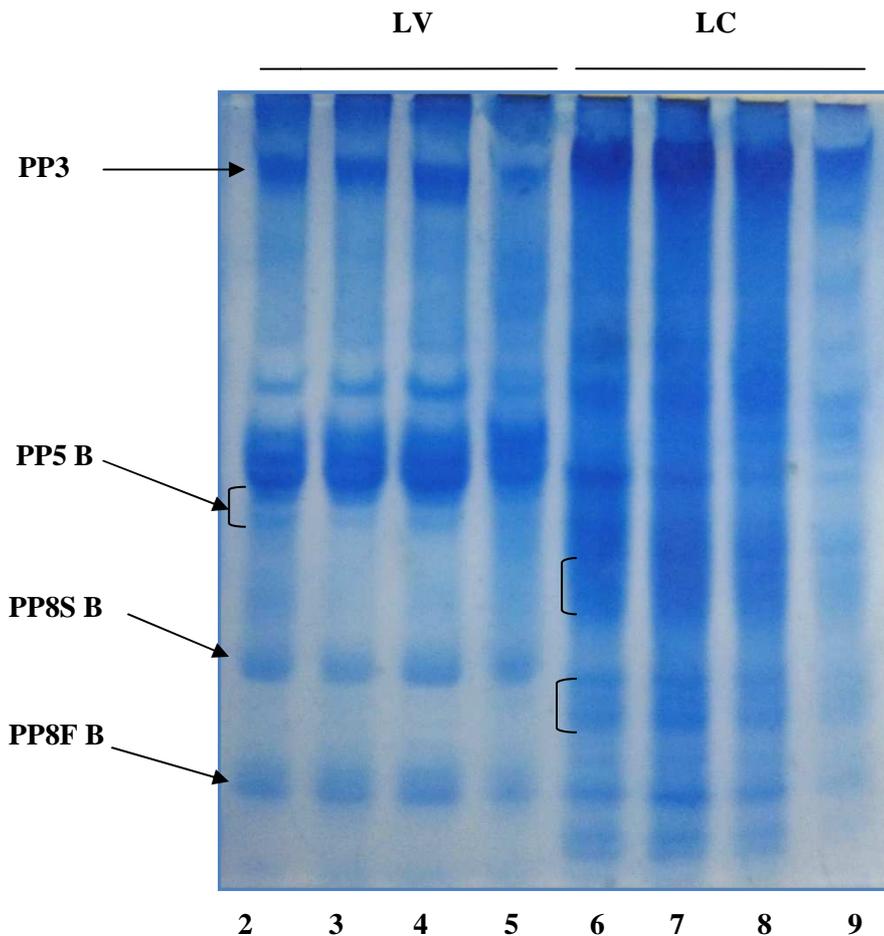


**Figure 22 : Profils électrophorétiques en PAGE native des PP du lait de chamelle.**  
**1 : PP du lait de vache, précipités au TCA 12% ; 2 : PP du lait de chamelle précipités au**  
**(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 70%; 3 : PP du lait de chamelle précipités au TCA 12%**

Confrontant ce schéma électrophorétique au profil obtenu pour les PPT du lait camelin, nous observons une ressemblance dans les profils obtenus pour les deux laits. Nous notons, cependant, une différence dans les niveaux de migration et l'intensité des bandes électrophorétiques. Les composants de la fraction PP cameline sont légèrement plus mobiles que leurs homologues du lait bovin. Le PP3 se manifeste par une bande très intense. Cette intensité est corrélée à l'abondance de cette protéine dans le lait camelin. Selon KAPPELER *et al* (1999b), la concentration du PP3 dans le lait de chamelle est estimée à 900 mg/l. Le taux de cette protéine dans le lait bovin est de 300 mg/l.

Malgré qu'il y'a très peu d'études qui ont été consacrées aux protéose-peptones dans le lait camelin, SMAIL (2002) a montré que le PP5 et PP8 sont comme leurs analogues bovins libérés suite à l'hydrolyse de la  $\beta$ -CN cameline.

Les conclusions de BAER *et al* (1994), ont montré que l'activité de la plasmine sur la  $\beta$ -CN du lait de chamelle est semblable à celle notée dans le lait de vache. KAPPELER *et al* (1998) ont séquencé la  $\beta$ -CN cameline, et ont rapporté 64% d'homologie structurale avec la protéine bovine. De cela, les mêmes sites d'action de la plasmine sont identifiés dans les deux



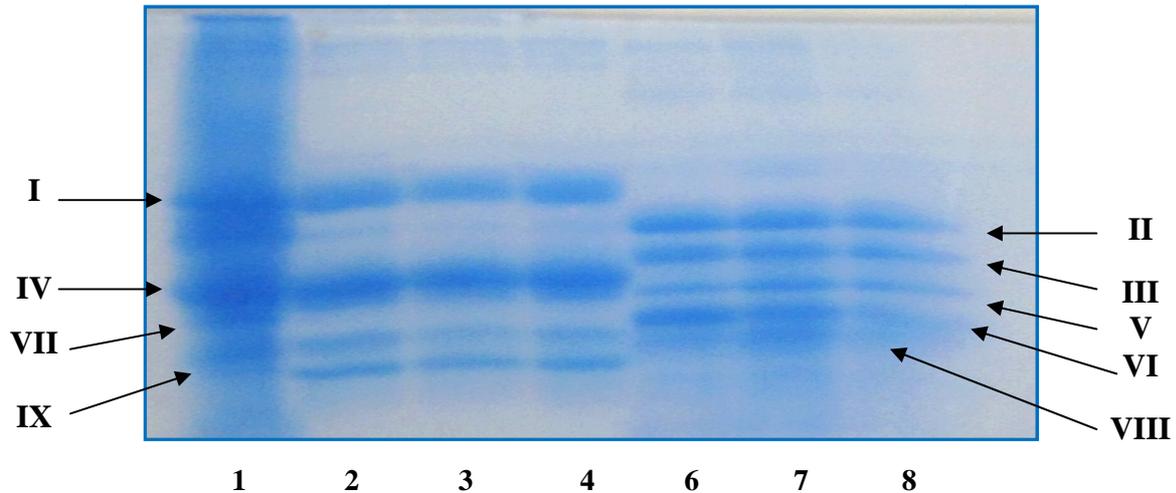
**Figure 23: Profils électrophorétiques des protéose peptones totales (PPT) en PAGE native (T= 12% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ; 2, 3, 4, 5 : PP du lait de vache isolés après traitement à 95°C/ 30-40-50-60 min ; 6, 7, 8, 9 : PP du lait de chamelle isolés après traitement à 95°C/ 30-40-50-60 min ; B: bovin.**

Structures, avec deux substitutions (Lys<sup>29</sup> et His<sup>106</sup> dans le lait bovin sont remplacés par Gln<sup>29</sup> et Arg<sup>107</sup> dans le lait camelin) (figure 25).

Les MM de la fraction PPT sont évaluées en PAGE-SDS (figure 24). Dans le lait bovin comme dans le lait ovin, les PP migrent en quatre bandes principales nommées (I), (IV), (VII) et (IX).

Dans le lait de vache, La bande (I) (30 000 Da) pourrait être attribuée au PP3 bovin. Les autres bandes de MM respectives : 17 900, 13 180 et 10 710 Da, correspondraient aux PP5, PP8S et PP8F. Bien que, les masses moléculaires obtenues dans cette étude ne concordent pas avec celles rapportées par PAQUET *et al* (1989).

La fraction PPT dans le lait camelin, se manifeste par un profil électrophorétique similaire à celui noté pour le lait de vache. Nous distinguons quatre bandes majeures (II, III, V et VI) et une bande (VIII) de très faible intensité.



**Figure 24 : Profils électrophorétiques des protéose peptones totales (PPT) en PAGE-SDS ; gel de séparation (T= 15.4% ; C= 2.9% ; pH 8.9) ; gel de concentration (T= 4% ; C= 2.7 % ; pH 6.8) ; 1 : PPT du lait de brebis ; 2, 3, 4: PP du lait de vache isolés après traitement à 95°C/ 30-40-50 min ; 6, 7, 8 : PP du lait de chamelle isolés après traitement à 95°C/ 30-40-50min.**

**Tableau XIII : Valeurs des MM des composants de la fraction PP cameline et bovine, estimés par PAGE-SDS (Da) dans la présente étude.**

MM (Da) de la Présente étude			Données bibliographiques			
Bandes	LV	LC		fractions	MM (Da)	référence
I	30 000	-	LV	PP5	11 500 et 14 300	PAQUET <i>et al</i> (1989)
II	-	23 000		PP8S	9900	
III	-	19 800		PP8F	3300 et 4100	
IV	17 900	-		PP3	28 000 et 18 000	
V	-	16 150	LC	PP3	15 000	BEG <i>et al</i> (1987)
VI	-	13 850			15 700 (variant A)	KAPPELER <i>et al</i> (1999)
VII	13 180	-			13 800 (variant B)	
VIII	-	11 870			22 500	GIRARDET <i>et al</i> (2000)
IX	-	10 710				

NH<sub>2</sub>-Arg-Glu-Lys-Glu-Glu-Phe-Lys-Thr-Ala-Gly-Glu-Ala-Leu-Glu-Ser<sup>\*</sup>-Ile-Ser<sup>\*</sup>-Ser<sup>\*</sup>-Ser<sup>\*</sup>-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-His-Ile-Asn-**Lys<sup>28</sup>-Gln<sup>29</sup>**-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Lys-Ile-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Gln-Gln-Asp-Lys-Ile-Tyr-Thr-Phe-Pro-Gln-Pro-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Ser-His-Thr-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr-Pro-Ile-Leu-Pro-Gln-Asn-Phe-Leu-Pro-Pro-Leu-Gln-Pro-Ala-Val-Met-Val-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Lys-Val-Met-Asp-Val-Pro-Lys-Thr-Lys-Glu-Thr-Ile-Ile-Pro-**Lys<sup>106</sup>-Arg<sup>107</sup>-Lys<sup>108</sup>-Glu<sup>109</sup>**-Met-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Pro-Phe-Thr-Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Leu-Gln-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Leu-Met-Tyr-Gln-Ile-Pro-Gln-Pro-Val-Pro-Gln-Thr-Pro-Met-Ile-Pro-Pro-Gln-Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Phe-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Gln-Met-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Ala-Met-Pro-Val-Gln-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Gln-Glu-Pro-Val-Pro-Asp-Pro-Val-Arg-Gly-Leu-His-Pro-Val-Pro-Gln-Pro-Leu-Val-Pro-Val-Ile-Ala-COOH

A

NH<sub>2</sub>-Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser<sup>\*</sup>-Leu-Ser<sup>\*</sup>-Ser<sup>\*</sup>-Ser<sup>\*</sup>-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-**Lys<sup>28</sup>**↓-**Lys<sup>29</sup>**-Ile-Glu-Lys-Phe-Gln-Ser<sup>\*</sup>-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys-Ile-His-Pro-Phe-Ala-Gln-Thr-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-his-Asn-Ser-Leu-Pro-Gln-Asn-Ile-Pro-Pro-Leu-Thr-Gln-Thr-Pro-Val-Val-Val-Pro-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Glu-Val-Met-Gly-Val-Ser-Lys-Val-Lys-Glu-Ala-Met-Ala-Pro-**Lys<sup>105</sup>**↓-**His<sup>106</sup>**-**Lys<sup>107</sup>**↓-**Glu<sup>108</sup>**-Met-Pro-Phe-Pro-Lys-Tyr-Pro-Val-Gln-Pro-Phe-Tyr-Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Val-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Pro-Leu-Leu-Leu-Gln-Ser-Trp-Met-His-Gln-Pro-His-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Thr-Val-Met-Phe-Pro-Pro-Gln-Ser-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Ser-Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Glu-Lys-Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Asp-Met-Pro-Ile-Gln-Ala-Phe-Leu-Leu-Tyr-Gln-Gln-Pro-Val-Leu-Gly-Pro-Val-Arg-Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Ile-Val-COOH

B

**Figure 25 : Structures primaires de la caséine β du lait de chamelle et du lait de vache.**

**A : β-CN cameline (KAPPELER *et al*, 1998) ; B : β-CN A1 bovine (PAQUET, 1989).**

**Les étoiles indiquent les sites de phosphorylations sur les résidus Ser. Les flèches indiquent les sites de coupure de la plasmine β-CN bovine. En gras et souligné, des sites similaires sur la β-CN cameline.**

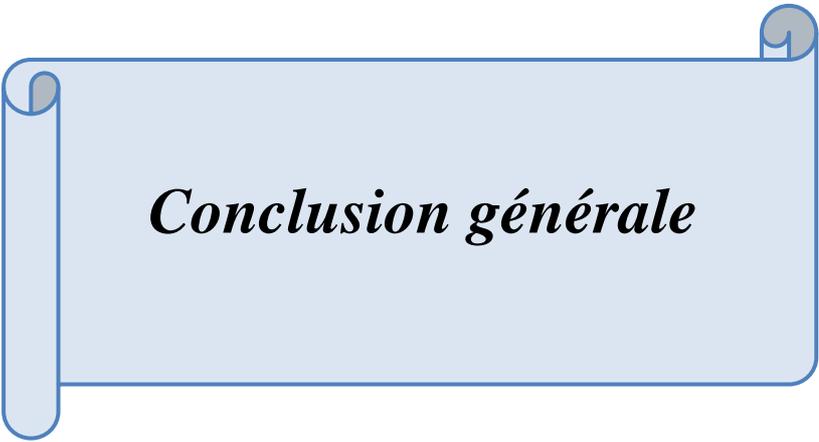
Leurs masses moléculaires respectives sont : 23 000, 19 800, 16 150, 13 850 et 11 870 Da. Ces MM se rapprochent de celles enregistrées dans le lait bovin.

La bande (II) (23 000 Da) correspondrait au PP3 camelin. Tandis que les bandes V, VI et VIII, pourraient être attribuées aux PP5, PP8S et PP8F.

Par ailleurs, la bande (III) (19 800 Da) correspondrait au 2<sup>ème</sup> variant génétique du PP3. La variabilité génétique de ce composant a été rapportée par KAPPLER *et al* (1999b). Ces derniers ont estimé les MM de ces deux variants à 15 700 Da pour le variant (A), et à 13 800 Da pour le variant (B). De même pour EREFEIJ *et al* (2011), ces auteurs ont rapporté des MM de 15 500 et de 12 400 Da pour les deux variants. Cependant, GIRARDET *et al* (2000) ont rapporté une MM de 22 500 Da.

Une grande hétérogénéité est notée pour le PP3 bovin. Des MM très diverses lui sont attribuées dans plusieurs études, reflétant ainsi le caractère multimérique de cette protéine (PAQUET et ALAIS, 1982 ; KANNO, 1989a ; 1989b ; GIRARDET *et al*, 1991 ; GIRARDET et LINDEN, 1996 ; INNOCENTE *et al*, 1998 ; UENO *et al*, 2005). Les mêmes observations ont été notées pour la protéine cameline.

Selon BEG *et al* (1987), la masse moléculaire du PP3 camelin est estimée en PAGE SDS à 15 000 Da, alors qu'en chromatographie de perméation sur le Sephadex G100, ce composant est élué à une masse moléculaire de 30 000 Da. Cette diversité s'explique, selon ces auteurs, par la dimerisation de cette protéine à l'état natif. La même observation a été rapportée par GIRARDET *et al* (2000), qui de leur côté, ont élué le PP3 à un volume correspondant à une masse moléculaire de 162 kDa sur une colonne de superose 12.



***Conclusion générale***

## Conclusion générale

Dans un environnement hostile où il y a un manque d'eau et où la température ambiante est élevée, les chamelles laitières peuvent procurer du lait de très bonne qualité nutritionnelle tout au long de l'année et en grandes quantités. Ceci devrait rehausser la place qu'occupe le dromadaire parmi les espèces animales laitières. Malheureusement, cet animal est toujours marginalisé bien que le lait qu'il produit fait l'objet de plusieurs travaux dans le monde qui mettent à chaque fois en relief ses particularités.

En continuité des travaux déjà initiés sous cette thématique au laboratoire de Biochimie Appliquée et Biotechnologies (LABAB) de l'université de Tizi Ouzou, nous avons tenté dans cette étude d'élargir le champ d'investigation du lait de chamelle produit en Algérie, où nous avons ciblé la qualité physico-chimique du lait collecté dans les régions de Biskra, Ouargla et Ghardaïa, et nous avons axé l'étude sur l'isolement des protéines du lactosérum et leur sensibilité au traitement thermique.

Les essais analytiques réalisés font ressortir que la composition physico-chimique est assez homogène entre les trois régions choisies. Ce lait donne en moyenne une teneur protéique de 31,00 g/l ; lactose (33,23 g/l) ; matière grasse (39,17 g/l) et vitamine C (44,28 mg/l). Les résultats de ces analyses confirment la bonne valeur nutritionnelle de ce lait.

Une fois séparées des caséines à pH 4,3 ; les protéines sériques camelines sont caractérisées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives et en conditions dénaturantes en présence du SDS et du  $\beta$ - mercaptoéthanol. Ces techniques nous ont révélé la présence d'homologues aux protéines majeures du lactosérum bovin, excepté la  $\beta$ -Lg où aucun homologue n'a été détecté.

En outre, la variabilité génétique de l' $\alpha$ -La a été confirmée sur les électrophorogrammes des laits analysés, ralliant ainsi la littérature qui a fait état de la présence d'un polymorphisme génétique de cette protéine dans la famille des *Camelidae*.

L'effet du traitement thermique sur les protéines du lactosérum camelin a été étudié ; ces dernières, comparativement, aux séroprotéines bovines sont plus résistantes à la dénaturation thermique, où de faibles taux de dénaturation ont été enregistrés dans toute la gamme de température testée. Suivie par PAGE, la thermorésistance des protéines sériques camelines évolue dans le sens : PP3 >  $\alpha$ -La > CSA.

L'isolement de la fraction protéose peptones totale par thermocoagulation, a permis de détecter par électrophorèse des homologues camelins aux entités majeures bovines telles que le PP3 qui est très abondant dans le lait étudié, ainsi que le PP5 qui est généré suite à l'hydrolyse de la  $\beta$ -CN, ce qui suggère des homologies structurales entre la  $\beta$ -CN cameline et bovine.

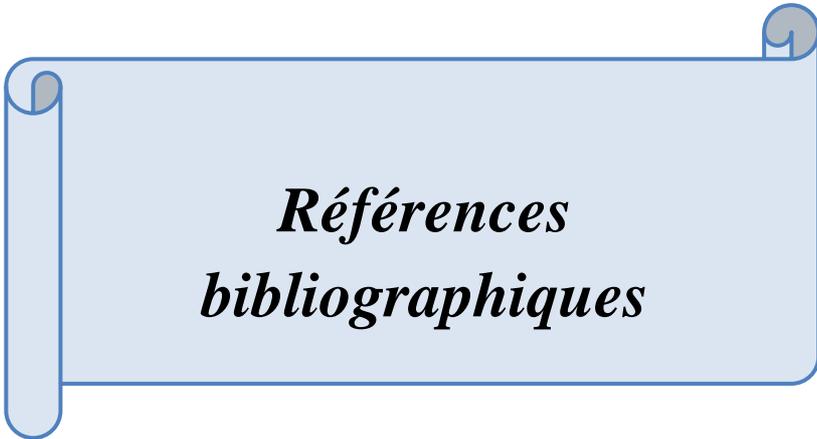
Les essais de fractionnement et séparation des protéines sériques majeures en une seule étape par chromatographie de perméation sur gel de Sephacryl S200, ont abouti à l'isolement de l' $\alpha$ -La avec des degrés de pureté très satisfaisants.

Ce travail exploratoire de base nous incite dans des études futures à mener des investigations plus approfondies pour compléter ou répondre aux différents points qui demeurent insuffisamment élucidés.

Dans ce cadre et concernant la qualité physico-chimique du lait de chamelle produit en Algérie, des investigations plus étendues doivent être menées sur un plus grand nombre de régions où l'élevage camelin est implanté, et sur un effectif plus important.

Le recours à des techniques de séparation et d'identification plus fines (HPLC, séquençage des protéines...) permettant une identification complète des bandes protéiques obtenues et confirmer, ainsi la spécificité au lait camelin de certaines protéines et la variabilité génétique des autres.

De même, pour la fraction des protéose-peptones camelines, l'étude de l'origine des différents composants de cette fraction doit être menée en hydrolysant la caséine- $\beta$  et en identifiant les différents fragments issus de son hydrolyse, tout en mettant l'accent sur l'isolement du PP3 et l'étude de ses différentes activités biologiques qui ont été largement menées sur son homologue bovin.



*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

- ADAMOU A. (2008). L'élevage camelin en Algérie: quel type pour quel avenir ? *Sécheresse*, 4 (19), 253-260.
- AGRAWAL R. P., SWAMI S. C., BENIWAL R., KOCHAR D. K., SAHANI M. S., TUTEJA F. C. and GHOURI S. K. (2003). Effect of raw camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life on type 1 diabetes: a randomized prospective controlled study. *Journal of Camel Practice and Research*, 10 (1), 45-50.
- AGRAWAL R. P., SAHANI M.S., TUTEJA F. C., GHOURI S. K., SENA D. S., GUPTA R. and KOCHAR D. K. (2005a). Hypoglycemic activity of camel milk in chemically pancreatomized rats – an experimental study-.*International Journal of Diabetes in Development Countries*, 25, 75-79.
- AGRAWAL R. P., BENIWAL R., SHARMA R. C., KOCHAR D. K. TUTEJA F. C., GHOURI S. K. and SAHANI M. S. (2005b). Effect of raw camel milk in type 1 diabetic patients: 1 year randomized study. *Journal of Camel Practice and Research*, 12 (1), 27-35.
- AGRAWAL R. P., DOGRA R., MOHTA N., TIWARI R., SINGHAL S. and SULTANIA S. (2009). Beneficial effect of camel milk in diabetic nephropathy. *Acta Biomedical*, 80, 131-134.
- ALIM N., FONDRINI F., BONIZZI I., FELIGINI M. and ENNE G. (2005). Characterization of casein fractions from Algerian dromedary (*Camelus dromedaries*) milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4 (2), 112-116.
- ALHAJ OMAR A., HAMAD A. and AL KANHAL A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk : review. *International Dairy Journal*, 20, 811-821.
- AL HASHEM F. (2009). Camel's milk protects against Aluminum chloride induced toxicity in the liver and kidney of white albinos rats. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 5 (3), 98-109.
- AL HASHEM F., DALLAK M., BASHIR N., ABBAS M., ELESSA R., KHALIL M. and AL KHATEEB M. (2009). Camel's milk protects against cadmium chloride induced toxicity in white albinos rats. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4 (3), 107-117.
- AL MAJALI A. M., ISMAIL Z. B., EL-HAMI Y. and NOUR A. A. (2007). Lactoferrine concentration in milk from camels (*Camelus dromedarius*) with and without subclinical mastitis. *International Journal of Applied Research and Medicine*, 5 (3), 120-124.
- ALOUI LOMBARKIA O., GHENAM E. H., BACHA A. and ABEDEDDAIM M. (2007). Caractéristiques physicochimiques et biochimiques du Lait de chamelle et séparation de ses protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Rencontres Recherche Ruminants*, 14.
- AL SALEH A. (1996). Heat coagulation of camel milk. *Journal of king Saudi University*, 8 (1), 107-111.
- AMAL HASSAN I. and BAYOUMI M. M. (2010). Efficiency of camel milk and honey bee in alleviation of diabetes in rats. *Nature and Science*, 8 (10), 333-341.

- ANONYME-3 (1980).** Lait et produits laitiers : méthodes d'analyses. Recueil des normes françaises, 1ere édition, AFNOR.
- ANONYME-1 (2006).** Review of the literature on pastoral economics and marketing. North Africa.
- ANONYME-2 (2009).** Atelier lait de chamelle. *Rapport FAO*.
- ANDREWS A. T., WILLIAMS R.J.H., BROWNSSELL V. L., ISGROVE F.H., JENKINS K. and KANEKANIAN A. D. (2006).**  $\beta$ -CN5P and  $\beta$ -CN4P components of bovine milk protéose peptone: large scale preparation and influence of the growth of cariogenic microorganisms. *Food Chemistry*, **96**, 234-241.
- ATTIA H., KHEROUATOU N., NASRI M. and KHORCHANI T. (2000).** Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, **80**, 503-515.
- ATTIA H., KHEROUATOU N. and DHOUIB A. (2001).** Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **26**, 263-270.
- AUDIGIE C.L., FIGARELLA J. and ZONSTAIN F. (1978).** Manipulations d'Analyses Biochimiques. Doin editions, Paris.
- BAER A., RYBA L., and FARAH Z. (1994).** Plasmin activity in camel milk. *Lebensmittel Wissenschaft und Technology*, **27** (6), 595-598.
- BAIDAR KHAN B. and IQBAL A. (2001).** Production and composition of camel milk: review. *Pakistani Journal of Agriculture Science*, **38**, 3-4.
- BAK M., RASSMUSSEN K. L., PETERSON T. E. and NIELSON N. C. (2001).** Colloidal calcium phosphates in casein micelles studied by slow -speed spinning  $^{31}\text{P}$  magic angle spinning solid state nuclear magnetic resonance. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1310-1319.
- BARZEGAR A., YOUSEFI R., SHARIFZADEH A., DALGALARRONDO M., CHOBERT J. M., GANJALI M. R., NOUROUZI P., EHSANI M. R., NIASARI-NASLAJII A., SABOURY A. A., HEARTLE T., MOOSAVI- MOVAHEDI A. A. (2008).** Chaperone activities of bovine and camel  $\beta$ -caseins: importance of their surface hydrophobicity in protection against alcohol dehydrogenase aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 392- 399.
- BEG O. U. (1986).** Characterization of camel milk whey proteins. Thèse de Doctorat. Université de Karachi, Pakistan.
- BEG O. U., BAHR-LINDSTROM H. V., ZAIDI Z. H. and JORNVALL H. (1984).** a small camel milk protein rich in cysteine /half cystine. *Bioscience Reports*, **4**, 1065-1070.
- BEG O. U., BAHR-LINDSTROM H. V., ZAIDI Z. H. and JORNVALL H. (1985).** The primary structure of  $\alpha$ -lactalbumine from camel milk. *European Journal of Biochemistry*, **147**, 233-239.
- BEG O. U., BAHR-LINDSTROM H. V., ZAIDI Z. H. and JORNVALL H. (1986).** A camel milk whey protein rich in half cystine, primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns and relationships with neurophysin and other active polypeptides. *European Journal of Biochemistry*, **159**, 195-201.

- BEG O. U., BAHR-LINDSTROM H. V., ZAIDI Z. H. and JORNVALL H. (1987).** Characterization of a heterogeneous camel milk whey non casein protein. *FEBS letters*, **216** (2), 270-274.
- BEN AISSA (1989).** Le dromadaire en Algérie. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* (2), 19-28.
- BENKERROUM N., MEKKAOUI M., BENNANI N. and HIDANE K. (2004).** Antimicrobial activity of camel's milk against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Dairy Technology*, **57** (1), 39-43.
- BENKERROUM N. (2008).** Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, **7** (25), 4856-4867.
- BROGDEN K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Natural Revue of Microbiology*, **3**, 238-250.
- BUCHHEIM et al (1989)** cité par **KAPPELER et al (1998)**.
- CAMPAGNA S., VAN MAN N., HEITZ F., HUMBERT G. and GAILLARD J. L. (1999).** Specific interaction between anionic phospholipids and milk bovine component PP3 and its 119-135 C-terminal fragment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **13**, 299-309.
- CAMPAGNA S., MAHOT A. G., FLEURY Y., GIRARDET J. M. and GAILLARD J. L. (2004).** Antimicrobial activity of lactophorin, a synthetic 23 residues peptide derived from the sequence of bovine milk component 3 of protéose peptone. *Journal of Dairy Science*, **87**, 1621-1626.
- CANTISANI A., NAPOLITANO L., GIUFFRIDA M. G. and CONTI A. (1990).** Direct identification and characterization of Llama (*Lama glama*) whey proteins by micro sequencing after Western blotting. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **21**, 227- 236.
- CARDOSO R. R. A., SANTOS R. M. D. B., CARDOSO C. R. A. and CAVALHO M. O. (2010).** Consumption of camel's milk by patients intolerant to lactose; a preliminary study. *Revista Alergia México*, **57** (1), 26-32.
- CARTER D. C. and HO J. X. (1994).** Structure of serum albumin. *Advance Protein Chemistry*, **45**, 153-203.
- CARTIER P. and CHILLIARD Y. (1990).** Inhibiting and activating effects of skim milks and PP fractions on spontaneous lipolysis and purified lipoprotein lipase activity in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, **73**, 1173-1177.
- CAYOT P. and LORIENT D. (1998).** Structures et Techno-Fonction des Proteins du Lait. *Techniques et Documentation*, Edition Lavoisier, Paris.
- CHO J. H., FRASER I. P., FUCASE K., KUSUMOTO S., FUJIMOTO Y., STAHL G. L. and EZEKOWITZ R. A. (2005).** Human peptidoglycan recognition protein is effectors of neutrophil- mediated innate immunity. *Blood*, **106**, 2552-2558.
- CHRYSINA E. D., BREW K. and ACHRYA K. R. (2000).** Crystal structures of Apo- and holo bovine  $\alpha$ -lactalbumine at 22°A resolution reveal an effect of calcium on inter lobe interactions. *Journal of Biology and Chemistry*, **275**, 37021-37029.

- CONTI A., GODOVAC-ZIMMERMANN J., NAPOLITANO A. and LIBERATORI J. (1985).** Identification and characterization of two  $\alpha$ -lactalbumins from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*). *Milchwissenschaft*, **40**, 673-675.
- CONESA C., SANCHEZ L., ROTA C., PEREZ M. D., CALVO M., FARNAUD S. and EVANS R. W. (2008).** Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, part B **150**, 131-139.
- DALEY L. P., GAGLIARDO L. F., DUFFY M. S., SMITH M. C. and APPLETON J. A. (2005).** Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **12** (3), 380-386.
- DELLORTO V., CATTANEO D., BERETTA E., BALDI A. and SAVOINI G. (2000).** Effects of trace element supplementation on milk yield and composition in camels. *International Dairy Journal*, **10**, 873-879.
- DESMYTER A., DECANNIERE K., MUYLDERMANS S. and WYNS L. (2001).** Antigen specificity and high affinity binding provided by one single domain antibody. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (28), 26285-26290.
- DE WIT J.N. and KLARENBECK G. (1984).** Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, **67**, 2701-2710.
- DUHAIMAN A.S. (1988).** Purification of camel milk lysozyme and its lytic effect on *Escherichia coli* and *Micrococcus lysodeikticus*. *Component Biochemistry and Physiology*, **91B** (4), 793-796.
- DREIUKER J. and VETTER W. (2011).** Fatty acids patterns in camel, moose, cow and human milk as determined with GC/MS after silver ion solid phase extraction. *Food Chemistry*, **126**, 762-771.
- DZIARSKI R. and GUPTA D. (2006).** Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins – micro review-. *Cellular Microbiology*, **8** (7), 1059-1069.
- EIGEL W. N., BUTLER J. E., ERNSTROM C. A., FARRELL H. M., HARWALKAR V. R., JENESS R. and WHITNEY R. (1984).** Nomenclature of proteins of cow's milk : fifth revision. *Journal of Dairy Science*, **67**, 1599.
- ELAGAMY E. I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, **68**, 227-232.
- ELAGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P. and ASSAF R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, **59**, 169-175.
- ELAGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P. and ASSAF R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrine, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulin from camel's milk. *International Dairy Journal*, **6**, 129-145.
- ELAMINE F. M. and WILCOX C. J. (1992).** Milk composition of Majaheim camels. *Journal of Dairy Science*, **75**, 3155-3157.
- EL FAKHARANY E. M. , TABLL A., ABD EL WAHAB A., HAROUN B. M. and REDWAN E. R. (2008).** Potential activity of camel milk amylase and lactoferrin against hepatitis C virus infectivity in HePG2 and lymphocytes. *Hepatitis Monthly*, **8** (2), 101-109.

- EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J.L., KORCHANI T. and ATTIA H. (2006a).** Therapeutic potential of whey proteins of camel colostrums. *Microbial Hygiene and Alimentation*, **18** (53), 70-76.
- EL-HATMI H., LEVIEUX A. and LEVIEUX D. (2006b).** Camel (*Camelus dromedarius*) immunoglobulin G,  $\alpha$ -lactalbumine, serum albumin and lactoferrine in colostrums and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research*, **73**, 288-293.
- EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J. L., YAHYAOU M. H. and ATTIA H. (2007).** Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, **70**, 267-271.
- ELLOUZE S. and KAMOUN M. (1989).** Évolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de la lactation. *Options Méditerranéennes-Série Séminaires-*, **6**, 307-311.
- EL-RASHDY M. R. and TABLL A. (2007).** Camel lactoferrine markedly inhibits hepatitis C virus genotype 4 infection of human peripheral blood leukocytes. *Journal of Immunology Assay and Immunochemistry*, **28**, 267-277.
- EL-SAID EL-SHERBINI E. S., EL-SAID G. R. and TANTAWY E. (2010).** Effect of camel milk on oxidative stresses in experimentally induced diabetic rabbits. *Veterinary Research Forum*, **1** (1), 30-43.
- EL-ZUBEIR I. E. M. and JABREEL S. O. (2008).** Fresh cheese from camel milk coagulated with camifloc. *International Journal of Dairy Technology*, **61** (1), 90-95.
- EPAND R. M. and VOGEL H. J. (1999).** Review diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochemical Biophysical Acta* **1462**, 11-28.
- EREIFEJ K. I., ALLU'DATT M. H., ALKHALIDY H. A., ALLI I. and RABABAH T. (2011).** Comparison and characterization of fat and protein composition for camel milk from eight Jordanian locations. *Food Chemistry*, xx, xxx-xxx. Article in press.
- ETIENNE L., GIRARDET J. M. and LINDEN G. (1994).** Growth promotion of *Bifidobacterium animalis* by bovine milk protéose peptone. *Lait*, **74**, 313-323.
- FARAH Z. (1986).** Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, **41** (12), 763-765.
- FARAH Z. (1996).** Camel milk: properties and products. SKAT, St. Gallen. Switzerland.
- FARAH Z. and FARAH RIESEN M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk caseins. *Milchwissenschaft*, **40**, 669-671.
- FARAH Z. and RUEGG M. W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, **8**, 211-216.
- FARAH Z. and RUEGG M. W. (1991).** The creaming properties and size distribution of fat globules in camel milk. *Journal of Dairy Science*, **74** (9), 2901-2904.
- FARAH Z. and ATKINS D. (1992).** Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, **59**, 229 - 231.
- FARAH Z., STREIFF T. and BACHMANN M. R. (1989).** Manufacture and characterization of camel milk butter. *Milchwissenschaft*, **44** (7), 412-414.
- FARAH Z., STREIFF T. and BACHMANN M. R. (1990).** Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *Journal of Dairy Research*, **57**, 281-283.

- FARAH Z., RETTENMAIER R. and ATTKINS D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research*, **62**, 30-33.
- FARAH Z., EBERHARD P., MEYER J., REHBERGER B., THOMET A. and GALMANN P. (2004).** UHT processing of camel milk. Swiss federal institute of technology, Switzerland.
- FARRELL 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. and SWAISGOOD H. E. (2004).** Nomenclature of the proteins of cow milk – sixth revision. *Journal of Dairy Science*, **87**, 1641-1674.
- FAYE B. (2003).** Performances et productivité laitière de la chamelle : les données de la littérature « lait de chamelle pour l’Afrique ». Atelier sur la filière laitière cameline en Afrique. *Comptes rendus de la FAO*, Niamey.
- FAYE B., KONUSPAYEVA G., NARMURATOVA M. and LOISEAU G. (2008).** Comparative fatty acid gross composition of milk in bactrian camel and dromedary. *Journal of Camelid Sciences*, **1**, 48-53.
- FELIPE X. and ANDREW J. R. L. (1997).** Preparative scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *Journal of Dairy Research*, **64**, 459-464.
- GIRARDET J. M. and LINDEN G. (1996).** The pp3 component of the bovine milk: a whey phosphorylated glycoprotein. *Journal of Dairy Research*, **63**, 330-350.
- GIRARDET J. M., MATI A., SANOGO T., ETIENNE L. and LINDEN G. (1991).** Fast protein liquid chromatography purification of hydrophobic fraction of bovine milk PP and characterization by bidimensional electrophoresis, *Journal of Dairy Research*, **58**, 85-98.
- GIRARDET J. M., SAULNIER F., GAILLARD J. L., RAMET J. P. and HUMBERT G. (2000).** Camel (*Camelus dromedarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochemistry and Cell Biology*, **78**, 19-29.
- GORBAN A. M. S. and IZZELDIN O. M. (2001).** Fatty acids and lipids of camel milk and colostrums. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **52**, 283-287.
- HADDADIN M. S. Y., GAMMOH S. I. and ROBINSON R. K. (2007).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, **75**, 8-12.
- HAMMAD (1992)** cité par **HASHIM et al (2009)**
- HAROUN OMER R. and ELTINAY A. H. (2009).** Changes in chemical composition of camel’s milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8** (5), 607- 610.
- HASHIM I.B., KHALIL A.H. and HABIB H. (2009).** Quality and acceptability of a set type yogurt made from camel milk. *Journal of Dairy Science*, **92**, 857-862.
- HILLIER R. M. (1976).** The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Research*, **43**, 259-265.
- HIROAKA Y., SEGAWA T., KUWAJIMA K., SUGAI S. and MURAI N. (1980).**  $\alpha$ -Lactalbumin: a calcium metalloprotein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **95**, 1098-1104.

- HOEK K. S., MILNE J.M., GRIEVE P. A., DIONYSIUS D. A. and SMITH R. (1997).** Antibacterial activity of bovine lactoferrine- derived peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41** (1), 54-59.
- HOLT C. (1998).** Casein micelle substructure and calcium phosphate interactions studied by Sephacryl column chromatography. *Journal of Dairy Science*, **81**, 2994-3003.
- HOLT L. J., HERRING C., JESPER S. L. S., WOOLVEN B. P. and TOMLINSON I. M. (2003).** Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends Biotechnology*, **21**, 484-490.
- INNOCENTE N., CARRADINI C., BLECKER C. and PAQUOT M. (1998).** Dynamic surface properties of the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, **81**, 1833-1839.
- INNOCENTE N., COMPARIN D. and CORRADINI C. (2002).** Proteose peptone whey fraction as emulsifier in ice cream preparation. *International Dairy Journal*, **124**, 1249-1257.
- INNOCENTE N. MARCHESINI G. and BIASUTTI M. (2011).** Feasibility of the SPME method for the determination of the aroma retention capacity of protéose peptone milk protein fraction at different pH values. *Food Chemistry*, **124**, 1249-1257.
- ISHII S. and SAMEJIMA K. (2006).** Products made from camel's milk by Mongolian nomads. *Milk Science*, **55** (2), 79-83.
- JAUHAINEN T. and KORPELA R. (2007).** Milk peptides and blood pressure. *Journal of Nutrition*, **137**, 825S- 829S.
- JAVEDKHAN A, KUMAR P., SRINIVASAN A. and SINGH T. P. (2001).** Protein intermediate trapped by simultaneous crystallization process. Cristal structure of an iron saturated intermediate in the Fe<sup>3+</sup> binding pathway of camel lactoferrine at 2,7Å° resolution. *Journal of Biological Chemistry*, **276** (39), 36817-36823.
- JENSSEN H., HAMIL P. and HANCOCK R. E. W. (2006).** Peptides antimicrobial agents. *Clinical and Microbiology Revue*, **19**, 491-511.
- JENESS R. (1954).** Effects of heat treatment on serum proteins. *Agriculture and Food Chemistry*, **2** (2), 75-81.
- JOHNSEN L. B., SORENSEN E. S., PETERSEN T. E. and BERGLUND L. (1995).** Characterization of bovine mammary gland PP3 cDNA reveals homology with mouse and rat adhesion molecule GlyCAM-1. *Biochemical and Biophysical Acta*, **1260**, 116-118.
- JOVANOVIC S., BARAC M., MACEJ O., VUCIC T. and LACNJEVAC C. (2007).** SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors*, **7**, 371-383.
- KAMAL A. M., SALAM O. A. and EL- SAIED K. M. (2007).** Changes in amino acids profile of camel milk protein during the early lactation. *International Journal of Dairy Science*, **2** (3), 226-234.
- KAMOUN M. and RAMET J. P. (1989).** Conservation et transformation du lait de dromadaire. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires*, **6**, 229-231.
- KAMOUN M. (1990).** La production de fromage à partir du lait de dromadaire. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires* (**12**).
- KAMOUN M. (1995).** Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *CIHEAM- IMAZ, Séminaires Zaragoza. Spain.*

- KANNO C. (1989a).** Purification and separation of multiple forms of lactophorin from bovine milk whey and their immunological and electrophoretic properties. *Journal of Dairy Science*, **72**, 883-891.
- KANNO C. (1989b).** Characterization of multiple forms of lactophorin isolated from bovine milk whey. *Journal of Dairy Science*, **72**, 1732-1739.
- KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, **65**, 209-222.
- KAPPELER S., ACKERMANN M., FARAH Z. and PUHAN Z. (1999a).** Sequence analysis of camel (*Camelus dromedarius*) lactoferrine. *International Dairy Journal*, **9**, 481-486.
- KAPPELER S., PUHAN Z. and FARAH Z. (1999b).** Alternative splicing of lactophorin mRNA from lactating mammary gland of camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Dairy Science*. **82**, 2084-2093.
- KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (2003).** 5' flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal of Dairy Science*, **86**, 198-508.
- KAPPELER S., HENBERGER C., FARAH Z. and PUHAN Z. (2004).** Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, **87** (8), 2660-2668.
- KARRAY N., LOPEZ C., LESIEUR P. and OLLIVON M. (2004).** Dromedary milk fat: thermal and structural properties 1. Crystalline forms obtained by slow cooling. *Lait*, **84**, 399-416.
- KARRAY N., LOPEZ C., OLLIVON M. and ATTIA H. (2005).** La matière grasse du lait de dromadaire: composition, microstructure et polymorphisme. *Revue OCL*, **12**, 439-446.
- KARRAY N., DANTHINE S., BLECKER C. and ATTIA H. (2006).** Contribution to the study of camel milk fat globule membrane. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **57** (5/6), 382-390.
- KHASKHELI M., ARAIN M. A., CHAUDHRY S., SOOMRO A. H. and QURESHI T. A. (2005).** Physic chemical quality of camel milk. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, **01** (2), 164-166.
- KHEROUATOU N. and ATTIA H. (2008).** Etude comparative des caséines camelines (*Camelus dromedarius*) et bovines. *Sciences et Technologies*, **28**, 73-79.
- KHEROUATOU N., NASRI M. and ATTIA H. (2003).** A study of the dromedary milk casein micelle and its changes during acidification. *Brazilian Journal of Food Technology*, **6** (2), 237-244.
- KONTOPIDIS G., HOLT C. and SAWYER L. (2002).** The ligand binding site of bovine  $\beta$ -Lactoglobulin: evidence for a function? *Journal of Molecular Biology*, **318**, 1043-1055.
- KONUSPAYEVA G., FAYE B., LOISEAU G. and LEVIEUX D. (2007).** Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius* and hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*, **90**, 38-46.
- KONUSPAYEVA G., LOISEAU G. and FAYE B. (2004).** La plus value « santé » du lait de chamelle cru et fermenté: l'expérience du Kazakhstan. *Rencontre Recherche Ruminants*, **11**, 47-50.

- KONUSPAYEVA G., NARMURATOVA M., MELDEBEKOVA A., FAYE B. and LOISEAU G. (2007).** Variation factors of some minerals in camel milk. *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Impact of Pollution on Animal Products*. 27-23 September. Almaty, Kazakhstan.
- KONUSPAYEVA G., FAYE B., LOISEAU G., NARMURATOVA M., IVASHCHENKO A., MELDEBEKOVA A. and DAVLETOV S. (2009b).** Physiological change in camel milk composition (*Camelus dromedarius*) 1. Effect of lactation stage. *Tropical Animal Health and Production*, **42** (3), 495-499.
- KORYCKA et al (1978)** cité par **HADDADIN et al (2007)**.
- LAEMMLI U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-684.
- LAWEREYS M., GHAHROUDI M. A., DESMYTER A., KINNE J., HOLZER W., GENST E. D., WYNS L. and MUYLDERMANS S. (1998).** Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy chain antibodies. *EMBO Journal*, **17**(13), 3512-3520.
- LEONIL J., MARCHIN S., HENRY G., JOUANNEAU D. and PUTAUX J. L. (2007).** La caséine K: quel rôle dans la structuration de la micelle de caséines ? Colloque SF  $\mu$ - Grenoble -5-8 Juin 2007.
- LEVIEUX D., LEVIEUX A., EL-HATMI H. and RIGAUDIERE J. P. (2006).** Immunochemical quantification of heat denaturation of camel (*Camelus dromedarius*) whey proteins. *Journal of Dairy Research*, **73**, 1-9.
- LIN S., SUN J., CAO D., CAO J. and JIANG W. (2010).** Distinction of different heat treated bovine milks by native PAGE finger printing of their whey proteins. *Food Chemistry*, **121**, 803-808.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FAAR A. L. and RANDALL R. J. (1951).** Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, **193**, 265-275.
- LU X., WANG M., WANG J., GUPTA X. and DZIARSKI R. (2006).** Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *Journal of Biology and Chemistry*, **281**, 5895-5907.
- MAGJEED N.A. (2005).** Corrective effect of camel milk on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B<sub>1</sub>. *Journal of Saoudi Chemical Society*, **9** (2), 253-263.
- MAL G., SENA D. S., JAIN V. K. and SAHANI M. S. (2006).** Therapeutic value of camel milk as a nutritional supplement for multiple drug resistant (MDR) tuberculosis patients. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, **61**, 88-91.
- MATI A., GIRARDET J. M., XENAKIS D. and LINDEN G. (1991).** Isolement et caractérisation de la fraction hydrophobe des PP des laits bovin, ovin et caprin. *Lait*, **71**, 259-273.
- MATI A. (1992).** Les protéose peptones dans les laits bovin, ovin et caprin: isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Thèse Doctorat. Université de Nancy I.
- MATI A., MOULTI-MATI F., GIRARDET J. M., FOKOU E., BELLEVILLE-NABET F., NABET P. and LINDEN G. (1993).** Mitogenic activity of hydrophobic

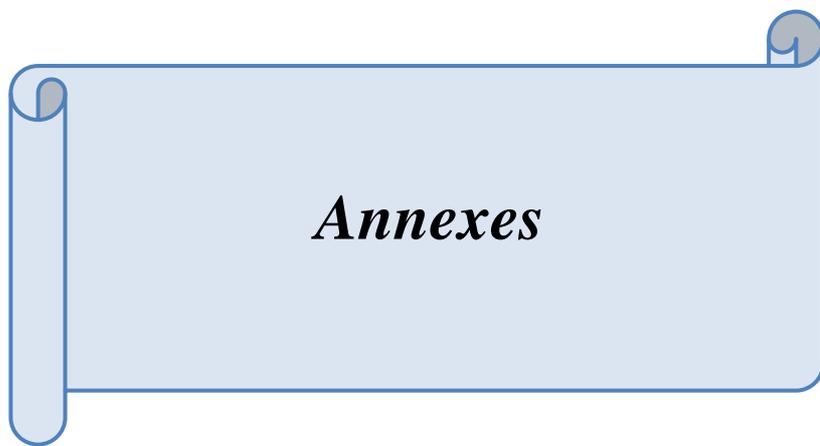
- fraction of protéose peptone from cows', ewes' and goats' milk measured with MARK-3 hybridoma culture. *Journal of Dairy Research*, **60**, 443-448.
- MAUBOIS J. L. and LEONIL J.** (1989). Peptides du lait à activité biologique. *Lait*, **69**, 245-269.
- MCKENZIE H. A. and WHITE F. H.** (1991). Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin: structure, function and interrelations. *Advance Protein Chemistry*, **41**, 173-315.
- MEHAIA M. A.** (1994). Vitamin C and riboflavin content in camel milk: effect of heat treatment. *Food Chemistry*, **50** (2), 153-155.
- MEHAIA M. A., HABLAS M. A, ABDELRAHMAN K. M. and EL-MOUGY S. A.** (1995). Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saoudi Arabia. *Food Chemistry*, **52** (2), 115-122.
- MEHAIA M. A.** (1995). The fat globule size distribution in camel, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, **50**, 260-263.
- MEHAIA M. A.** (2006). Manufacture of fresh soft white cheese (Domiati-type) from dromedary camels' milk using ultra filtration process. *Journal of Food Technology*, **4** (3), 206-212.
- MEILOUD G. M., OULD BOURAYA I. N., SAMB A. and HOUMEIDA A.** (2011). Composition of Mauritanian camel milk: results of first study. *International Journal of Agriculture and Biology*, **13**, 145-147.
- MERIN U., BERNSTEIN S., BLOCH DAMTI A., YAGIL R., VAN CREVELD C., LINDNER P. and GOLLOP N.** (2001). A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrums. *Livestock Production Science*, **67**, 297-301.
- MOHAMED H. E.** (2002). Vitamin C status in Sudanese camels. Thèse de Doctorat. Université de Khartoum. Soudan.
- MONERET-VAUTRIN D. A.** (2002). Allergie aux protéines de lait de vache in " Lait: aliment fonctionnel". *Bulletin d'Information*, **3**, 8-9.
- MOULTI-MATI F., MATI A., CAPIAUMONT J., BELLEVILLE F., LINDEN G. and NABET P.** (1991). Rôle de la  $\beta$ -lactoglobuline dans l'activité proliférative du lactosérum. *Lait*, **71**, 543-553.
- NARJISSE H.** (1989). Nutrition et production laitière chez le dromadaire. *Options Méditerranéennes-Série Séminaire-*, **2**, 163-166.
- NARAYAN M. and BERLINER L. J.** (1997). Fatty acids and retinoid bind independently and simultaneously to  $\beta$ -lactoglobuline. *Biochemistry*, **36**, 1906-1911.
- NEYESTANI R. T., DJALALI M. and PEZESHKI M.** (2003). Isolation of  $\alpha$ -Lactalbumin,  $\beta$ -Lactoglobulin and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*, **29**, 202-208.
- NWE N., STEVENS W. F., TOKURA S. and TAMURA H.** (2008). Characterization of chitosan and chitosan-glucan complex extracted from the cell wall of *Fungus gongronella butleri* by enzymatic method. *Enzyme Microbial Technology*, **42**, 242-251.

- OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. and HAERTLE T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian Yak, Khainak and Bactrian camel. *Lait*, **77**, 601-613.
- OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. and HAERTLE T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mongolian yak, Khainak and Bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, **22**, 105-124.
- OLDFIELD D. J., SINGH H., TAYLOR M. W. and PEARCE K. N. (1998).** Kinetics of denaturation and aggregation of whey proteins in skim milk heated in an ultra high temperature (UHT) pilot plant. *International Dairy Journal*, **8** (4), 311-318.
- PACHOLECK X., VIAS G., FAYE B. and FAGERE O. (2000).** Elevage Camelin au Niger. *Referenciel zootechnique et sanitaire, Projet de Renforcement institutionnel et Technique de la Filière Cameline*. 1<sup>ère</sup>ed. Niamey, Niger.
- PAN Y., LEE A., WAN J., COVENTRY M. J., MICHALSKI W. P., SHIELL B. and ROGINSKI H. (2006).** Antiviral properties of milk proteins and peptides: review. *International Dairy Journal*, **16**, 1252-1261.
- PAQUET D. (1989).** Revue bibliographique : la fraction protéose peptone du lait. *Lait*, **69**, 1-21.
- PAQUET D. and ALAIS C. (1982).** Purification et quelques caractéristiques moléculaires du composant -3 des protéose peptones. *Lait*, **62**, 338-349.
- PAQUET D., NEJJAR Y. and ALAIS C. (1985).** Electrophoretic and chromatographic behavior of the proteose peptone fraction of cow's milk. *Milchwissenschaft*, **40**, 200-203.
- PARRIS N., PURCELL J. M. and PTASHKIN S. (1991).** Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **39**, 2167-2170.
- PATY E., CHEDEVERGNE F., SCHEINMANN P., WAL J. M. and BERNARD H. (2003).** Allergie au lait de chèvre et de brebis sans allergie associée au lait de vache. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, **42**, 455-462.
- PAYENS T. A. (1982).** Les propriétés physico-chimiques des caséines  $\alpha$ S1,  $\beta$  et K. *Lait*, **62**, 306-320.
- PERMYAKOV E. A. and BERLINER L. J. (2000).**  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, **473**, 269-274.
- PIERRE A., MICHEL F. and LE GRAET Y. (1995).** Variation in size of goat milk casein micelles related to casein genotype. *Lait*, **75**, 489-502.
- PIKE A., BREW K. and ACHARYA K. R. (1996).** RCSB PDB: structure summary for 1HFZ alpha Lactalbumin. Protein data bank. Available at [http // www. Pdb. org / pdb / explore / explore](http://www.Pdb.org/pdb/explore/explore). Do? Structure Id = 1HFZ.
- QUITA SALWA M. and KURDI LINA A. F. (2010).** Antigenotoxic and anticytotoxic effect of camel milk in mice treated with cisplatin. *Saoudi Journal of Biological Sciences*, **17**, 159- 166.
- RAMET J. P. (2001).** The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). *Animal Production and Health Paper, N° 113*, FAO, Rome, Italy.
- RASMUSSEN et al (1998) cité par RODRIGUES (2001).**

- REDDY K. V. R., YEDRY R. D. and ARANHA C. (2004).** Antimicrobial peptides: premises and promises; review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **24**, 536-547.
- RESTANI P., GAIASCHI A., PLEBANI A., BERETTA B., CAVAGNI G., FIOCCHI A., POIESI C., VELONA T., UGAZIO G. and GALLI L. (1999).** Cross reactivity between milk proteins from different animal species. *Clinical and Experimental Allergy*, **29**, 997-1004.
- RESTANI P., BALLABIO C., DI LORENZO C., TRIPODI S. and FIOCCHI A. (2009).** Review: Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Annals of Bioanalytical Chemistry*, **395**, 47-56.
- RETAMOZO C. V., LAUWEREYS M., HASSANZADEH G., GOBERT M., CONRATH K., MUYDERMANS S., DE BAETSELIER P. and REVETS H. (2002).** Efficient tumor targeting by single domain antibody fragments of camels. *International Journal of Cancer*, **98**, 456-462.
- RICHARD (1984)** cité par **NARJISSE (1989)**.
- RODRIGUES L. R. M. (2001).** Valorização da fracção proteica do soro de queijo. Thèse Doctorat. Université DO MINHO, Portugal.
- RUEGG M. W. and FARAH Z. (1991).** Melting curves of camel milk fat. *Milchwissenschaft*, **46** (6), 361-362.
- RUETTIMANN K. W. and LADISCH M. R. (1987).** Casein micelles: structure, properties and enzymic coagulation. *Enzyme and Microbial Technology*, **9**, 578-589.
- SAITMURATOVA O. K., SULAIMANOVA G. I. and SADYKOV A. A. (2001b).** Camel's milk and schubat from the Aral region. *Chemistry of Natural Compounds*, **37**(6), 566-568.
- SAWYER L., BROWNLOW S., POLIKARPOVI. and WU S. Y. (1998).** B-Lactoglobulin structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, **8**, 65-72.
- SBOUI A., KHORCHANI T., DJEGHAM M. and BELHADJ O. (2009).** Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du sud tunisien ; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science*, **5** (2), 293-304.
- SCHMIDT (1982)** cité par **RUETTIMANN et al (1987)**.
- SHABO Y., BARZEL R., MARGOULIS M. and YAGIL R. (2005).** Camel milk for food allergies in children. *Immunology and Allergies Journal*, **7**, 796-797.
- SHAMSIA S.M. (2009).** Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, **1** (2), 52-58.
- SHARMA P., SINGH N., SINHA M., SHARMA S., PERBANDT M., BETZEL C., KAUR P., SRINIVASAN A., TEJ P. and SING H. (2008).** Crystal structure of the peptidoglycan recognition protein at 1, 8 °A resolution reveals dual strategy to combat infection through two independent functional homodimers. *Journal of Molecular Biology*, **378** (4), 923-932.
- SIBOUKEUR O. (2005).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat. INA, Alger.

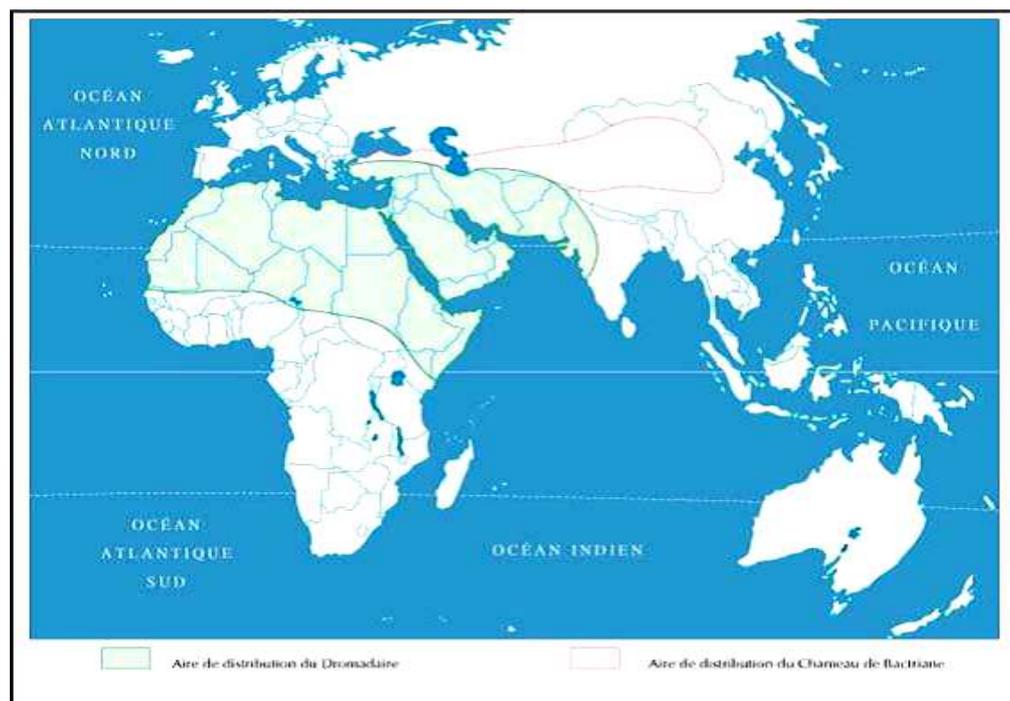
- SIBOUKEUR O. and MATI A. (2008).** Etude de l'activité du composant-3 des protéose peptones (pp3) du lactosérum camelin contre la flore microbienne, de contamination et indigène du lait de chamelle (*Camelus dromedarius*). *Actes du séminaire international sur la biotechnologie au service du secteur agroalimentaire*. Tipaza, 17-18 Juin , N° special.
- SIMPSON T., RANGANATHAN S., FISHER J. A., JANSSENS P. A., SHAW D.C. and NICHOLAS K. R. (2000).** The gene for a novel member of the whey acidic protein family encodes three four disulfide core domains and is asynchronously expressed during lactation. *Journal of Biological Chemistry*, **30** (275), 23074-23074.
- SMAIL R. (2002).** Isolement et caractérisation des protéines majeures du lait de chamelle collecté dans les régions d'Ouargla et de Tamanrasset. Mémoire de Magister, université de Bejaïa.
- STAHL T., SALLMANN H.P., DUEHLMEIR R. and WERNERY U. (2006).** Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrums. *Journal of Camel Practice and Research*, **13** (1), 53-57.
- STELWAGEN K., CARPENTER E., HAIGH B., HODKINSON A. and WHEELER T. T. (2009).** Immune components of bovine colostrums and milk. *Journal of Animal Science*, **87** (1), 3-9.
- SUGAHARA T., ONDA H., SHINOHARA Y., HORII M., AKIYAMA K., NAKAMOTO K. and HARA K. (2005).** Immunostimulation effects of protéose peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes. *Biochemica et Biophysica Acta*, **17251**, 233-240.
- SWAISGOOD H. E. (1993).** Symposium: genetic perspectives on milk proteins: comparative studies and nomenclature. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3054-3061.
- TAMIME ROBINSON (1999) cité par HADDADIN et al (2007).**
- TEFERA M. and GEBREAH F. (2001).** A study on the productivity and diseases of camels in eastern Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*, **33**, 265-274.
- TING K. L. H. and JERNIGAN R. L. (2002).** Identifying a folding nucleus for the lysozyme/ $\alpha$ -Lactalbumin family from sequence conservation clusters. *Journal of Molecular Evolution*, **54**, 425-436.
- TRIPLETT A. A., SAKAMOTO K., MATULKA L. A., SHEM L., SMITH G. H. and WAGNER K. U. (2005).** Expression of the whey acidic protein (WAP) is necessary for adequate nourishment of the offspring but not functional differentiation of mammary epithelial cells. *Genesis*, **43**, 1-11.
- TSUDA H. and SEKINE K. (2000).** Milk components as cancer chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **1**, 277-280.
- UENO T., AZUMA N., MOTOISHIMA H. and KANNO C. (2005).** Identification of polypeptides constituting lactophorin by monoclonal antibody to bovine milk lactophorin. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **69** (8), 1459-1465.
- UGUZ M. T. and OZDEMIR H. (2005).** Purification of bovine milk lactoperoxydase and investigation of antibacterial properties of different thiocyanates mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41** (4), 349-353.

- VANDERGHEM C., DANTHINE S., BLECKER C. and DEROANNE C. (2007).** Effect of protéose peptone addition on some physic chemical characteristics of recombined dairy creams. *International Dairy Journal*, **17**, 889 -895.
- VOGEL H. J., SCHBLI D. J., JING W., LOHMEIER-VOGEL E. M., EPAND R. F. and EPANO R. M. (2002).** Towards a structure - function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan and arginine containing peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, **80**, 49-63.
- WANGO H. J. (1997).** Chemical and technological properties of camel (*Camelus dromedarius*) milk. Thèse de Doctorat. Zurich, Suisse.
- WANGO H. J., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Isoelectric focusing of camel milk proteins. *International Dairy Journal*, **8**, 617-621.
- WERNERY U., HANKE B., BRAUN F. and JOHNSON B. (2003).** The effect of heat treatment on some camel constituents. Preliminary report. *Milchwissenschaft*, **56** (5/6), 277- 279.
- WERNERY U., JOHNSON B. and ISHMAIL T. (2006B).** Insulin content in raw dromedary milk and serum measured over one lactation period. *Journal of Camel Practice and Research*, **13** (2), 89-90.
- WERNERY U. (2007).** Camel milk- new observations. *Proceedings of International Camel Conference*, 16 -17 February. Bikaner, Inde.
- YAGIL R. (1982).** Camels and camel milk. *FAO animal production and health paper*, **26**, 1-69, Rome.
- YAGIL R., ZAGORSKY O. and VAN CREVELD C. (1994).** Science and camel's milk production. *Actes du Colloque "dromadaires et chameaux animaux laitiers"*, 24-26 Octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- YOUCEF N., SAIDI D., MEZEMAZE F., EL MECHERFI K. E., KADDOURI H., NEGAOUI H., CHEKROUN A. and KHEROUI O. (2009).** Cross reactivity between dromedary whey proteins and IgG antibodies  $\alpha$ -Lactalbumin and anti bovine  $\beta$ -lactoglobuline. *American Journal of Applied Sciences*, **6** (8), 1448-1452.
- YOSHIDA S. (1990).** Isolation of  $\beta$ -Lactoglobulin and  $\alpha$ -Lactalbumin by gel filtration using Sephacryl S200 and purification by diethylaminoethyl ion exchange chromatography. *Journal of Dairy Science*, **73**, 2292-2298.
- ZAGORSKI O., MAMAN A., YAFEE A., MEISLES A., VAN CREVELD C. and YAGIL R. (1998).** Insulin in milk – a comparative study. *International Journal of Animal Science*, **13**, 241-244.
- ZELEKE Z. M. (2007).** Non genetic factors affecting milk yield and milk composition of traditionally managed camels (*Camelus dromedarius*) in eastern Ethiopia. *Livestock Research for Rural Development*, **19** (6).
- ZHANG H., YAO J., ZHAO D., LIU H., LI J. and GUO M. (2005).** Changes in chemical composition of Alaxa Bactrian camel milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, **88**, 3402-3410.
- ZHANG T. N., YANG W. and LIU N. (2010).** Effect of loop structure of bovine lactoferricin on apoptosis in Jurkat cells. *Biometals*, **23**,555-561.



***Annexes***

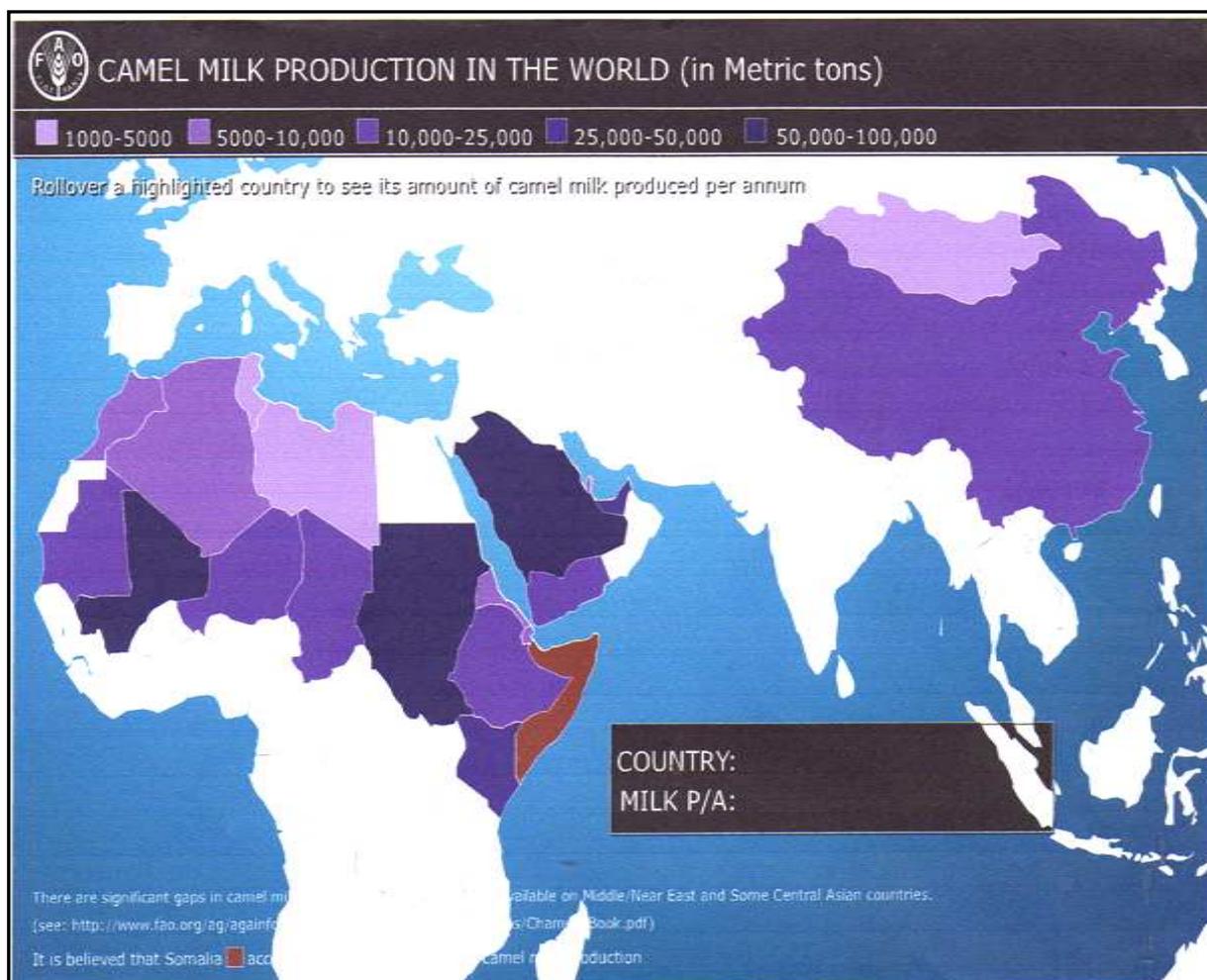
## ANNEXES

**Annexe 01 : systématique des camelidés et distribution géographique des espèces : *C. dromedarius* et *C. bactrianus* dans le monde.****Règne :** Animal**Embranchement :** Vertébrés**Classe :** Mammifères**Ordre :** Artiodactyles**Famille :** Camélidés**Genre :** *Camelus***Espèces :** *Camelus dromedarius**Camelus bactrianus***Genre :** *Lama***Espèces :** *Lama glama**Lama guanacoe**Lama pacos**Lama vicugna***Distribution géographique du dromadaire et du chameau dans le monde.**

 Aires de distribution du dromadaire (*Camelus dromedarius*).

 Aires de distribution du chameau (*Camelus bactrianus*).

**Annexe 02 : Production du lait de chamelle dans le monde, données FAO (2009).**



Quantité de lait produite selon les pays (tonnes de lait/ an) :

-  De 1000 à 5000 tonnes de lait de chamelle
-  De 5000 à 10000
-  De 10000 à 25000
-  25000 à 50000
-  50000 à 100000
-  Plus de 100000 (en Somalie)

**Annexe 03 : Synthèse bibliographique sur le potentiel laitier des chameilles dans le monde.**

Référence	Production journalière (litre)	Production totale (litre)	Durée de lactation
YASIN et WAHID* (1957)	9 à 14	2722-3629	16 à 18 mois
KNOESS* <i>et al</i> (1977)	6,6	3500	18 mois
FIELD* (1979)	4,8 à 21	-	-
YAGIL (1982)	-	1800-12700	9 à 18 mois
SOUHAIL* (1983)	-	2275	12 mois
SAWAYA (1984)	3,5 à 35	4575 -20675	-
SAREHA* (1985)	7,26 à 12,20	-	-
KNOESS (1986)	18,68	5695	305 jours
QURESHI* (1986)	8,0 à 20	-	9 à 18mois
KHANNA* (1986)	3,5 à 10	-	-
GEBRE-MARIAN* (1987)	5 à 6	9030-805	305 jours
IBNOAF* (1987)	-	3570	-
BASMAEIL et BAKKAR* (1987)	2,4 à 7,6	-	-
RICHARD et GERARD* (1989)	-	123	-
ELLOUZE et KAMOUN (1989)	3 à 11	-	-
NARJISSE (1989)	-	800-4000	10 à 12 mois
BEN AISSA (1989)	6 à 9	-	-
ISMAIL et ALMUTAIRI (1990)	16,6	533	13 mois
IBRAHIM* (1990)	6,0	-	-
KAMOUN* <i>et al</i> (1990)	-	915-3900	305 jours
SCHWARTZ* (1992)	-	12000	9 à 18mois
KHANNA* et RAI (1993)	3,5 à 10	-	-
FARAH* (1993)	3,5 à 18	-	-
HASHI* (1993)	4 à 5	800 à 3600	9 à 18mois
KAMOUN (1995)	9	-	10 mois
EL BADAWI* (1996)	3 à 35	-	12 à 18 mois
ROUJHAN* (1997)	8 à 10	-	-
SIMPKIN* <i>et al</i> (1997)	2,98	-	-
JASRA et AUJLA* (1997)	4 à 12	1250-3650	4 à 12 mois
ARABA* <i>et al</i> (1998)	-	935	10 mois
ZIAUR-RAHMAN et HAQ (1998)	4 à 12	-	-
MOSLAH <i>et al</i> (1998)	1,62	-	7 mois
EL NAGGAR (1998)	-	2700-3666	9 à 18 mois
KAUFMAN* (1998)	-	1096-1581	-
IQBAL* (1999)	11,66	4260	12 mois
HASHIM <i>et al</i> (2009)	3,5 à 40	-	-

\* In BAIDAR KHAN et IQBAL (2001) ; - Données non disponibles

**Annexe 04: Détermination des teneurs en extrait sec total (EST) et en extrait sec dégraissé (ESD)**

**Mode opératoire :**

- Peser une coupelle métallique séchée, soit  $M_0$  ;
- Introduire une prise d'essai de 1ml de lait entier (pour la détermination de EST) ou du lait écrémé (pour la détermination de ESD) dans cette coupelle ;
- L'introduire dans l'étuve réglée à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  et l'y laisser pendant 3h ;
- La mettre dans le dessiccateur et laisser refroidir jusqu'à la température ambiante ;
- La peser encore une fois, soit  $M_1$ .

**Expression des résultats :**

EST ou ESD, exprimés en g/l de lait est donné par :

$$(M_1 - M_0) \times 1000 / V$$

Où :  $M_1$  est la masse en g, de la coupelle vide.

$M_0$  est la masse en g, de la coupelle et du résidu après dessiccation et froidssement.

$V$  est le volume en ml, de la prise d'essai.

**Annexe 05: Détermination de la teneur en lactose par la méthode de la liqueur de Fehling**

**Réactifs :**

- Solution aqueuse d'hexacyanoferrate II de potassium, hydraté ( $\text{K}_4 \text{Fe} (\text{CN})_6$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) à 150g/l.
- Solution aqueuse d'acétate de zinc hydraté ( $\text{Zn} (\text{CHOO})_2$ ,  $2 \text{H}_2 \text{O}$ ) à 300g/l.
- Solution cuivrique composée de sulfate de cuivre II hydraté ( $\text{CuSO}_4$ ,  $5 \text{H}_2\text{O}$ ) à 4% (p/v) et d'acide sulfurique ( $d_{(20)}=1,83$ ) à 0,2 % (v/v)
- Solution tartro alcaline composée de tartrate double de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 0,15 % (p/v)
- Solution de lactose à 0,5% (p/v)

**Mode opératoire :**

**Défécation :** dans une fiole jaugée de 50 ml, introduire successivement

- 5 ml de solution d'hexacyanoferrate II de potassium, agiter ;
- 0,4 ml de solution d'acétate de zinc, agiter ;
- Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée tout en mélangeant ;
- Ajouter 0,4 ml d'eau distillée pour tenir compte du volume du précipité, agiter ;
- Laisser reposer 15 mn puis filtrer.

**Réduction de la liqueur de Fehling :** dans un Erlene meyer, introduire :

- 10ml de solution cuivrique ;
- 10 ml de solution tartro alcaline ;

- Agiter et porter à ébullition ;
- Verser ensuite goutte à goutte le filtrat obtenu ci-dessus (défécation du lait) à l'aide d'une burette jusqu'à la décoloration totale ;
- Lire le volume sur la burette (chute de burette), soit V en ml.

#### **Étalonnage de la liqueur de Fehling :**

L'étalonnage de la liqueur de Fehling est fait à l'aide d'une solution étalon de lactose de concentration  $C_1 = 5 \text{ g/l}$ . elle correspond à une chute de burette  $V_1$  (ml).

#### **Expression des résultats :**

La concentration en lactose inconnue  $C_2$  est donnée par la relation suivante :

$$C_2 = (C_1 \times V_1 / V_2) \times d$$

- Où :
- $C_1$  : concentration en lactose de la solution étalon
  - $C_2$  : concentration en lactose inconnue
  - $V_1$  : chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon
  - $V_2$  : chute de burette dans le cas du lait
  - d : coefficient de dilution

### **Annexe 06 : Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode au 2-6-DPIP**

#### **Réactifs :**

- Solution de 2-6- dichlorophenol indophénol à 0,05 g/l, préparée de la manière suivante :
- |                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| - Sel de sodium du 2-6-DPIP..... | 0,05 g |
| - bicarbonate de sodium .....    | 0,02 g |
| - eau distillée chaude.....      | 300 ml |
- laisser refroidir et ajuster à 1000 ml avec de l'eau distillée froide, puis filtrer.
- Solution d'acide ascorbique à 0,04 g/l
  - Acide acétique glacial (99 à 100%)

#### **Mode opératoire :**

Dans un bécher de 10 ml, introduire :

- 1 ml de solution à doser ;
- Ajouter 200  $\mu\text{l}$  d'acide acétique glacial, mélanger ;
- Verser goutte à goutte la solution du 2-6-DPIP à l'aide d'une burette, jusqu'à apparition d'une coloration rose pale persistante.
- Lire le volume sur la burette (chute de burette), soit V (ml)

**Étalonnage de la solution d'acide ascorbique :**

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon de concentration  $C_1 = 0,04$  g/l. elle correspond à une chute de burette  $V_1$  (ml).

**Expression des résultats :**

La teneur en vitamine C en mg/l, est donnée par la relation suivante :

$$C_2 = (C_1 \times V_1 / V_2) \times 1000$$

- Où :
- $C_1$  : concentration en acide ascorbique de la solution étalon
  - $C_2$  : concentration en vitamine C dans le lait inconnue
  - $V_1$  : chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon
  - $V_2$  : chute de burette dans le cas du lait

**Annexe 07 : détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951)**

**Préparation des solutions :**

- Solutions alcalines A :
  - Soude 0,1N..... 500 ml
  - Carbonate de sodium anhydre (NaCO<sub>3</sub>)..... 10 g
- Solution cuivrique B :
  - Sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O) (0,32g/100ml)..... 2 ml
  - Tartrate double de Na et de K (1g/100ml)..... 2 ml
- Solution C :
  - Solution A..... 50 ml
  - Solution B ..... 1 ml
- Solution mère de BSA :
  - BSA..... 10 mg
  - Eau distillée..... 100 ml

**Gamme étalon :**

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

Concentration en BSA µg/ml	0	20	40	60	80	100
Solution mère de BSA µl	0	200	400	600	800	1000
Eau distillée	1000	800	600	400	200	0

**Méthode :**

- 1ml d'échantillon contenant 100 µg de protéines maximum et 25 µg minimum
- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30 mn à l'obscurité ;
- lire la D.O à 750 nm.

**Expression des résultats :**

Une courbe étalon  $DO = f(C)$  est tracée. Puis la concentration de la protéine inconnue X est déterminée.

**Annexe 08 : électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)**

**Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....	36 g
Bisacrylamide.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

**Tampon de gel (B)**

Tris.....	9,14 g
Eau distillée.....	100 ml

Ajuster à pH 8,9 avec du HCl 4N

**Tampon d'électrode (pour une plaque)**

Tris.....	0,12 g
Glycine.....	0,58 g
Eau distillée.....	200 ml

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris

**Tampon d'échantillon**

Tampon du gel (B).....	100 µl
Eau distillée .....	700 µl
Glycérol 50%.....	200 µl
Bleu de bromophenol.....	une tête d'aiguille

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

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

Solution A .....	3,25 ml
Solution B .....	5 ml
Eau distillée.....	5 ml

Dégazer le mélange (maximum 2 mn)

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

---

Couler et mettre le peigne immédiatement

**Solution de fixation**

TCA.....	12 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

**Solution de coloration**

Bleu de coomassie R250.....	0,55 g
TCA.....	4 g
Méthanol.....	100 ml
Eau distillée.....	100 ml

**Solution de décoloration**

Acide acétique.....	37,5 ml
Eau distillée.....	312,5 ml
Méthanol.....	150 ml

**Dépôt d'échantillon :** 10 à 20 µl**Mise sous tension :** 20 mA, 25V**Fixation :** 45 mn dans la solution de fixation**Coloration :** 1 heure dans la solution de coloration**Décoloration :** dans la solution de décoloration**Annexe 09 : électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence du SDS et du 2-β mercaptoethanol (PAGE- SDS)****Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....	36 g
Bisacrylamide.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

**Tampon de gel de séparation(S)**

Tris.....	18,15g
Eau distillée.....	100 ml

Ajuster à pH 8,8 avec du HCl 4N

**Tampon de gel de concentration (C)**

Tris.....	6 g
Eau distillée.....	100 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl 4N

**Tampon d'électrode**

Tris.....	1,2 g
Glycine.....	5,76 g
SDS.....	0,2 g
Eau distillée.....	200 ml

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris

**Tampon d'échantillon**

Solution C .....	500 µl
Eau distillée.....	250 µl
SDS (10%).....	250 µl
2-mercaptoethanol.....	50 µl

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

**Solution de persulfate d'ammonium**

Persulfate d'ammonium.....	0,1 g
Eau distillée (qsp) .....	1 ml

**Electrophorèse****Préparation du gel de séparation : T=17% et C =2,7% (pour une plaque)**

Solution (A).....	4,60 ml
Solution (S).....	2,51 ml
Eau distillée.....	2,73 ml
Dégazer pendant 2 mn maximum	
SDS 10%.....	100 µl
TEMED.....	13 µl
Persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

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

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

Solution (A).....	1,3 ml
Solution (C).....	2,5 ml
Eau distillée.....	5,8 ml
Dégazer pendant quelques secondes	
Solution de SDS à 10% .....	100 µl
TEMED.....	20 µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....	10 µl

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

**Dépôt d'échantillon :** 10 à 20µl

**Mise sous tension :** 20 mA, 25V

**Fixation :** 45 minutes dans la solution de fixation

**Coloration :** 1heure dans la solution de coloration

**Décoloration :** dans la solution de décoloration