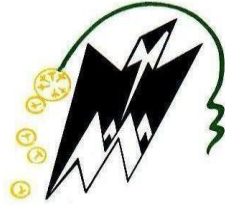


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du Diplôme de Master
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Biochimie de la Nutrition

Thème

La β -caséine cameline : purification, étude de la sensibilité aux enzymes digestives et activité anti-oxydante.

Réalisé par : M^{elle} BOUADJELA Lamia

Devant le jury composé de :

Présidente : M ^{me} SI AHMED-ZENNIA S.	M.C.A	U.M.M. T.O
Promotrice : M ^{me} ALMI-SEBBANE D.	M.C.B	U.M.M. T.O
Examinatrice : M ^{me} SENOUSSI-GHEZALI C.	M.A.A	U.M.M. T.O

2020/ 2021

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans le concours de nombreuses personnes. Je souhaite adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à sa réalisation.

*Mes premiers et mes vifs remerciements vont à ma promotrice Mme **ALMI-SEBBANE Dalila**, Maitre de Conférence Classe B à l'UMMTO, qui m'a confié ce sujet et m'a guidé dans sa réalisation. Elle m'a donné la chance de bénéficier de ses connaissances scientifiques et ses conseils. Je lui adresse également mes remerciements distingués de m'avoir consacré son temps précieux, pour ses critiques constructives, son enthousiasme et ses qualités personnelles et professionnelles.*

Mes vifs remerciements vont également à :

*Mme **SI AHMED-ZENNIA Saliha**, Maitre de Conférence Classe A à l'UMMTO, pour avoir accepté de présider le jury et pour tout son soutien continu et ses encouragements pour progresser. Je tiens également à lui exprimer ma profonde gratitude pour ses précieux conseils qu'elle m'a prodigués et sa disponibilité pour m'écouter. Je lui suis très reconnaissante. Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Mme **SENOUSSI –GHEZALI Chahra**, Maître Assistante Classe A A l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous exprime mes sincères remerciements pour les discussions enrichissantes que nous avons eues à plusieurs reprises sur les parties de mon travail me permettant ainsi de m'améliorer et de progresser.*

*A Monsieur **MATI Abderrahmane**, Professeur à L'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB). Votre grande rigueur m'a permis d'évoluer et vos conseils avisés ont toujours été très constructifs et ont participé grandement à ma formation. Je tiens ici à vous exprimer toute ma reconnaissance pour vos qualités tant scientifiques qu'humaines et de votre confiance durant ces années de travail au sein de votre laboratoire.*

Je témoigne toute ma gratitude à tous les membres de l'équipe du LABAB pour leur amitié, leur soutien moral, leurs encouragements quotidiens et pour tous les moments agréables partagés au sein du laboratoire.

Enfin, je suis très reconnaissante pour mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé avec un amour inconditionnel.

A mes frères et sœurs que j'admire, pour leur compréhension et leur support moral et intellectuel.

Sommaire

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUME

INTRODUCTION GENERALE..... 01

I. SYNTHÈSE DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités sur le lait de chamelle.....	03
1.1.1. Caractéristiques organoleptiques.....	03
1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques.....	04
1.1.3. Qualité nutritionnelle du lait de chamelle	04
1.2. Les protéines.....	06
1.2.1. Protéines du lactosérum.....	06
1.2.2. Les caséines	08
1.2.2.1. Les différents types de caséines.....	09
1.2.2.2. La micelle de caséine	11
1.3. La digestion enzymatiques de la caséine.....	13
1.3.1. Enzymes gastriques.....	14
1.3.1.1. Pepsine.....	14
1.3.1.2. Chymosine	14
1.3.2. Enzymes pancréatiques	15
1.3.2.1. Endopeptidases	15
1.3.2.2. Exopeptidases	16
1.4. Activités biologiques des caséines	16
1.4.1. Activité antioxydante.....	17
1.4.2. Activité anti-hypertensive	17
1.4.3. Activité antibactérienne	18

II. MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel.....	19
2.1.1. Matériel biologique.....	19
2.1.1.1. Lait de chamelle.....	19
2.1.1.2. Enzymes et protéines étalons.....	19
2.1.1.3. Appareillage.....	19
2.1.1.4. Produits chimiques et réactifs.....	20
2.2. Méthodes.....	20
2.2.1. Isolement des caséines totales.....	20
2.2.1.1. Écrémage.....	20
2.2.1.2. Précipitation isoélectrique.....	20
2.2.1.3. Dialyse et lyophilisation.....	20
2.2.2. Purification de la β -caséine cameline.....	22
2.2.2.1. Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose.....	22
2.2.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse.....	23
2.2.4. Méthodes électrophorétiques.....	24
2.2.4.2. Electrophorèse en présence de dodécylsulfate de sodium (PAGE-SDS).....	25
2.2.4.3. Electrophorèse en présence d'Urée et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-Urée)....	26
2.2.5. Hydrolyse de la β -caséine cameline par les enzymes digestives.....	26
2.2.6. Evaluation du pouvoir antioxydant des hydrolysats de caséines.....	27
2.2.6.1. Test de pouvoir de piégeage du radical libre DPPH.....	27

2.2.6.2. Test de piégeage du radical ABTS.....	28
--	----

III.RESULTATS & DICUSSION

3.1. Isolement et purification de la β caséine cameline.....	30
3.1.1. Isolement des caséines totales.....	30
3.1.2. Purification de la β caséine cameline.....	30
3.1.3. Détermination du poids moléculaire de la β -caséine cameline.....	32
3.1.4. Contrôle de la pureté par RP-HPLC.....	34
3.1.5. Sensibilité de la β caséine cameline à l'hydrolyse enzymatique.....	34
3.2. Evaluation des activités biologiques de la β-caséine cameline.....	38
3.2.1. Piégeage du radical libre DPPH	38
3.2.2. Piégeage du radical ABTS.....	40
CONCLUSION.....	42
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

αS-CN	α S-Caséine
β-CN	β -Caséine
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique
AG	Acide gras
APS	Persulfate d'ammonium
C°	Degré Celsius
CN	Caséines
CN_T	Caséines totales
D°	Degré Dornic
Da	Dalton
DEAE	Ethylènediaminetétracétate
DO	Densité optique
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
E/S	Rapport Enzyme sur Substrat
Hcl	Acide Chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
IgG	Immunoglobulines G
KDa	kilo Dalton
M	Molaire
mL	Millilitre
mM	Micromolaire
mn	Minute
μl	Microlitre
2-ME	2-Mercaptoéthanol
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH	Potentiel d'hydrogène
PM	Poids moléculaire
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
TCA	Acide trichloracétique
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyl-éthylènediamine
TFA	Acide trifluoroacétique
Tris	Tris-hydroxy-methyl-amino-méthane

Liste des figures

N°	Titres	Pages
01	Séquence primaire de la β -caséine cameline.	10
02	Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SHMIDT. (1980).	12
03	Schéma de pontage de deux submicelles par le phosphate calcium. (SCHMIDI, 1982)	12
04	Etapes suivies pour l'isolement des caséines du lait chamelle.	21
05	Représentation schématique de la chromatographie liquide de haute performance en phase inverse. (RP-HPLC)	23
06	Structure du gel de polyacrylamide.	25
07	Unité d'électrophorèse sur mini-cuve SE28.	26
08	Réaction du DPPH avec un antioxydant.	27
09	Réaction d'oxydo-réduction du radical ABTS.	29
10	Eléctrophorégramme des fractions collectées après séparation des caséines camelines par chromatographie sur DEAE-cellulose. A : PAGE-SDS ; B : PAGE Urée.	31
11	Eléctrophorégramme de la β -CN camelines en PAGE-SDS.	32
12	Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS.	33
13	Chromatogramme en RP-HPLC de la fraction β -CN cameline.	34
14	Eléctrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action des trois protéases (A : chymotrypsine ; B : trypsine ; C : pepsine) sur la beta caséine cameline (E/S= 1/100).	35
15	Chromatogrammes de l'hydrolyse de la β -caséine cameline par les protéases digestives après 24h d'incubation en RP-HPLC. A : hydrolysat pepsique ; B: hydrolysat trypsique ; C : hydrolysat chymotrypsique.	37
16	Activité anti-radicalaire (% d'inhibition du DPPH) en présence de la vitamine C comme référence ; d'hydrolysats pepsique et de la β caséines natives.	38
17	Valeurs de l'IC ₅₀ du test DPPH.	39
18	Piégeage du radical ABTS•+ de la β -caséine cameline native, de l'hydrolysat pepsique et de l'acide ascorbique.	40
19	Valeurs de l'IC ₅₀ du test ABTS.	41

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
I	Concentration moyenne en sels minéraux du lait de chamelle et du lait de vache.	04
II	Composition chimique globale du lait de chamelle.	05
III	Concentration moyenne en vitamines du lait de chamelle et du lait de vache.	05
IV	Concentrations moyennes des protéines dans le lait de dromadaire et de la vache.	09
V	Activités biologiques des peptides identifiés dans le lait de chamelle.	18
VI	Masse moléculaire (kDa) de la β -caséine mesurée en PAGESDS comparée avec quelques données bibliographiques.	33

Résumé

Le lait camelin est resté longtemps inexploré. Cependant, un intérêt grandissant lui a été porté ces dernières décennies, où il a fait l'objet de multitudes de travaux mettant en évidence des activités biologiques intéressantes de ses protéines et des peptides issus de leurs hydrolyses.

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressées à la caséine β (β -CN), protéine micellaire majeure de ce lait. La β -caséine cameline a été isolée et purifiée à partir des caséines totales du lait camelin collecté dans la région d'El Oued par chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-cellulose en batch. La pureté de cette fraction a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans différentes conditions. Les électrophoregrammes en PAGE-Urée et PAGE-SDS ont montré que la fraction correspondant à la β -CN migre en une seule bande bien focalisée.

La sensibilité de la β -CN a été testée en examinant l'action de trois protéases digestives (trypsine, pepsine et chymotrypsine). L'hydrolyse de la β -CN a été réalisée avec un rapport enzyme/substrat (protéine) de 1 :100 (m/m) pendant 240 mn à 37 °C. Les résultats ont montré que la β -CN est plus sensible à l'action de la pepsine que la trypsine et la chymotrypsine. Ces résultats sont confirmés par les profils chromatographiques des hydrolysats obtenus après 240 mn d'incubation analysés par RP-HPLC.

L'activité anti-oxydante de la β -CN, de ses hydrolysats pepsiques et l'acide ascorbique (référence) a été évaluée en utilisant deux tests *in vitro* : test de DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et test l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). Il ressort de ces tests que le potentiel antioxydant le plus élevé a été trouvé dans l'hydrolysats pepsique de la β -CN cameline. Les CI50 de la β -CN native, l'hydrolysats pepsique et de l'acide ascorbique sur DPPH sont respectivement de 1,78 μ g/ml, 0,69 μ g/ml et 4,74 μ g/ml. Concernant le test ABTS les CI50 sont 0,66 μ g/ml, 0,64 μ g/ml et 2,11 μ g/ml respectivement.

Mots clés : lait camelin, β -caséine, purification, hydrolyse enzymatique, activité anti-oxydante.

Abstract

Camel milk was unexplored for a long time ago. However, a growing interest has been dedicated to camel milk in the last decade, and several investigations reported valuable biological activities regarding its proteins and peptides after hydrolysis.

In this study, the β -casein of camel milk, collected from the El Oued region was isolated and purified using the DEAE cellulose ion exchange chromatography. Furthermore, Urea PAGE and SDS PAGE analysis were performed as to control the purity of the β casein. The gels depicted a well-focused band of the obtained F1 fraction, which corresponds to the β -CN.

The hydrolysis of the β -CN was carried out using three digestive enzymes (trypsin, chymotrypsin, and pepsin) at an enzyme/substrate ratio of 1:100, which were incubated at 37°C for 240 min. The results showed higher sensitivity with trypsin than that with chymotrypsin, and pepsin. This was confirmed by the chromatographic profiles of the hydrolysates, which were obtained after 240 min in the RP-HPLC.

The antioxidant of the β -CN fraction of the pepsin hydrolysate was assessed with DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and the ABTS (2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) *in vitro* tests using ascorbic acid as a standard. As a result, the β -CN of camel milk yielded the highest antioxidant activity compared to the native β -CN and the ascorbic acid. The IC₅₀ of the native β -CN, pepsin hydrolysate and the ascorbic acid with reference to the DPPH test was on one hand 1,78 μ g/ml, 0,68 μ g/ml, and 4,74 μ g/ml respectively, and on the other hand 0,66 μ g/ml, 0,64 μ g/ml et 2,11 μ g/ml respectively regarding the ABTS.

Keywords: camel milk, β -casein, purification, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity.

Introduction

Introduction générale

Le lait représente l'unique source de nutriments pour l'ensemble des nouveau-nés des espèces mammifères. Il est particulièrement essentiel pour la croissance de l'enfant et l'entretien de son organisme. Il joue par conséquent un rôle crucial dans l'alimentation de l'Homme. Mais à part sa valeur nutritive, il comporte des composés biologiquement actifs tels que les caséines, sources d'acides aminés indispensables et les protéines lactosériques, importantes pour les diverses fonctions physiologiques et biochimiques qu'elles assurent.

Le lait camelin, appelé également "Or blanc du désert" (KULA, 2016), est considéré non seulement comme un aliment essentiel du fait qu'il couvre une part substantielle des besoins nutritionnels quantitatifs et qualitatifs des populations, mais parce qu'il est aussi utilisé comme un remède contre divers maladies (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004, KULA, 2016). Dans le but de bénéficier de ses vertus avérées ou supposées, le lait de dromadaire est principalement consommé par la population locale à l'état cru ou fermenté spontanément.

Malgré leur importance, les sources laitières en Algérie restent insuffisantes, et sont essentiellement d'origine bovine. Les autres sources comme les laits de brebis, de chèvre et de chamelle sont confrontées à plusieurs contraintes. L'une des principales contraintes rencontrées dans les pays du Maghreb, est le tabou sur la vente de ces bioproduits. Autrefois, ils n'étaient pas vendus mais offerts à des fins thérapeutiques. Actuellement, on assiste à regain d'intérêt de ces produits par le consommateur et à une vente non réglementaire, à l'issue des services de contrôles.

Cependant, et en dépit de toutes ses propriétés, le lait de dromadaire a longtemps été ignoré ou sous-estimé, ne faisant que rarement l'objet de quelques recherches, centrées pour la plupart sur ses caractéristiques physico-chimiques, ses fonctionnalités (AL KANHALL, 2010 ; BOUSSOUAR, 2017) ou sur la comparaison de sa composition avec celle du lait de vache ou de chèvre (BENDIMERAD *et al.*, 2012 ; AKHMETSADYKOVA *et al.*, 2015).

La valeur nutritive de ce lait est très remarquable et essentiellement par sa fraction caséique qui, de point de vue compositionnel, se diffère de son analogue bovin. Le lait de dromadaire contient à peu près 1,63 à 2,76 % des caséines, ce qui représente environ 52 à 87 % des protéines totales. La caséine β est la principale fraction caséinique (65%) du lait de chamelle suivie de la caséine α S1 (21%), contre 36% et 38% respectivement dans le lait de vache (MEDJOUR, 2014). Quant à la caséine κ , protéine responsable de la propriété coagulante des caséines, ne représente qu'environ 3,47% du total des caséines, contre 13% dans le lait bovin (KAPPELER *et al.*, 2003). Le lait de chamelle est similaire au lait humain en ce qui concerne ce pourcentage élevé en caséine β , ce qui pourrait refléter son taux de digestibilité plus élevé et une plus faible incidence allergique dans l'intestin des nourrissons que le lait bovin et la caséine β est plus sensible à l'hydrolyse peptidique que la caséine α S (EL-AGAMY *et al.*, 2009).

Les caséines camelines qui sont le composant majoritaire de ce lait sont très susceptibles à la protéolyse et capables de produire des peptides à activités biologiques diverses. Une fois ingéré, une des conditions pour leur action sur la santé des consommateurs

Introduction générale

est que l'activité biologique de ces protéines ne soit pas affectée par les actions successives des enzymes protéolytiques gastro-intestinales.

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

L'objectif de la présente étude s'articule autour des points suivants :

- Isolement des caséines camelines totales ;
- Purification par chromatographie échangeuse anionique de la caséine β ;
- Caractérisation électrophorétique (PAGE-SDS, PAGE-urée) de la β -caséine cameline ;
- Etude de la sensibilité de cette entité protéique à l'action de trois enzymes digestives ; pepsine, trypsine, chymotrypsine ;
- Evaluation de l'activité antioxydante de la β caséine et ses hydrolysats par le test DPPH, test ABTS.

Synthèse

Bibliographique

I. SYNTHÈSE DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Généralités sur le lait de chamelle

Le lait est un produit naturel sécrété par les glandes mammaires des femelles après la naissance du jeune. A la fois aliment et boisson (FREDOT, 2009; BOUBEZARI, 2010), et un milieu de composition chimique et physique complexe qui permet au jeune chamelon et au consommateur de couvrir ses besoins énergétiques et nutritionnels (ADAMOU et FAYE, 2007; MAL et PATHAK, 2010; SBOUI *et al.*, 2015).

Dans de nombreuses régions, le lait de dromadaire est utilisé pour traiter certaines maladies et problèmes de santé tels que la jaunisse, la tuberculose, l'asthme, l'anémie et ayant des propriétés anticancéreuses, hypoallergéniques et antidiabétiques. Ces propriétés thérapeutiques peuvent être reliées à la composition du lait camelin. Certains composants tant sur le plan quantitatif que qualitatif pourraient être associés à ces propriétés particulièrement les facteurs antibactériens (lysozyme, lactoperoxydase, immunoglobulines, ...), l'insuline et la vitamine C (FAYE *et al.*, 2009; KOTB-ELSAYED *et al.*, 2011; RIYADH *et al.*, 2012; ALWAN *et al.*, 2014; BARAT *et al.*, 2014; HAMIDI *et al.*, 2014).

1.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche opaque, en raison de la structure et de la composition de sa matière grasse, relativement pauvre en β -carotène (SAWAYA *et al.*, 1984 ; FARAH, 1993; VALERIE, 2007; KULA et DECHASA, 2016; PATEL *et al.*, 2016). Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé (ABDEL-RAHIM, 1987) et/ou amère en fonction de sa teneur en lactose et minéraux (RAMET, 2003) et est d'un aspect moins visqueux que le lait de vache, qui est de couleur jaunâtre (SBOUI *et al.*, 2009).

En effet, la localisation géographique, la période de lactation, l'alimentation (fourrage vert ou plante du désert : Atriplex et Acacia) et la disponibilité de l'eau potable sont les principaux facteurs du changement de goût du lait de chamelle. L'ingestion des fourrages comme la luzerne, donne un goût sucré, certaines plantes halophytes le rendent salé (FARAH, 2004 ; SIBOUKEUR, 2007 ; EL IMAM ABDALLA, 2012).

Le lait de chamelle est mousseux quand on le secoue légèrement (YAGIL, 1982 ; AL HAJ et AL KANHAL, 2010) car il renferme des quantités plus importantes de composant 3 des protéose-peptones par rapport au lait de référence. Cette glycoprotéine lactosérique native est un bon agent tensioactif (SIBOUKEUR, 2007). Comparé au lait de vache, le lait de chamelle s'acidifié 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. Caractéristiques physico-chimiques

1.2.2.1. pH

Son PH qui varie de 6,2 à 6,5 est plus bas que celui du lait de vache (6,8) ou du lait de femme (7,6) (SENOUSSI, 2011).

Le pH du lait camelin frais se situe entre 6,5 et 6,7. Il est similaire à celui du lait de brebis, mais un peu acide par rapport à celui du lait bovin, ce dernier se situe entre 6,6 et 6,8 (SOUID, 2011).

1.2.2.2. Extrait sec total

La teneur en matière sèche totale du lait de chamelle est estimée à 130 g/l. Cette valeur est proche à celle du lait bovin (128 g/l) (KAMOUN, 1995).

1.2.2.3. Densité

Le lait camelin est moins dense que le lait de vache, sa densité moyenne est de 1,029 g/cm³ (MEDJOUR, 2014).

1.2.2.4. Acidité

L'acidité moyenne du lait camelin en degré Dornic est 14,66 ° D. (GHENNAM *et al.*, 2007).

1.1.3. Qualité nutritionnelle du lait de chamelle

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 (voir tableau I) notamment le sélénium, le zinc, le fer et le manganèse (AL-AWADI et SRIKUMAR, 2001). 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) (AMELLAL, 1995).

Tableau I : Concentration moyenne en sels minéraux du lait de chamelle et du lait de vache. (KAMAL, 2016).

Type de lait	Concentration (mg /L)									Références
	Macro-éléments					Oligo-éléments				
	Na	K	Ca	Mg	P	Fe	Cu	Zn	Mn	
Lait de chamelle	702	1586	1078	122	641	2,64	-	-	-	SAWAYA <i>et al.</i> , 1984
	270	450	1310	140	510	0,40	-	-	-	GNAN et SHEREHA, 1986
	431	725	300	45	-	2,80	-	-	-	ELAMIN et WILCOX, 1992
	902	2110	1462	108	784	3,40	-	-	-	BENGOUMI <i>et al.</i> , 1994
	688	1464	1180	125	889	2,37	1,44	6,08	0,82	MEHAIA <i>et al.</i> , 1995
Lait de vache	590	1560	1140	105	-	2,90	-	5,47	0,51	AL-HAJ et ALKANHAL, 2010
	501	1402	1127	117,73	961	-	-	-	-	GAUCHERON, 2005
	498	1475	1203	135	953	0,71	0,18	3,92	0,038	SOLIMAN, 2005
	444	1362	1166	103	867	0,31	0,31	4,12	0,041	MEDHAMMAR <i>et al.</i> , 2012

(-) : valeurs non déterminées.

La composition chimique globale du lait de chamelle (Tableau II), même si elle fluctue selon les auteurs montre néanmoins des teneurs importantes et équilibrées en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose) avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache (ATTIA *et al.*, 2001 ; SIBOUKEUR, 2007). Toutefois, elle présente une grande originalité dans la composition fine et qualitative des matières protéiques, des matières grasses et des vitamines.

Tableau II : Composition chimique globale du lait de chamelle.

Extrait sec(%)	Matières grasses (%)	Protéines (%)	Lactose (%)	Cendre (%)	Références
9,60	1,20	3,07	5,40	0,99	ATTIA <i>et al.</i> ,2001
11,31	2,8	3,56	4,38	0,72	SIBOUKEUR, 2007
12,18	5,74	2,90	-	0,69	ESHLAGA <i>et al.</i> ,2011
10,92	3	3,39	3,52	0,93	BOUDJENAH, 2012
10,13	4,4	2,8	4,3	0,82	MORTADA <i>et al.</i> , 2013

La composition du lait camelin a été considérée comme la moins stable comparée à celle des laits des autres espèces, bovine en l'occurrence. La variation de la composition du lait camelin peut être attribuée à plusieurs facteurs, comme la localisation géographique, les conditions alimentaires, la race, le stade et le rang de lactation (SOUID *et al.*, 2013).

Le lait de chamelle apporte 665 Kcal par litre contrairement à 701 Kcal pour le lait de vache. Le lait camelin est bien connu pour sa richesse en acide glutamique et une faible teneur en lysine (EL-AGAMY, 2006). Ce lait est aussi riche en vitamines (3,7 g/l) (voir tableau III) tels que la vitamine B3 (niacine) (EL-AGAMY, 2006) et en vitamine C (acide ascorbique) (FARAH *et al.*, 1992 ; MEHAIA, 1994). Enfin, la matière grasse du lait de chamelle apporte des acides gras à longue chaîne tels que l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1) (ATTIA *et al.*, 2000a).

Tableau III : Concentration moyenne en vitamines du lait de chamelle et du lait de vache (KAMAL, 2016).

Vitamines	Lait de chamelle (mg/L)			Lait de vache (mg/L)	
	SAWAY A <i>et al.</i> , 1984	KAPPELER, 1998	ZHANG <i>et al.</i> , 2005; ZHAO <i>et al.</i> , 2015	FARAH, 1993	MEDHAMMAR <i>et al.</i> , 2012
A (Rétinol)	0,15	0,15	0,97	0,27	0,47
B1(Thiamine)	0,32	0,58	0,13	0,57	0,51
B2(Riboflavine)	0,40	0,78	1,24	1,56	1,75
B3(Niacine)	4,47	4,46	-	0,63	0,93
B5(Acide pantothénique)	0,85	0,85	-	3,63	3,81
B6(Pyridoine)	0,51	0,50	0,54	0,50	0,41
B9(Acide Folique)	0,0040	0,004	-	0,053	-
B12(Cobalamine)	0,0015	0,002	-	0,004	0,0046
E(Tocophérol)	-	0,51	1,50	0,15	-
C(Acide ascorbique)	23,26	29,07	30,07	12,60	-

Le lait de chamelle contient des teneurs élevées en molécules à activité antimicrobienne tels que le lysozyme, la lactoperoxydase, la lactoferrine et les immunoglobulines (EL-HATMI *et al.*, 2006; EL AGAMY *et al.*, 1992; KAPPELER *et al.*, 1999). Cette richesse, entraîne une résistance à la fermentation et à la prolifération bactérienne tels que *Brucella Melitensis* (HAMDY ET AMIN, 2002; KAMOUN, 1990).

1.2. Les protéines

Les protéines du lait sont des constituants essentiels, vitaux font partie intégrante de la nourriture en tant que source d'énergie et d'acides aminés exogènes nécessaires à la croissance d'un organisme (SZWAJKOWSKA *et al.*, 2011)

La quantité totale de protéines camelines varie de 2,15 à 4,90 g/100g avec une moyenne de 3 g/100g (KONUSPAYEVA *et al.*, 2009 ; BREZOVECKI *et al.*, 2015).

Selon son organisation tridimensionnelle, la fraction protéique du lait peut être scindée en deux grands groupes. Le premier, représente environ 80% des protéines totales, est de type micellaire, peu organisé et qui a la particularité de précipiter entièrement à son pH isoélectrique. Cette fraction est constituée de caséines. Le second d'environ 20% à 25 % restant, comprend des protéines relativement organisées, pour la plupart de type globulaires à savoir les protéines du lactosérum (WANGOH *et al.*, 1998).

Le lait contient également un certain nombre de protéines présentant des propriétés biologiques variées (enzymes, facteurs de croissances, immunoglobulines ...etc).

1.2.1. Protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum constituent 20 à 25% des protéines totales (KHASKHELI *et al.*, 2005). Leur taux fluctue entre 0,9 à 1,0 % de la composition globale du lait, cette teneur est plus importante que celle du lait de vache (0,7-0,8 %) (AL-ALAWI et LALEYE, 2011).

La composition en protéines du lait camelin est différente de celle du lactosérum du lait bovin. Le lait de dromadaire se singularise par l'absence en son sein de la protéine sérique majeure du lait bovin à savoir la β -lactoglobuline (FARAH, 1986 ; FARAH et ATKINS, 1992 ; KAPPELER *et al.*, 1998 ; LALEYE *et al.*, 2008), qui est aussi absente dans le lait humain (SALAMI *et al.*, 2008 ; EL-AGAMY *et al.*, 2009 ; ELHATMI *et al.*, 2012). Cette protéine a été signalée comme étant l'une des principales sources d'allergie du nourrisson.

En effet, en plus de l' α -Lactalbumine, l'albumine sérique, les immunoglobulines, les protéose-peptones, la lactoferrine, la lactopéroxydase et le lysozyme (KAPPELER *et al.*, 1999, EL-AGAMY, 2000 ; GIRARDET *et al.*, 2000), d'autres protéines spécifiques au lait de chamelle ont été isolées et caractérisées dont :

- Une protéine à caractère acide dénommée Whey Acidic Protein (KAPPELER, 1998) ;
- Une protéine de reconnaissance du peptidoglycane homologue à celle du lait humain (KAPPELER, 1998) ;
- Une protéine basique dénommée Camel Whey Basic Protein (EL-HATMI *et al.*, 2007) ;

- Une protéine de 14000 Da riche en résidus cystéine et dont l'extrémité N-terminal présente une similitude de structure avec celle des caséines α - et β -camelines (BEG *et al.*, 1984).

En outre, ces protéines sériques sont thermorésistantes (FARAH *et al.*, 1996). EL-AGAMY *et al.*, (2000) ont montré que le chauffage du lait camelin à 85°C pendant 10 min inhibe seulement 56% du lysozyme et 65,5% de la lactoferrine alors que l'application du même traitement thermique au lait bovin inhibe 73 % du lysozyme et 98,8% de la lactoferrine.

L' α -Lactalbumine est la principale composante de la fraction protéinique du lactosérum camelin. A l'opposé, la β -Lactoglobuline représente la composante principale (50%) des protéines lactosériques bovines, suivie par l' α -Lactalbumine (25%) (AL HAJ et AL KANHAL, 2010). L' α -Lactalbumine cameline est très riche en acides aminés essentiels et particulièrement en : Trp, Cys et Lys, où elle contient 21,6% de ces trois aminoacides alors que son analogue bovin n'en contient que 19,6%.

Le lait de chamelle contient d'autres protéines protectrices, on peut citer :

- La lactoferrine du lait est connue par sa rétention du fer. En outre de ce rôle, la lactoferrine est un antimicrobien (MAL et PATHAK, 2010), notamment pour les espèces bactériennes dont le métabolisme exige cet élément.
- La lactoperoxydase, enzyme d'oxydo-réduction à activités bactériostatique et bactéricide principalement sur les bactéries GRAM négatif (TAYEFI-NASRABADI *et al.*, 2011b).
- Le lysozyme du lait de chamelle possède une activité de lyse supérieure à celle du lysozyme bovin, mais inférieure à celle du lysozyme du blanc d'œuf (EL-AGAMY *et al.*, 1996).
- Les protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRPs) possèdent une activité antimicrobienne et ont la capacité de contrôler les métastases du cancer (MAL et PATHAK, 2010).
- Les immunoglobulines se distinguent par l'organisation de leurs chaînes lourdes qui diffèrent complètement de ce qui est connu chez les autres vertébrés (KONUSPAYEVA *et al.*, 2004).

1.2.2. Les caséines

Les caséines sont des protéines spécifiques du lait et elles représentent la majeure partie de ses composants azotés. Ce sont des complexes protéiques phosphorés à caractère acide, elles sont naturellement regroupées formant des particules colloïdales appelées micelles de caséine (FILION, 2006 ; LIU et GUO, 2008).

Les caséines sont synthétisées par l'épithélium sécrétoire mammaire sous forme de précurseurs contenant un peptide signal qui permet l'adressage et qui sera clivé au cours du passage de ces protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique (GAYE *et al.*, 1977 ; MERCIER et GAYE, 1980).

Les caséines se définissent comme étant la fraction protéique précipitant à pH 4,6 et à 20°C pour le lait écrémé bovin (THOMPSON *et al.*, 1965) et à pH 4,3 et 20°C pour le lait écrémé camelin (WANGOH *et al.*, 1998). La teneur des caséines dans le lait de chamelle est généralement plus faible que dans le lait de vache et varie de 1,63 à 2,76 g/100g, ce qui constitue un pourcentage de 52 à 87 % des protéines totaux (AL HAJ AND AL KANHAL, 2010; MEHAIA *et al.*, 1995 ; SEHER *et al.*, 2013; MATI *et al.*, 2016).

Les caséines sont au nombre de quatre : caséine α_1 , caséine α_2 , caséine β et caséine κ , ce sont des protéines multi-phosphorylées. La caséine β est la principale fraction caséinique (65%) du lait de chamelle suivie de la caséine α_1 (21%) (KAPPELER *et al.*, 1998). La composition en acides aminés des caséines camelines est caractérisée par un faible taux en glycine et en cystéine et cette composition est identique à celle de leurs homologues bovins (FARAH et RUEGG, 1989, OCHIRKHUYAG *et al.*, 1997 ; KAPPELER *et al.*, 1998).

Dans le lait, les caséines sont organisées sous forme de micelles et s'associent par un complexe minéral de phosphate de calcium. Les micelles se forment à l'intérieur des vésicules du Golgi où il a été observé en microscopie électronique l'agrégation de petites particules submicellaires en plus grandes particules micellaires (FARRELL Jr., 1988). Un des rôles de la micelle est de transporter le phosphate et le calcium dans le lait, permettant de maintenir dans le lait une concentration élevée de calcium fortement assimilable.

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

Le lait de chamelle est similaire au lait humain en ce qui concerne ce pourcentage élevé en caséine β , ce qui pourrait refléter son taux de digestibilité plus élevé et une plus faible incidence allergique dans l'intestin des nourrissons que le lait bovin (EL-AGAMY *et al.*, 2009; El HATMI *et al.*, 2012).

Le tableau IV résume les principaux constituants protéiques du lait de dromadaire et de vache.

Tableau IV : Concentrations moyennes des protéines dans le lait de dromadaire et de vache (mg/L) (KAPPELER *et al.*, 2003 ; BENKERROUM, 2008).

Protéines	Dromadaire	Vache	Fonction principale
α 1 caséine	5000	12000	Nutritive (aa, Ca,P)
α 2 caséine	2200	3000	Nutritive (aa, Ca,P)
β caséine	15000	10000	Nutritive (aa, Ca,P)
κ caséine	800	3500	Coagulation de la micelle de caséines
α Lactalbumine	3500	1260	Synthèse du lactose
β Lactoglobuline	00	3500	Liaison et transport des a. gras et du rétinol
Lactophorine (PP3)	950	300	Inhibition de la lipolyse
Lactoferrine	95	140	Anti-inflammatoire, nutritive, fixation du fer
Lactoperoxydase	-	30	Anti-inflammatoire, activité bactéricide
Lysozyme	0,6-6,5	0,05-0,21	Activité bactéricide, N-acétylmuralidase

- : élément non dosé

1.2.2.1. Les différents types de caséines

➤ Caséine α 1

La caséine α 1 est la protéine la plus abondante dans le lait de vache. Elle représente entre 34 et 40% des caséines soit entre 9-11g/l de lait de chamelle. Cette fraction compte 215 acides aminés pour une masse moléculaire de 25,773 kDa et un point isoélectrique de 4,4 (KAPPELER *et al.*, 1998 ; HAILU *et al.*, 2016). Cette caséine est sensible à l'action des protéases (DE ROISSART et LUQUET, 1994 ; FARREL *et al.*, 2004).

La caséine α 1 cameline a deux variants génétiques A et B (KAPPELER *et al.*, 1998) qui sont phosphorylés au niveau des résidus sérines : 18, 68, 70, 71, 72 et 73 et un autre variant C a été rapporté par SHUIEP *et al* (2013).

➤ Caséine α 2

Cette fraction est présente dans le lait de chamelle à une moyenne de 2,6 g/l (AL-ALAWI *et al.*, 2011). Sa structure primaire contient 178 résidus d'acides aminés dont 11 résidus de sérine phosphorylés et deux résidus cystéine font un pont disulfure. C'est la caséine la plus hydrophile et la plus sensible au calcium. Le poids moléculaire de cette fraction est d'environ 21,266 kDa, alors que son pH isoélectrique est 4,58 (KAPPELER *et al.*, 1998).

La caséine α 2 cameline présente des délétions au niveau de sa structure primaire, cette délétion entraîne la perte de trois sérines phosphorylées successives présentes dans la caséine α 2 bovine. Ce qui n'est pas sans conséquence dans l'assemblage de la micelle, dans sa stabilité et dans ses propriétés nutritionnelles (FERRANTI *et al.*, 1995).

➤ Caséine β

La β -CN est la principale protéine de la caséine du lait de dromadaire et représente environ 65 % de la caséine totale (KAPPELER *et al.*, 1998). L'analyse quantitative effectuée par OMAR *et al.*, (2016) a montré une quantité plus élevée de β -CN dans le lait camelin : β -CN (12,78 mg/mL), α s-CN (2,89 mg/mL) et κ -CN (1,67 mg/mL).

La séquence primaire, étudiée par KAPPELER *et al.* (1998) (Figure 01), présente 217 acides aminés, avec une masse moléculaire qui varie de 23,8 à 35 kDa (OCHIRKHUYAG *et al.*, 1997 ; KAPPELER *et al.*, 1998 ; SHUIEP *et al.*, 2014) et son point isoélectrique est à pH 4,76 (KAPPELER *et al.*, 1998).

Arg-Glu-Lys-Glu-Glu-Phe-Lys-Thr-Ala-Gly-Glu-Ala-Leu-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu²¹
Ser-Ile-Thr-His-Ile-Asn-Lys-Gln-Lys-Ile-Glu-Lys-Phe-Lys-Ile-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Gln⁴⁶
Gln-Asp-Lys-Ile-Tyr-Thr-Phe-Pro-Gln-Pro-Gln-Ser-Leu-Val-Tyr-Ser-His-Thr-Glu-Pro-Ile-Pro-Tyr-Pro-Ile⁷¹
Leu-Pro-Gln-Asn-Phe-Leu-Pro-Pro-Leu-Gln-Pro-Ala-Val-Met-Val-Pro-Phe-Leu-Gln-Pro-Lys-Val-Met-Asp-Val⁹⁶
Pro-Lys-Thr-Lys-Glu-Thr-Ile-Ile-Pro-Lys-Arg-Lys-Glu-Met-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Pro-Val-Val-Pro-Phe-Thr¹²¹
Glu-Ser-Gln-Ser-Leu-Thr-Leu-Thr-Asp-Leu-Glu-Asn-Leu-His-Leu-Pro-Leu-Pro-Leu-Leu-Gln-Ser-Leu-Met-Tyr¹⁴⁶
Gln-Ile-Pro-Gln-Pro-Val-Pro-Gln-Thr-Pro-Met-Ile-Pro-Pro-Gln-Ser-Leu-Leu-Ser-Leu-Ser-Gln-Phe-Lys-Val¹⁷¹
Leu-Pro-Val-Pro-Gln-Gln-Met-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg-Ala-Met-Pro-Val-Gln-Ala-Val-Leu-Pro-Phe-Gln-Glu¹⁹⁶
Pro-Val-Pro-Asp-Pro-Val-Arg-Gly-Leu-His-Pro-Val-Pro-Gln-Pro-Leu-Val-Pro-Val-Ile-Ala²¹⁷

Figure 01: Séquence primaire de la β -caséine cameline. (KAPPELER *et al.*, 1998).

L'étude de KAPPELER (1998) a montré que la β -CN cameline est phosphorylée aux niveaux des Ser15, Ser17 et Ser18. En 2014, SAADAoui *et al.* ont montré la présence d'un autre phosphate, probablement la Ser19. Elle est dépourvue de résidus glucidiques et de cystéine. Sa teneur en proline est légèrement supérieure à celle obtenue dans le lait bovin (17,1 contre 16,7 %, respectivement). Cette teneur en proline plus élevée dans les caséines camelines peut conduire à une déstabilisation des structures secondaires de manière plus prononcée que dans les caséines bovines.

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

Comme dans le cas du lait de référence, la caséine β est la plus hydrophobe de toutes les caséines bien qu'elle ait un caractère amphipolaire assez marqué (BALTHAZAR *et al.*, 2017). En effet, les charges négatives de la caséine β sont essentiellement présentes dans la partie N-terminale, contenant les résidus phosphorylés ce qui rend cette partie fortement hydrophile. La partie C-terminale est très riche en groupements apolaires.

Les caséines camelines contiennent plus de β caséine que de α S et de κ caséine (WANG *et al.*, 2017). Selon BREZOVECKI *et al.* (2015) et BALTHAZAR *et al.* (2017), la concentration élevée en β caséine peut-être la raison de la bonne digestibilité de ce lait et la diminution des allergies infantiles car la β -CN est plus sensible à l'hydrolyse peptidique que les caséines α S (EL AGAMY *et al.*, 2009).

➤ Caséines κ

C'est la plus étudiée en raison de son rôle fondamental dans le phénomène de stabilisation/déstabilisation de la micelle. La caséine κ représente seulement 3,47% de la caséine cameline totale (AL HAJ et Al KANHAL, 2010). Le site d'action de la chymosine dans la caséine κ est : Phe 97-Ile98 (KAPPELER *et al.*, 1998).

La κ -caséine du lait de chamelle est composée de 162 acides aminés avec un pH isoélectrique de 4,11 et une masse moléculaire de 18,254 kDa (KAPPELER *et al.*, 1998). Les sites de phosphorylation y sont présents en 2 positions (Ser141 et Ser159) (HAMIDI, 2015). Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. Cette caséine est insensible au calcium et stabilise les autres caséines phosphorylées (MAÂMRI et MEKHLOUFI, 2013).

1.2.2.2. La micelle de caséine

Les caséines du lait de chamelle, comme pour les autres types de lait, sont organisées en micelles. La micelle de caséines permet, par un regroupement adéquat, de maintenir en solution des protéines non globulaires et de fixer en son sein une quantité importante de phosphate de calcium et magnésium colloïdal (KADA et ANANE, 2018).

Pour comprendre comment ces protéines arrivent à s'organiser dans le lait et permettre les différentes transformations connues en produits dérivés du lait, trois modèles ont été proposés jusque-là :

- à noyau enveloppé de WAUGH *et al.* (1971) ;
- à structure interne uniforme décrit par GARNIER et DUMAS (1970) ;
- en submicelles de SCHMIDT (1980).

L'organisation de la micelle de caséines du lait camelin est compatible avec le modèle moléculaire proposé par Schmidt (1980) (Figure 02) pour le lait bovin (ATTIA *et al.*, 2000 ; KHEROUATOU *et al.*, 2003).

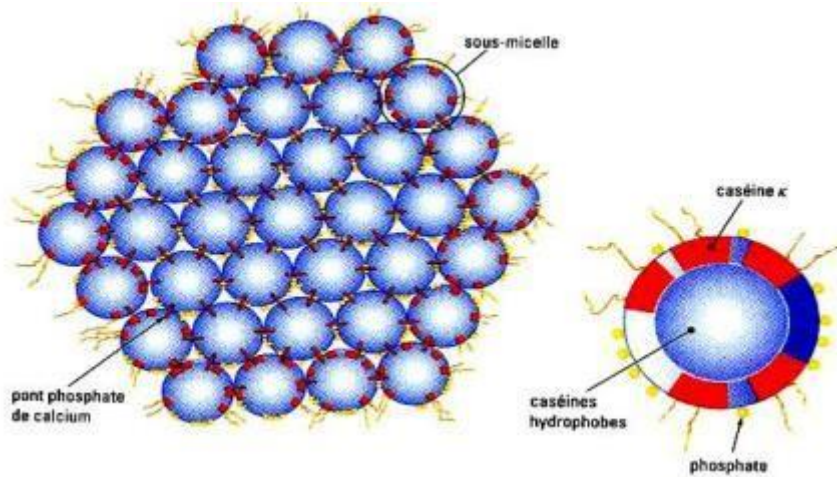


Figure 02 : Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SHMIDT (1980).

Le modèle de SHMIDT qui repose sur l'existence de submicelles de caséines, qui s'associent par pontage phosphocalcique (figure 03), reste l'un des plus admis, car il est conforté par les essais de comportements des protéines dans diverses conditions (action enzymatique de la chymosine immobilisée, fixation de la β -lactoglobuline en surface induite par des traitements thermiques excessifs, action des détergents) (HOLT, 1992).

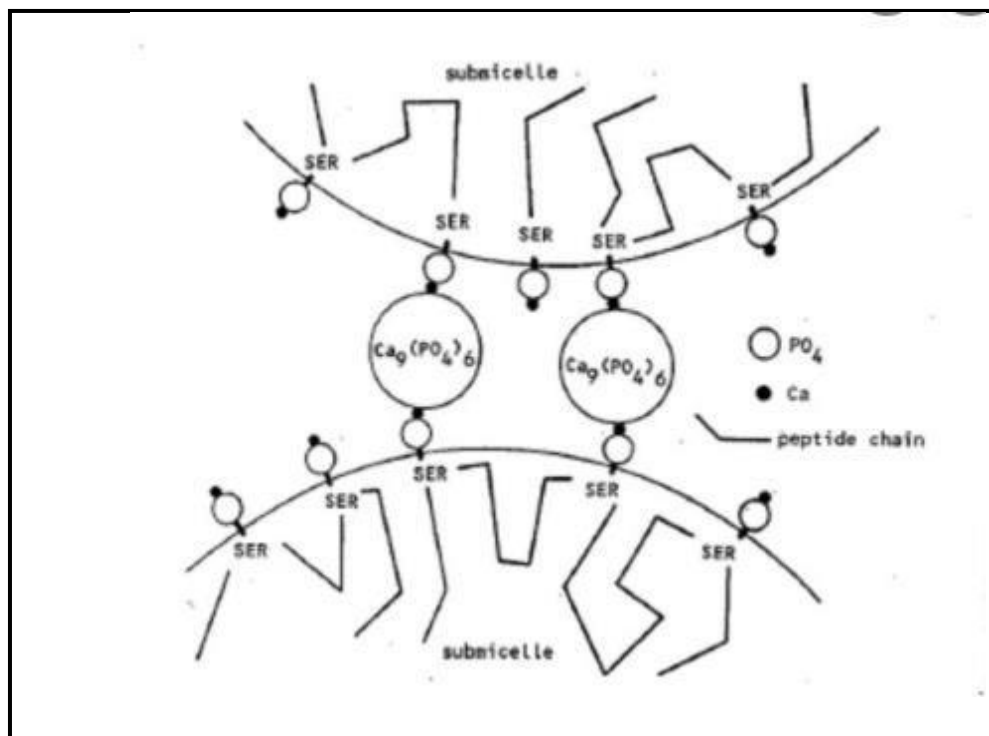


Figure 03 : Schéma de pontage de deux submicelles par le phosphate calcium (SCHMIDI, 1982)

Néanmoins, l'observation, par balayage aux rayons X, pour la première fois de la structure des micelles de caséines sur un domaine étendu d'échelles de longueurs allant de 2 nm à 1000 nm et l'analyse des courbes de diffusion qui en découlent n'ont pas confirmé la présence de ces structures "submicellaires" (PIGNON *et al.*, 2004; MARCHIN *et al.*, 2007).

La composition des submicelles au centre et en périphérie est différente. En effet, les caséines β et α_1 sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe alors que la partie externe, d'avantage hydrophile, est formée de caséines α_1 , α_2 et κ (AMIOT *et al.*, 2002). de ce fait la caséine κ est accessible à l'enzyme coagulante (BOUDJENAH, 2012).

En ce qui concerne l'organisation structurale de la micelle de caséine cameline, les rares travaux publiés sur ce sujet ont concerné exclusivement l'aspect et la taille visualisée par microscopie électronique. Elle est de forme sphérique, de taille variable (25 à 400 nm selon GOUDA *et al.* (1984) et est composée d'un certain nombre de submicelles (FARAH et BACHMANN, 1987).

KHEROUATOU (2004) a mentionné que la micelle de caséine du lait de dromadaire diffère de son homologue du lait de référence sur plusieurs aspects :

- ✓ un diamètre micellaire plus important (0,4-0,5 μm contre 0,13-0,16 μm) ;
- ✓ une distribution de taille plus large (0,6 μm contre 0, 3 μm) ;
- ✓ une minéralisation plus élevée (11,4 contre 7,2 g/100g de poids sec) ;
- ✓ un taux de caséines totales plus faible (20,60 g/kg contre en moyenne 28 g/kg).

Certaines différences concernant la charge minérale des micelles ont également été remarquées. Par conséquent, il est à noter que le diamètre moyen des micelles de caséine est étroitement liée à la fraction de Ca / Caséine. En outre, il a été établi que les grandes micelles sont plus riches en phosphate de calcium alors que les petites micelles sont plus riches en κ -CN.

Les micelles peuvent être déstabilisées en agrégat en utilisant l'une de ces trois principales méthodes : l'utilisation d'enzymes protéolytiques, les conditions acides et les traitements thermiques.

1.3. La digestion enzymatique de la caséine

Les enzymes protéolytiques (protéases ou protéinases) font partie de la classe des hydrolases (EC 3.4.21-24.x). En effet, ce sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques en scindant la liaison peptidique qui lie deux acides aminés dans une chaîne peptidique et sont produites dans le milieu extra et intra cellulaire (KUMAR *et al.*, 2008).

Dans l'hydrolyse enzymatique, le taux de clivage des liaisons peptidiques dépend principalement de deux facteurs : la spécificité de l'enzyme et l'accessibilité aux liaisons peptidiques (ADLER-NISSEN, 1986).

1.3.1. Enzymes gastriques

1.3.1.1. Pepsine

La pepsine, découverte par Theodor Schwann en 1825, fut la première enzyme identifiée dans la famille des protéases aspartiques. En 1836, Schwann avait dénommé « pepsine » la protéase qu'il avait obtenue à partir de l'estomac de porc (FOLTMANN *et al.*, 1995).

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

Elle hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé aromatique (Tyr, Trp, Phe) engage sa fonction amine (RAISONNIER, 2004). Lors de l'hydrolyse de la liaison peptidique, les deux acides aspartiques jouent simultanément le rôle de donneur et de receveur de protons (DUNN, 2002).

1.3.1.2. Chymosine

Le nom « chymosine », donné par le pharmacien avallonnais Jean-Baptiste Deschamps (1840), dérive du mot grec "Khymos" qui veut dire « liquide gastrique ». On l'appelle aussi rennine, mais l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUBMB) a préféré le terme chymosine pour éviter la confusion avec la rénine, enzyme plasmatique spécifique qui hydrolyse l'angiotensinogène.

La chymosine (EC 3.4.23.4), est une enzyme néonatale possédant une forte activité coagulante. Elle clive spécifiquement la caséine κ dans la position (Phe105-Met106) du lait de vache et la position (Phe97-Met98) provoquant la coagulation du lait dans l'estomac des pré-ruminants (FOLTMANN, 1970 ; KAGEYAMA *et al.*, 2000). Ce phénomène permet aux protéines du lait d'être suffisamment exposées aux enzymes gastriques pour une digestion plus complète (PETIT *et al.*, 1987).

C'est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 323 acides aminés (35,6 kDa). Elle est synthétisée *in vivo* sous forme de préprochymosine de 381 acides aminés (42,1 kDa) avec une séquence signalé amino-terminale de 16 acides aminés hydrophobes, clivés avant la sécrétion, produisant ainsi la prochymosine de 365 acides aminés (40,7 kDa) (FOLTMANN, 1966).

La prochymosine devient active sous l'action de l'acidité présente dans le milieu gastrique. A pH 4-5, elle est convertie en chymosine mature par coupure d'un pro-segment de 42 acides aminés N terminaux, tandis qu'à pH 2, elle subit un clivage d'un peptide de 27 acides aminés N-terminaux générant un intermédiaire actif appelé pseudo-chymosine de 338 acides aminés (37,4 kDa) (PEDERSEN *et al.*, 1979). Ce dernier est stable à un pH inférieur à 3 ou supérieur à 6 mais à pH 4,5, il se transforme en chymosine (KUMAR *et al.*, 2010).

Au moins trois variants génétiques ont été mis en évidence pour la chymosine bovine : la chymosine A, B et C (DONNELLY *et al.*, 1984 ; DONNELLY *et al.*, 1986). La variante C a été considérée comme un produit de dégradation de la chymosine A, avec perte d'un tripeptide (Asp244-Glu245-Phe246) (DANLEY et GEOGHEGAN, 1988).

En PAGE SDS, les trois variantes ont la même mobilité électrophorétique avec un PM de 35,6 kDa mais ils peuvent être séparés l'un de l'autre par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (RAMPILLI *et al.*, 2005).

Bien que la chymosine A possède une plus grande activité coagulante que la chymosine B, cette dernière reste la plus utilisée en fromagerie car elle a une plus grande durée de conservation (PALMER *et al.*, 2010).

1.3.2. Enzymes pancréatiques

Les cellules acineuse du pancréas expriment et sécrètent de grandes quantités de molécules dont 90% sont douées d'une activité enzymatique. Le pancréas humain délivre quotidiennement de 6 à 20g d'enzymes (de proenzymes inactives ou zymogènes) (MEDART, 2005)

1.3.2.1. Endopeptidases

➤ Trypsine

La trypsine (EC 3.4.21.4) est une des protéases à sérine, sécrétée par les cellules acineuses du pancréas sous forme d'une pro-enzyme appelée le trypsinogène (MIKES *et al.*, 1966). Ce dernier est activé au niveau du duodénum sous l'action de l'entéropeptidase, par hydrolyse spécifique de la liaison Lys15- Ile16. Dès qu'une très faible quantité de trypsine est libérée du précurseur, la réaction devient autocatalytique (ABITA *et al.*, 1969). La trypsine est formée de 201 résidus d'acides aminés en une seule chaîne polypeptide et possède quatre ponts disulfures, son poids moléculaire est de 24 kDa. (KAUFFMAN, 1965; HUBER *et al.*, 1974).

Le rôle physiologique de la trypsine est alors de participer au processus de digestion: hydrolyse des protéines alimentaires en petits peptides ou acides aminés assimilables (GHASEMI, 2007). C'est une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé (Lys, Arg) engage sa fonction acide (RAISONNIER, 2004).

➤ Chymotrypsine

La chymotrypsine appartenant à la famille des protéases à sérine. C'est une endopeptidase synthétisée dans le pancréas sous la forme d'un précurseur inactif le chymotrypsinogène, qui sous l'action d'enzymes protéolytiques des intestins grêles est converti en chymotrypsine (DUBOIS, 2006). Elle hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles les acides aminés Tyr, Trp, Phe et Met engagent leur fonction acide.

La chymotrypsine est composée de 241 résidus d'acides aminés avec une masse moléculaire de 25,230 kDa. Elle présente une structure globulaire compacte de trois chaînes

reliées par deux ponts disulfures, inter chaînes, Cys1-Cys122, Cys136-Cys201 et repliées en 2 domaines (domaine 1 et domaine 2), de 120 acides aminés, chacun étant constitué essentiellement d'un tonneau β , formé de 6 brins β anti-parallèles. Il y a une certaine similarité de séquences entre les deux domaines. Elle possède également trois ponts disulfures intra chaîne: Cys42-Cys58, Cys168-Cys182, Cys191-Cys220 (BROWN et HARTLEY, 1966).

1.3.2.2. Exopeptidases

Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons à l'extrémité des chaînes peptidiques (SALAH, 2008).

Les carboxypeptidases sont des métallo-carboxypeptidases qui possèdent un atome de zinc, fortement lié à l'enzyme et nécessaire à son activité hydrolytique, sécrétées sous la forme d'un précurseur inactif (procarboxypeptidase) (SALAH, 2008).

A. Carboxypeptidase A : Elle existe sous forme de deux variantes A1 et A2 dans le suc pancréatique humain. Ces variantes agissent tous au niveau des acides aminés aromatiques et complètent l'action de la chymotrypsine (SALAH, 2008).

B. Carboxypeptidase B : Elle est présente sous forme de deux variantes dans le suc pancréatique humain. Cette enzyme complète l'action de la trypsine par l'hydrolyse des liaisons peptidiques C-terminale impliquant soit l'arginine soit la lysine (GIARDINA *et al.*, 1999).

1.4. Activités biologiques des caséines

Il est maintenant bien connu qu'à côté du rôle physiologique principal des caséines du lait en tant que source d'acides aminés nécessaires à la croissance du nouveau-né, ces protéines peuvent contenir des peptides cryptés dans leurs séquences, qui peuvent présenter diverses activités biologiques une fois libérées (JRAD *et al.*, 2015). Par conséquent, les caséines peuvent jouer des fonctions biologiques importantes après avoir été hydrolysées avec différentes protéases (JRAD *et al.*, 2015 ; KUMAR *et al.*, 2016) (tableau V).

Certains auteurs ont également signalé que les peptides bioactifs dérivés des caséines diminuent le risque des maladies cardiovasculaires, de diabète et de cancers. Ces vertus seraient dues aux activités : antioxydante, antibactérienne et anti-hypertensive assignées à ces peptides (MCLACHLAN, 2001; RIVAL *et al.*, 2001 ; KUMAR *et al.*, 2016). Des tels rapports stimulent l'intérêt pour les aliments fonctionnels, qui ont des propriétés favorables.

1.4.1. Activité antioxydante

L'oxydation est un processus vital dans tous les organismes vivants, même si ses effets secondaires sont la production des radicaux libres (REN *et al.*, 2008). Le mécanisme d'action d'un antioxydant est lié à l'inactivation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) par piégeage des radicaux libres, chélation des métaux de transition pro-oxydatifs et réduction des hydroperoxydes (ZHOU *et al.*, 2012). Il est bien documenté que la formation des radicaux

libres est un facteur majeur impliqué dans la progression de nombreuses maladies humaines, telles que les maladies vasculaires cérébrales, l'athérosclérose et le cancer, qui ont été considérées comme les principales causes de décès chez l'homme (DAVALOS *et al.*, 2004).

Des hydrolysats de caséine ayant une activité antioxydante cellulaire ont été rapportés dans des nombreuses études. Plusieurs auteurs ont signalé que les caséinophosphopeptides présentaient des effets cyto-protecteurs contre le stress oxydatif induit par H₂O₂ dans les cellules Caco-2 (GARCIA-NEBOT *et al.*, 2011 ; XIE *et al.*, 2013).

L'activité antioxydante des caséines issues du lait de chamelle et de leurs hydrolysats a été rapportée par plusieurs auteurs. Comme la fraction des caséines du lait de chamelle est riche en β -CN, ce composant pourrait être la meilleure source de peptides antioxydants (JRAD *et al.*, 2014). KUMAR *et al.* (2016) ont montré que l'hydrolyse des caséines camelines par des protéases telles que l' α -chymotrypsine, papaïne et l'alcalase produit des hydrolysats avec une activité antioxydante beaucoup plus élevée que celle des caséines natives. SALAMI *et al.* (2011) ont rapporté que la β -CN cameline possède une activité antioxydante élevée après hydrolyse par la chymotrypsine.

1.4.2. Activité anti-hypertensive

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) est une carboxypeptidase peptidique qui catalyse la production de l'angiotensine II (peptide qui entraîne une vasoconstriction) et l'inactivation de la bradykinine (nano peptide qui est un puissant vasodilatateur endothéliumdépendant). Les molécules inhibant de manière significative son activité peuvent exercer une activité anti-hypertensive *in vivo*, mais il est clair qu'une inhibition significative de l'ECA *in vitro* ne justifie pas un effet antihypertenseur *in vivo* (HERNANDEZ-LEDESMA *et al.*, 2011).

Les peptides dérivés du lactosérum et de la caséine ont montré des activités inhibitrices de l'ECA (LOPEZ-FANDINO *et al.*, 2006).

SALAMI *et al.* (2011) ont mesuré *in vitro* l'inhibition de l'activité de l'ECA par les caséines du lait camelin (caséine entière de dromadaire et β -CN) et qui ont montré une forte activité inhibitrice de l'ECA après l'hydrolyse avec de la pepsine et avec le mélange de 3 protéases (pepsine, chymotrypsine, trypsine). Les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que le β -CN peut jouer un rôle important dans la caséine du lait de chamelle comme source naturelle d'agents antihypertenseurs.

1.4.3. Activité antibactérienne

Dans le lait, des systèmes inhibiteurs naturels ou non, peuvent agir sur les microorganismes, certains sont liés à la composition physico-chimique de lait (OMANE et ZRUG, 2015), parmi ces composants figurent des protéines. Le lait de chamelle est connu pour être une source importante de peptides (HILL *et al.*, 1974).

Certaines études ont montré que la caséine a des effets antibactériens. La caséine a été utilisée pour inhiber les bactéries qui causent les infections des gencives (Gingivitis) (HUSSIEN, 2011).

Les caséicidines sont issues de l'hydrolyse des caséines du lait bovin. Elles font partie des peptides anti-microbiens les plus purifiés actuellement, qui montrent une activité *in vitro* contre *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (LAHOV et REGELSON, 1996).

Tableau V: Activités biologiques des peptides identifiés dans le lait de chamelle.

Origine du peptide	Séquence du peptide	Fonction attribuée	Référence
κ -CN (fermentation par <i>Lactobacillus helveticus</i>)	AIPPKKTQD (f 100- 107)	Activité inhibitrice de l'ECA	Shuangquan <i>et al.</i> (2008)
κ -CN (digestion par les enzymes pancréatiques)	IPP	Activité inhibitrice de l'ECA	Tagliazucchi <i>et al.</i> (2016)
Caséines (fermentation par <i>Streptococcus thermophilus</i>) β -CN	KVLPVPQ VPYPQR PVRG L ⁷⁶ PP ⁷⁸ V ¹¹⁸ PF ¹²⁰ I ¹⁵⁸ PP ¹⁶⁰	Activité de piégeage des radicaux Activité inhibitrice de l'ECA	El Hatmi <i>et al.</i> (2016)
α S1-CN (Ct)	AMPVQAVLPFQEPVPDPVR G ¹⁹⁷ GKTDVMPQW W ²¹⁷	Activité anti-inflammatoire Activité de piégeage des radicaux	
α S2-CN (Ct)	M ¹⁶⁸ TPWNHIKRY F ¹⁷⁸	Activité de piégeage des radicaux	
κ -CN	YPSYGIN	Homologue de l'antagoniste opioïde	
Fermentation par <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Peptides < 5KDa Peptides 5- 10KDa	Activité inhibitrice de l'ECA Activité de piégeage des radicaux	
Caséines (digestion par la pepsine et la pancréatine)	Peptides < 1KDa	Activité antibactérienne	Jrad <i>et al.</i> (2015)
β -CN et l'hydrolysats total	Peptides 3KDa Peptides 5- 10KDa	Activité inhibitrice de l'ECA Activité Antioxydante	Salami <i>et al.</i> (2011)

Matériel
&
Méthodes

II. Matériel & Méthodes

La partie expérimentale de cette présente étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou.

2.1. Matériel

2.1.1. Matériel biologique

2.1.1.1. Lait de chamelle

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

Il a été recueilli dans des bouteilles en plastique neuves et propres et acheminé au Laboratoire dans une glacière.

2.1.1.2. Enzymes et protéines étalons

- Pepsine (EC 3.24.3.1), extraite de la muqueuse de l'estomac porcine, activité de 3000-4500 unités/mg de protéine.
- Trypsine (EC 3.4.21.4) extraite de pancréas bovin, activité de 1645 U/mg de protéine (Sigma Chemical, États-Unis).
- α -chymotrypsine (E.C. 3.4.21.1) extraite de pancréas bovin, activité de 57,24 U/mg (Sigma Chemical, États-Unis).
- Kit de protéines étalons préparé au laboratoire, il comprend 4 protéines de PM connu : l' α -Lactalbumine (14 kDa), la β -lactoglobuline (18 kDa), l'ovalbumine (47 kDa) et l'albumine sérique bovine (67 kDa), utilisé pendant le contrôle électrophorétique PAGE-SDS.

2.1.1.3. Appareillage

- Unité de chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) avec une colonne analytique Lichrosorb C8 ;
- Unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales (Hoeffler SE 260) comprenant : couleur de gel, cuves d'électrophorèse, générateur de courant (250V, 100mA), plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 12 cm), espaceurs de 1mm d'épaisseur ;
- Centrifugeuse réfrigérée (max 28 000 x g ; SIGMA) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU) ;
- Lyophilisateur à plateaux (Telstar LyoQuest) ;

Autres matériels d'usages courants :

- Balance de précision à 0,01 mg (Denver Instrument) ;
- Balances analytiques à affichage digital (0,01 g ; Denver Instrument) ;
- pH mètre (Hanna Instruments) ;
- Distillateur d'eau (GFL) ;
- Bain-marie (Memmert) ;
- Agitateurs variés (magnétique, vortex, basculant....etc.).

2.1.1.4. Produits chimiques et réactifs

- **Solvants usuels:** Acéto-nitrile, éthanol, méthanol, eau distillée, glycérol, acide acétique, acide chlorhydrique (HCl), acide trichloracétique (TCA) ;
- **Sels et tampons :** Tris/HCl, phosphate monopotassique (KH₂PO₄), phosphate dissodique (Na₂HPO₄), persulfate de potassium, hydroxyde de sodium et azide de sodium ;
- **Colorants et réactifs spécifiques :** acrylamide, N,N'-méthylène bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, β-mercaptoéthanol, dodécyl-sulfate de sodium (SDS), persulfate d'ammonium, N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED), glycine, tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane (Tris), 2,2-diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), di-éthyl-aminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose)... etc.

2.2. Méthodes

2.2.1. Isolement des caséines totales

2.2.1.1. Écrémage

C'est une étape nécessaire pour éviter les interférences des lipides sur les entités protéiques. Elle consiste à éliminer la matière grasse par centrifugation à 3500 x g pendant 20 min à 4 °C. Le lait camelin est préalablement chauffé sous agitation pendant 30 min au Bain-marie à 30°C afin de permettre la remontée de la matière grasse en surface. A la fin de la centrifugation, la crème qui se consolide en surface est écartée à l'aide d'une spatule tandis que le lait est filtré par passage à travers une laine de verre qui permet d'emprisonner le reste de la matière grasse dans ses mailles.

2.2.1.2. Précipitation isoélectrique

Le lait écrémé qui en résulte est acidifié pH 4,3 comme préconisé par WANGOH *et al.* (1998) par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (4 N). Les caséines qui précipitent à leur pH isoélectrique sont séparées des protéines sériques par centrifugation à 3500 x g / 15 min, à 20°C (Figure 04).

Le culot des caséines est lavé trois fois sous agitation avec de l'eau distillée puis neutralisé à pH 7,0 avec une solution de NaOH 1 M. Cette opération est répétée trois fois pour une meilleure séparation des caséines avec les protéines sériques.

2.2.1.3. Dialyse et lyophilisation

Les caséines obtenues sont dialysées contre de l'eau distillée, contenant un antibactérien (azide de sodium 0,005 M) pendant 72h à 4°C avec un changement d'eau biquotidien.

Une fois dialysées, les solutions de caséines sont versées en fines couches dans des coupelles, puis congelées avant d'être lyophilisées et conservées sous cette forme dans un dessiccateur.

La pureté des caséines est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE-SDS ; PAGE-Urée).

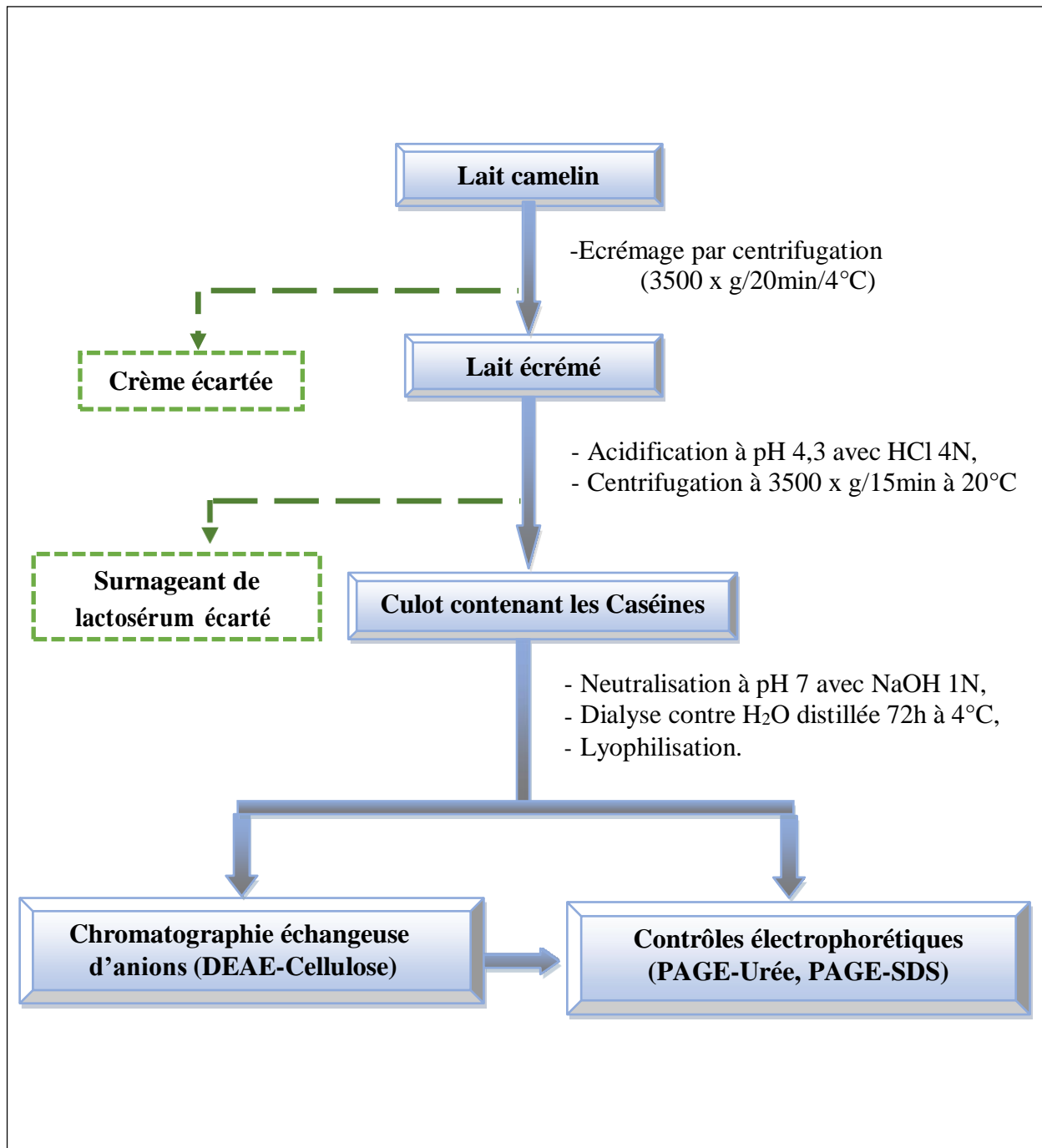


Figure 04: Etapes suivies pour l'isolement des caséines du lait de chamelle.

2.2.2. Purification de la β -caséine cameline

La β -caséine cameline peut être isolée et purifiée à partir des caséines totales selon différentes techniques. Néanmoins, les rendements d'extraction et la composition des fractions fluctuent selon le mode de séparation utilisé.

De ce fait, les choix à opérer sont ceux qui répondent le mieux aux critères suivant :

- une sélectivité de la méthode permettant l'obtention d'une fraction de β -caséine pure ;
- un bon rendement d'extraction sans perte de la matière ;
- l'utilisation de méthodes les moins dénaturantes possibles ;

Pour cela, nous avons opté pour la chromatographie échangeuse d'anions sur diéthylaminoéthyle (DEAE) cellulose en batch.

2.2.2.1 Chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose

2.2.2.1.1. Principe

La séparation par chromatographie d'échange d'ions se base sur la différence de charge électrique des protéines. La phase stationnaire de la DEAE est une résine de cellulose sur laquelle sont greffés les groupements diéthyleaminoéthyles, qui sont chargés positivement à pH alcalin. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines suivant un ordre décroissant de leurs charges, et ce en augmentant progressivement la concentration en sel (NaCl). La chromatographie est réalisée en « batch » : la résine est mise en suspension dans la solution et agitée mécaniquement.

2.2.2.1.2. Mode opératoire

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

Les caséines camelines totales (2g) ont été solubilisées dans 40 ml de tampon acétate de sodium préalablement préparé à pH 6,6. Le mélange est centrifugé à 16 000 x g pendant 45 min à 4°C. Le surnageant récupéré après la centrifugation a été mélangé avec la DEAE-cellulose activée et pré-équilibrée par le tampon de départ pendant 30 min à 4°C puis introduit dans un dispositif de filtration sous vide (Chromatographie en batch).

L'élution est réalisée à température ambiante par un gradient discontinu de chlorure de sodium dans le même tampon (0, 0,2, 1 et 2M de NaCl).

La pureté des fractions obtenues a été contrôlée par électrophorèse en PAGE-SDS et en PAGE-Urée.

2.2.3. Analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance en phase inverse

2.2.3.1. Principe

En chromatographie de phase inverse (RP), la phase stationnaire est composée de silice greffée par des chaînes alkyles ayant 8 ou 18 atomes de carbone. Les phases greffées (qualifiées d'inverses) sont les supports les plus couramment utilisés. Elles sont apolaires et hydrophobes et nécessitent donc un éluant polaire tel que l'acétonitrile, le méthanol, l'eau.

En réalisant une surface hydrophobe, on inverse totalement la nature des interactions fournies par la silice. Les solutés les plus polaires seront les moins retenus, les solutés apolaires seront retenus d'autant plus fortement que leur hydrophobicité est élevée.

2.2.3.2. Mode opératoire

La β -caséine est solubilisée à raison de 6 mg/ml dans un tampon bis-Tris contenant 8M Urée, 1,3% citrate de sodium, 0,1M bis-tris et 0,3% β -mércaptoethanol.

Le mélange est filtré à travers un filtre à membrane en nylon 0,45 μ m, puis un volume de 60 μ l est injecté dans une colonne Lichrosorb C8 (5 mm, 125 x 4,1 mm). La phase mobile est constituée d'un solvant A (10 % acétonurie, 90% d'eau distillée et 0,1 % de TFA) et d'un solvant B (60 % acétonitrile, 40% d'eau distillée et 0,1 % de TFA).

L'éluion est effectuée avec un débit de 0,2 ml/mn à une température de 38°C en utilisant un gradient binaire (0-50 %) pendant 50 minutes. La détection se fait en UV à 280 et à 214 nm.

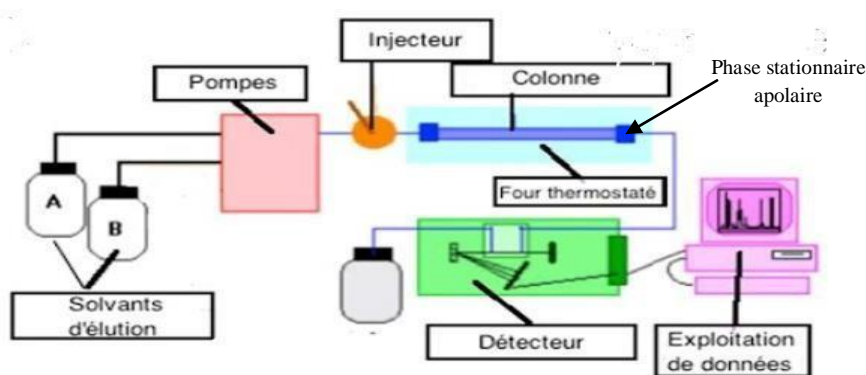


Figure 05 : Représentation schématique de la chromatographie liquide de haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

2.2.4. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse est un terme d'origine grecque signifiant transport (TRIVIN et LEBRICON, 2003), découverte par Tiselius en 1937, elle s'est affirmée comme l'une des méthodes d'analyses les plus avantageuses de la chimie des macromolécules.

2.2.4.1. Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines, du fait de leur caractère amphotère, peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer ainsi soit vers l'anode ou la cathode et être visualisées sous forme de bandes de migration distinctes selon leurs charges et leur poids moléculaires.

Les séparations des particules dans un champ électrique sont souvent réalisées sur des supports solides : papier, agarose, acétate de cellulose et polyacrylamide. Parmi ces supports, le gel de polyacrylamide étant l'un des supports les plus utilisés en raison d'un certain nombre d'avantages qu'il procure : transparence du gel, permettant une analyse quantitative des protéines par densitomètre ; reproductibilité élevée et facilité de mise en œuvre ; possibilité de servir comme tamis moléculaire et de varier à volonté sa porosité. De ce fait, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) constitue une des méthodes de séparation les plus résolutive.

Le gel de polyacrylamide (PAGE) utilisé est le produit de polymérisation de monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et d'un agent de pontage le N, N' méthylène-bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). Cette réaction 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-bis-acrylamide (g) ;

v : volume final de la solution (ml) ;

T : pourcentage de la concentration totale en acrylamide + bis-acrylamide ;

C : pourcentage de la concentration en bis-acrylamide par rapport au total (acrylamide et bisacrylamide).

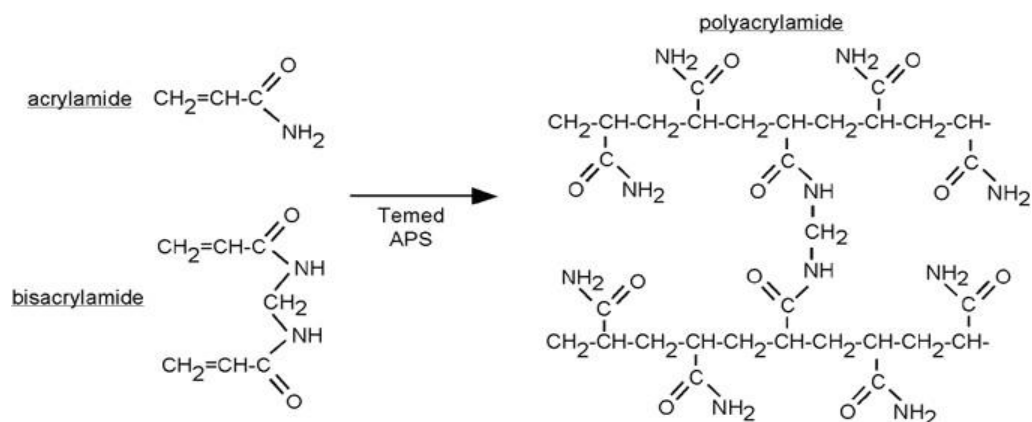


Figure 06 : Structure du gel de polyacrylamide

2.2.4.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate desodium (SDS-PAGE)

Ce type d'électrophorèse permet la migration des protéines uniquement selon leur taille et leur forme. Pour ce faire, un détergent anionique (dodécylsulfate de sodium ou SDS,) est rajouté dans le milieu (10%) avec un agent réducteur des ponts disulfures (β -mercaptoéthanol (4%) et un traitement thermique des échantillons à 100°C pendant 2-3 min est utilisé. La plupart des protéines sont dans ce cas dissociées, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaines peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

Le procédé adopté est celui décrit par LAEMMLI et FAVRE (1973) qui utilise un système de tampons discontinus comprenant: tampon 1 (Tris/HCl 0,125M pH 6,8 pour le gel de concentration (T = 4%, C = 2,7 %) contenant 0,1 % de SDS et tampon 2 (Tris/HCl 3,8M pH 8,8 contenant 0,1 % de SDS pour le gel de séparation (T = 15 %, C = 2,7 %).

Le tampon d'électrode pH 8,3 est composé de 50 mM de Tris, de 384 mM de glycine et de 0,1 % de SDS. L'échantillon est déposé dans les puits à raison de 10 μ l (d'une solution à 1 mg/mL). L'électrophorèse est conduite sur mini-cuves sous des conditions électriques de 20 mA, 10 W et 250 V.

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

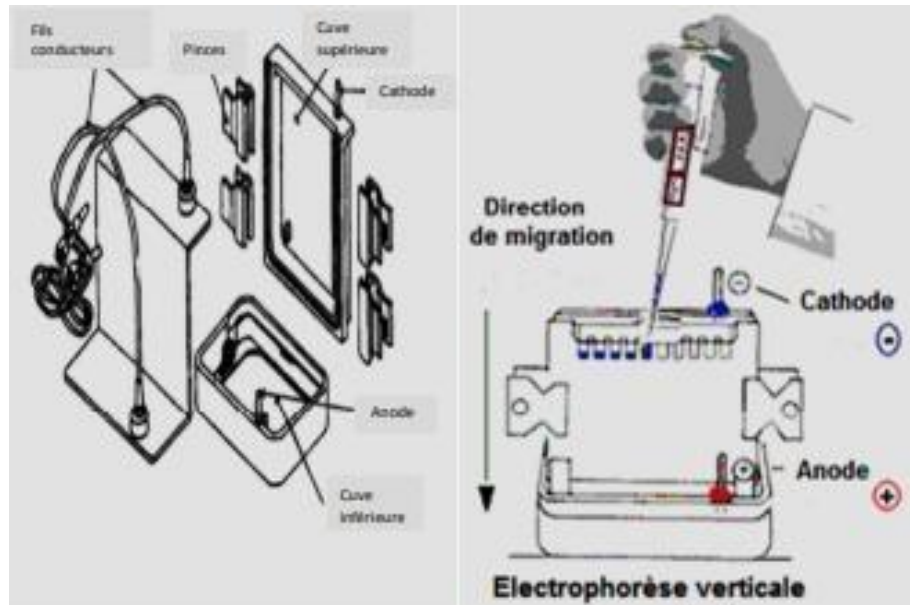


Figure07 : Unité d'électrophorèse sur mini-cuve SE28.

2.2.4.3. Electrophorèse en présence d'Urée et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-Urée)

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

Lors de cette étude, nous avons utilisé la méthode décrite par ANDREW (1983), qui comprend un système biphasique : un gel de concentration (T = 4 % et C = 2,7 %) en tampon (Urée 0,8 M ; Tris 0,49 M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T = 13 % et C = 2,7 %) en tampon (Urée 4 M, Tris 1,5 M ; pH 8,8). Le tampon de gel est composé de (Tris 0,75 M, pH 8,9). Le tampon d'électrode pH 8,3 est constitué de Tris 5 mM et glycine 77 mM.

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

Les échantillons protéiques sont déposés à raison de 10 μ l (à partir d'une solution à 1mg/ml). La migration électrophorétique a lieu sous voltage et ampérage constants (20 mA, 250 V). A la fin de la migration, les protéines sont fixées dans une solution d'acide triachloracétique (12 %) pendant 45 min, puis colorées pendant 2 h par le bleu de Coomassie R250 à raison de 0,2 %. La décoloration du gel s'effectue dans des solutions (eau/méthanol/acide acétique, 3,12 : 1,5 : 0,37).

2.2.5. Hydrolyse de la β -caséine cameline par les enzymes digestives

L'hydrolyse enzymatique de la β -caséine cameline par trois enzymes différentes (trypsine, pepsine et chymotrypsine) a été testée, afin d'avoir une idée sur la sensibilité de cette dernière vis-à-vis de l'action des enzymes digestives.

La β -caséine cameline est solubilisée à raison de 1 % (P/V) dans les tampons réactionnels correspondants. L'hydrolyse pepsique est réalisée à pH 2 (tampon HCl, 0,1 N) alors que celles de la trypsine et de la chymotrypsine sont effectuées à pH 8 (tampon Tris 0,2 M).

Chaque enzyme est ajoutée à un ratio d'enzyme/substrat (E/S) de 1 %. Le mélange homogénéisé soigneusement puis porté à incubation pendant 24 heures à 37 °C au bain Marie. Des prélèvements d'hydrolysats de la β -caséine ont été effectués comme suite : 5, 10, 15, 30 et 45 min, puis, 1, 2, 3, 4 et 24 heures. L'arrêt de la réaction de l'hydrolyse se fait par chauffage des tubes à 80°C pendant 15 min dans un bain Marie.

2.2.6. Evaluation du pouvoir antioxydant de la β caséine cameline et ses hydrolysats pepsique

2.2.6.1. Test de pouvoir de piégeage du radical libre DPPH

2.2.6.1.1. Principe

Le potentiel anti-radicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution.

Cette méthode utilise le 2, 2-diphényl-2- picrylhydrazyle (DPPH•), qui est un radical libre, coloré, stable, facile à doser et capable d'arracher les atomes hydrogène labiles des groupements OH. En effet, à température ambiante et en solution, ce radical se caractérise par une coloration violette intense avec un maximum d'absorption à 517 nm.

En présence d'un antioxydant, le DPPH libre est réduit (Figure 08). Cette réduction se traduit par le passage de la couleur violette de la solution à la couleur jaune ce qui conduit à la diminution de l'absorbance de radical libre à 517 nm.

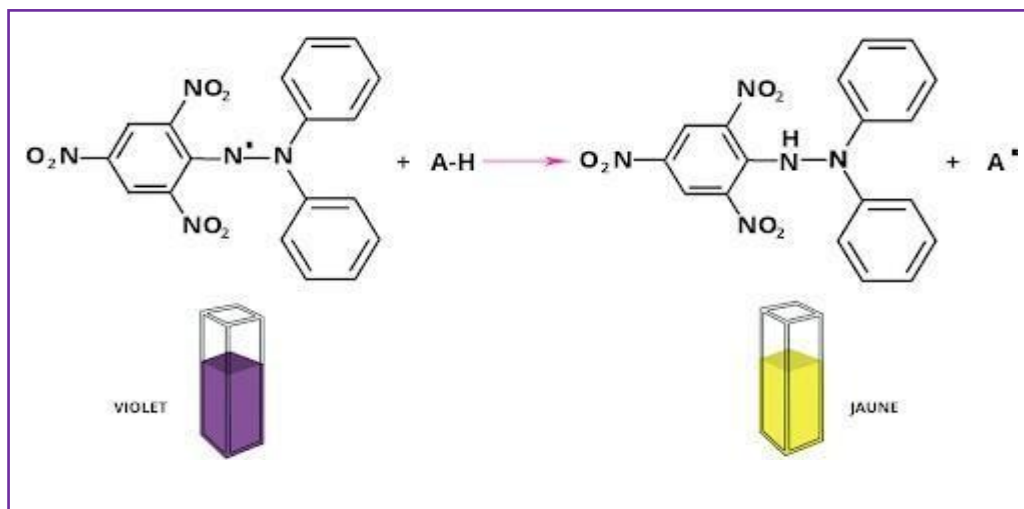


Figure 08 : Réaction du DPPH avec un antioxydant.

2.2.6.1.2. Mode opératoire

Afin d'étudier l'activité anti-radicalaire de la β caséine cameline et ses hydrolysats, leurs réactivités envers le radical libre a été évaluée *in vitro* par la mesure du pouvoir de piégeage du DPPH libre. La capacité de libération des électrons par les fractions protéiques testées est mise en évidence par colorimétrie à 517 nm en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution éthanolique contenant le radical libre DPPH.

La détermination de l'activité anti-radicalaire par le test de DPPH a été effectuée en utilisant la méthode décrite par MOLYNEUX (2004) légèrement modifiée. Une solution éthanolique de DPPH \cdot a été préparée en dissolvant 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol (0,001M). 0,1ml de chaque échantillon (β -CN native et ses hydrolysats enzymatiques) sont mélangées avec 2 ml de la solution de DPPH. L'acide ascorbique (vitamine C) est utilisé comme référence.

La β -CN native et les hydrolysats de la pepsine ainsi que la référence (acide ascorbique) sont testés à différentes concentrations ;

Les mélanges sont bien homogénéisés puis incubés pendant 24 heures à température ambiante et à l'obscurité. La mesure de l'absorbance est effectuée par spectrophotomètre à 517 nm.

L'activité anti-oxydante liée à l'effet de piégeage du radical DPPH \cdot est exprimée en pourcentage d'inhibition (PI) à l'aide de la formule suivante :

$$\% \text{ d'Inhibition (PI)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

- A_0 : Absorbance du blanc (DPPH dans le méthanol) ;
- A_1 : Absorbance de l'échantillon.

Tous les essais ont été effectués en triplicate afin de vérifier la reproductibilité.

2.2.6.2. Test de piégeage du radical ABTS

2.2.6.2.1. Principe

L'ABTS est un radical cation caractérisé par sa couleur bleu vert foncé qui va disparaître après la réduction par un antioxydant donneur des protons (hydrogène). Ce radical est facilement formé à partir de l'acide correspondant par oxydation en présence de persulfate de potassium. Plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène considéré comme un antioxydant fort. (Figure 09).

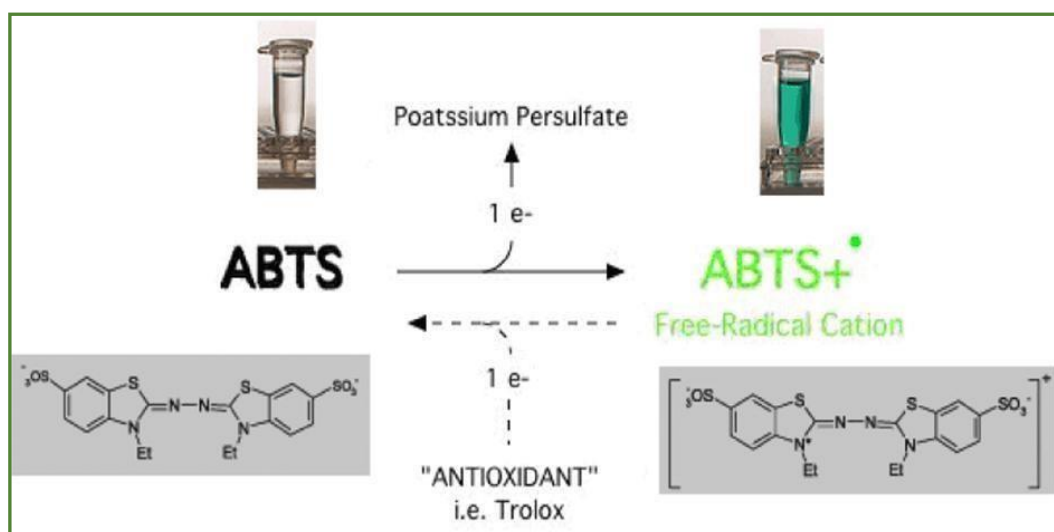


Figure 09 : Réaction d'oxydo-réduction du radical ABTS (PANNALA *et al.*, 2011).

2.2.6.2.2. Mode opératoire

L'activité de piégeage des radicaux libres de la caséine cameline (CN) et de ses hydrolysats (CNH) ont été analysés par JRAD *et al.* (2014), selon la méthode décrite par RE *et al.* (1999) et adapté pour les petits volumes par SADATE *et al.* (2011).

Le cation radicalaire ABTS^{•+} a été produit par réaction 7 mM de cation ABTS⁺ dans 2,45 mM de persulfate de potassium. La solution est conservée à l'obscurité à température ambiante pendant 12 à 16 h à température ambiante. Le réactif cationique radical ABTS^{•+} a été ensuite dilué avec 5 mM du tampon phosphate de sodium, pH 7,4 pour atteindre une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734 nm avant l'utilisation.

Un volume 3ml de la solution d'ABTS^{•+} a été mélangé avec une solution de (1%) de β -caséine cameline, de ses hydrolysats pepsique et de la référence (acide ascorbique) à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80, 100 μ l). Les absorbances sont mesurées à 734 nm après une incubation de 10 minutes à l'obscurité et à la température ambiante.

Trois essais ont été effectués pour chaque concentration de produit testé et le pourcentage (%) de piégeage du radical ABTS est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de piégeage du radical ABTS} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

- A₀ : Absorbance en absence du produit à tester ;
- A₁ : Absorbance en présence du produit à tester.

Détermination de l'IC₅₀ : les résultats des différents tests sont rapportés en calculant les valeurs des IC₅₀ (mg/mL) qui est définie comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de 50%, il est inversement lié à la capacité antioxydante.

*Résultats
&
Discussion*

III. Résultats et discussion

3.1. Isolement et purification de la β caséine cameline

3.1.1. Isolement des caséines totales

La précipitation acide des caséines laitières est utilisée comme méthode de séparation, car elle est rapide, reproductible et ne nécessite pas de moyens particuliers mise à part l'acide chlorhydrique dilué.

Pour cela, l'isolement des caséines camelines a été réalisé par une précipitation acide à pH 4,3 comme suggéré par WANGOH *et al.* (1998), KHEROUATOU *et al.* (2003) et ALIM *et al.* (2005). Ces auteurs ont signalé que, à cette valeur de pH, les micelles de caséines de lait de chamelle analysé perdent totalement leur stabilité dans le milieu. Elles flocculent et donnent un précipité net et stable après centrifugation, par contre la précipitation acide réalisée habituellement à pH 4,6 sur le lait bovin n'entraîne pas une précipitation totale des caséines camelines. Le même effet est d'ailleurs constaté sur le lait caprin où la précipitation isoélectrique totale a lieu à pH 4,2 (MATI, 1992). Cette différence dans le seuil de séparation est due à des variations dans la nature et le nombre des acides aminés constitutifs de ces caséines (CAYOT et LORIENT, 1998).

3.1.2. Purification de la β caséine cameline

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

La β -caséine cameline a été isolée et purifiée à partir des caséines totales suivant la méthode de RASMUSSEN *et al.* (1995) par chromatographie échangeuse d'anions sur diéthylaminoéthyle (DEAE) cellulose en batch.

Après une première séparation obtenue par centrifugation suite à la dissolution des caséines totales dans un tampon d'acétate de sodium, additionné d'urée, du 2-ME et de la l'EDTA, deux fractions ont été récupéré.

Le profil électrophorétique en PAGE-Urée et PAGE-SDS des fractions éluées en chromatographie échangeuse d'ions relève 2 fractions (notées F1 et F2) (figure 10).

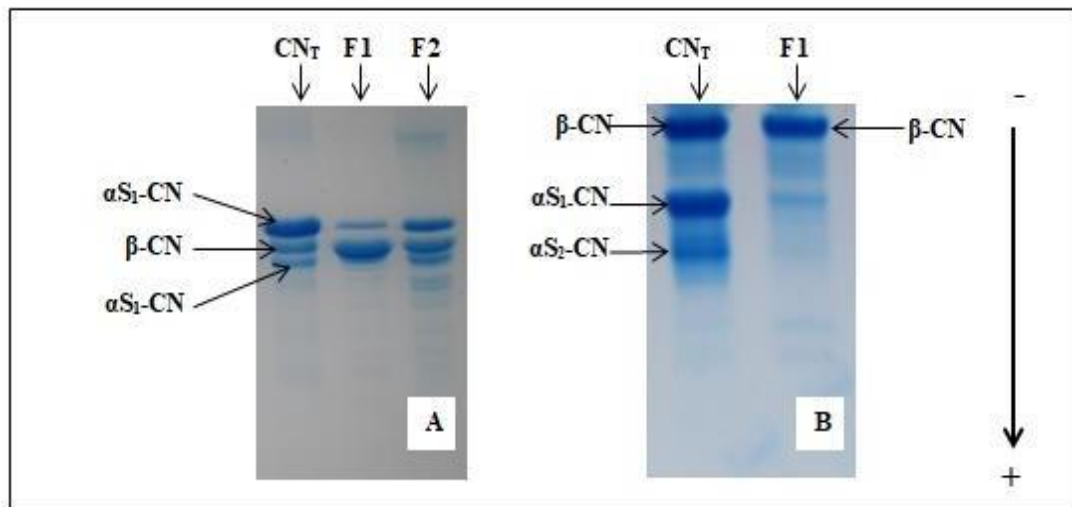


Figure 10 : Electrophorégramme des fractions collectées après séparation des caséines camelines par chromatographie sur DEAE-cellulose. A: PAGE-SDS ; B : PAGE Urée ; CN_T : Caséines camelines totales ; F1 : β-CN et F2 : αS-CN

En analysant le profil électrophorétique des fractions obtenues, nous pouvons dire que cette technique nous a permis de séparer la β-CN de la αS-CN avec un degré de pureté satisfaisant.

Le contrôle en PAGE-SDS (figure 10A) montre que les caséines camelines migrent en trois bandes bien distinctes avec une plus faible mobilité et un ordre de séparation différents par rapport en PAGE Urée. L'ordre de migration décroissant des caséines totales est comme suit : αS₁-CN < β-CN < αS₁-CN.

En PAGE-Urée (figure 10 B), nous relevons la présence de deux bandes caséiniques dans le lait camelin, correspondant respectivement, en partant du dépôt, aux β-CN, αS-CN, en se référant aux données bibliographiques (MATI, 1992 ; PESIC *et al.*, 2011 a et b).

Il est admis que selon HINZ *et al.* (2012), les caséines camelines présentent une migration plus lente, du fait de leurs charges négatives nettes moins élevées. Ces protéines migrent en trois bandes : deux bandes distinctes qui correspondraient aux β-CN et αS₁-CN et une troisième bande diffuse de faible intensité et de plus grande mobilité électrophorétique, qui caractériserait la αS₂-CN (FARAH *et FARAH-RIESEN*, 1985 ; MOHAMED *et al.*, 1989 ; OCHIRKHUYAG *et al.*, 1997).

Les électrophoregrammes en PAGE-Urée et PAGE-SDS montrent que la fraction F1 obtenue migre en une seule bande bien focalisée qui correspondrait bien à la β-CN.

Nous pouvons estimer qu'au niveau qualitatif, le résultat est probant. Cette méthode est avantageuse du fait qu'elle a permis d'avoir en une seule étape une bonne quantité de β-

CN et de α S-CN, avec un degré de pureté non négligeable. En plus, elle est relativement facile à réaliser et nécessite peu de temps et de moyens.

La chromatographie échangeuse anionique est assez utilisée pour séparer les caséines individuelles du lait de différentes espèces (TOMPSON ,1966 ; SANOGO *et al.*, 1989 ; STRANGE *et al.*,1991). Toutefois, un nombre limité d'études a été consacré à la séparation chromatographique des caséines camelines. Certaines investigations ont utilisé d'autres supports chromatographiques pour des objectifs similaires. Ainsi, OCHIRKHUYAG *et al.* (1997), sur les caséines camelines, ont montré la possibilité de séparer les différentes caséines sur une résine QAE-Sépharose, tandis que CHAOUI- KHEROUATOU et ATTIA (2008) ont relevé une résolution non satisfaisante des α s-caséines sur Mono Q HR 5/5.

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

Nous avons analysé la fraction F1 en PAGE-SDS afin de contrôler la pureté de cette fraction et de déterminer le poids moléculaire en comparant leurs niveaux de migration dans les mêmes conditions à ceux des protéines de référence (Figure 11). Ces dernières sont la BSA, l'ovalbumine, la bêta-lactoglobuline et l'alpha-lactalbumine avec des masses moléculaires respectives de 67 000, 47000, 18000 et 14000.

Il est admis qu'en PAGE-SDS, les caséines du lait migrent en 4 bandes selon une mobilité qui est de l'ordre suivant : la caséine α -S2, la caséine α -S1, la bêta caséine et la caséine kappa (VAIRO CAVALLI *et al.*, 2008).

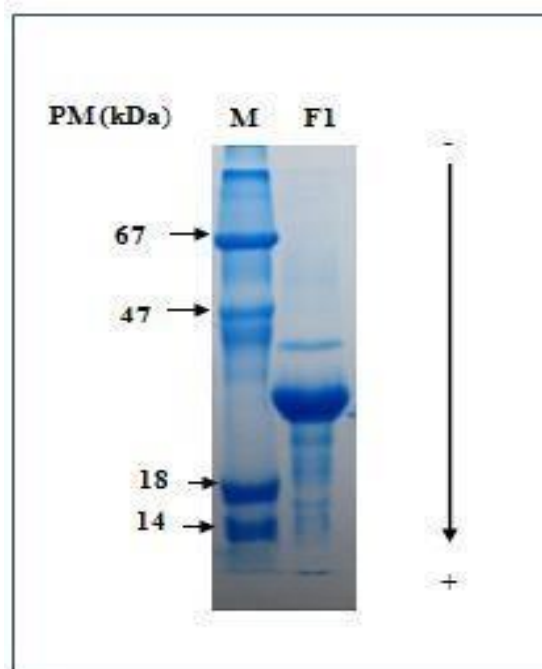


Figure 11: Eléctrophorégramme de la β -CN cameline en PAGE-SDS ; gel de séparation : T = 15 %, C = 2,7 % ; gel de concentration : T = 4 %, C = 2,7 %.
M : marqueurs de taille ; F1 : β -CN cameline

Pour déterminer le poids moléculaire de la beta caséine cameline purifiée, nous avons tracé une courbe étalon [(Log PM = f (distance de migration)] (Figure 12) à partir de profil électrophorétique en PAGE-SDS.

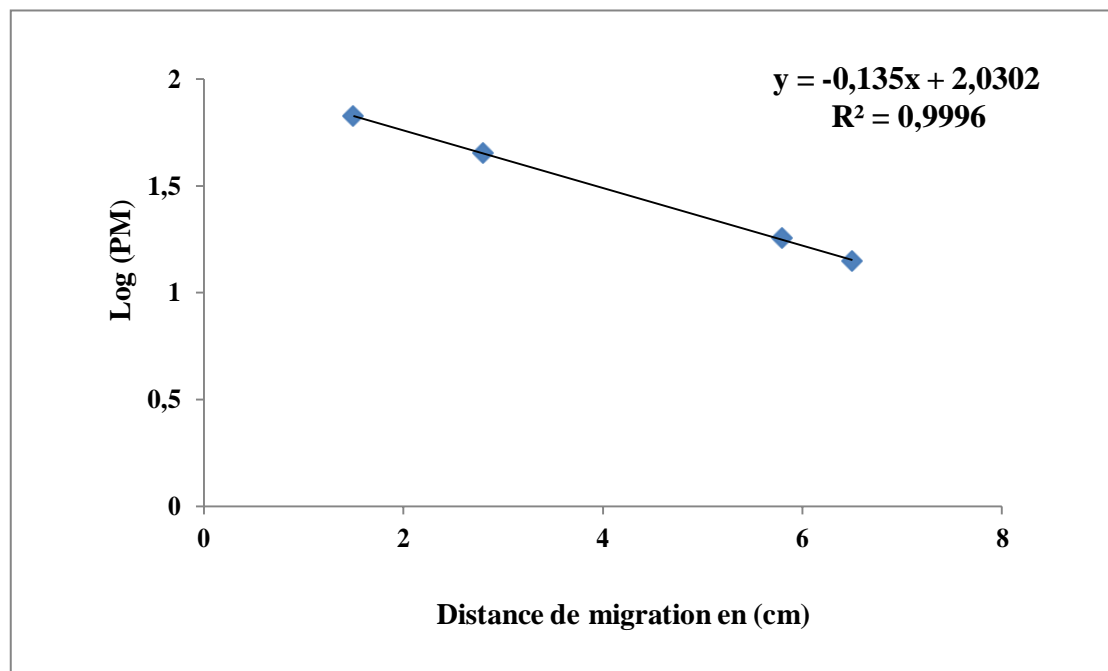


Figure 12 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS ; standard protéique de PM allant de 14 à 67 kDa.

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

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

	Présente étude	Références bibliographiques		
PM	31,04	31 (a)	31,6(b)	35(c)

(a) : ALIM *et al.* (2005) ; (b) : SI AHMED *et al.* (2013) ; (c) : OMAR *et al.* (2016).

L'estimation de PM de la beta caséine cameline analysée est assez comparable à celles signalées par ALIM *et al.* (2005) et SI AHMED *et al.* (2013) pour le lait camelin algérien, mais se différencie légèrement avec la valeur rapportée par OMAR *et al.* (2016).

3.1.4. Contrôle de la pureté par RP-HPLC

Afin d'évaluer l'état de pureté de la fraction β -CN issue de la chromatographie d'échange d'anions sur DEAE-cellulose, nous avons soumis cet isolat à un contrôle par chromatographie liquide à haute performance en phase inversée (RP-HPLC) sur colonne C8. Les conditions d'élutions utilisées ont permis d'avoir un pic dont le temps de rétention est évalué à 24mn (figure13)

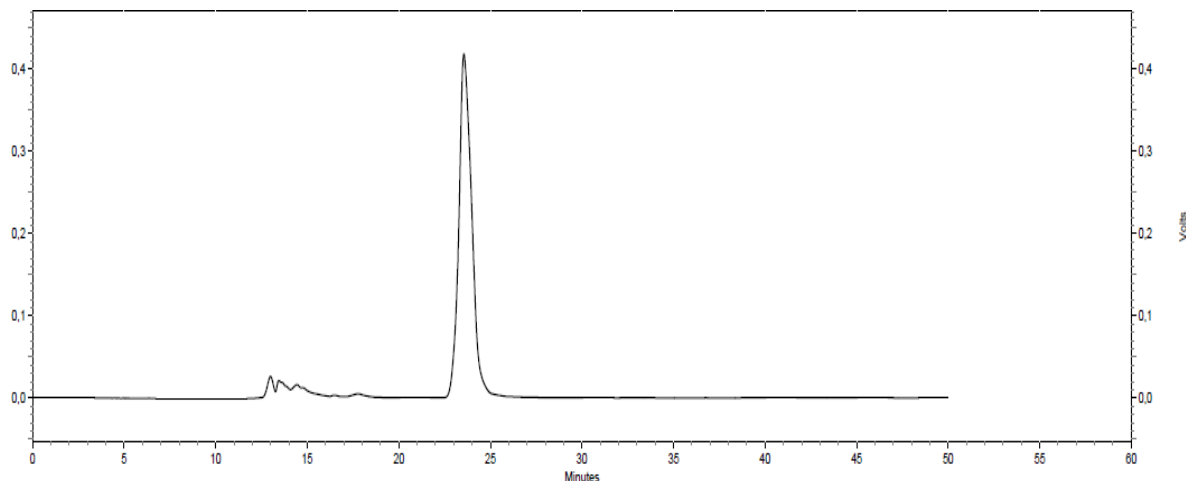


Figure 13 : Chromatogramme en RP-HPLC de la fraction β -CN cameline.
Colonne utilisée : C8 ; gradient binaire : 0 à 50 % ; débit : 0,2 ml/mn ; température : 38°C ; Détecteur UV : 214 nm.

Le protocole de purification adopté nous a permis d'avoir la β -CN avec une pureté très satisfaisante. En comparant ce résultat obtenu aux données bibliographiques, notamment les travaux de ATAMER *et al.*, (2017), nous pouvons confirmer par la même occasion le degré de pureté de la β -CN isolée par chromatographie échangeuse d'anions, puisque aucun autre pic ne figure sur le chromatogramme.

3.1.5. Sensibilité de la β caséine cameline à l'hydrolyse enzymatique

Afin d'avoir une idée sur la sensibilité de la β caséine du lait camelin à l'action de la pepsine trypsine et chymotrypsine, des essais préliminaires d'optimisation des conditions de réalisation des cinétiques ont été faite en opérant plusieurs variations dans le rapport E/S. Ces essais, visualisés en électrophorèse PAGE-SDS, ont montré que le rapport E/S= 1/100 correspond aux conditions optimales d'activités, évaluées selon le seuil de dégradation des protéines initiales, l'apparition des fragments d'hydrolyse, l'intensité des bandes qui apparaissent ou qui disparaissent au cours de la cinétique.

Le suivi des cinétiques d'hydrolyse est effectué à des temps d'incubation allant de 5 à 240 min. Les hydrolysats de ces trois enzymes obtenus ont été analysés par électrophorèse PAGE-SDS et par RP-HPLC.

Le contrôle électrophorétique en PAGE-SDS de la beta caséine cameline hydrolysée par les trois enzymes digestives (figure14) montre la disparition progressive de la bande correspondant à la beta caséine et l'apparition de plusieurs bandes électrophorétiques qui pourraient correspondre aux fragments peptidiques de l'hydrolyse.

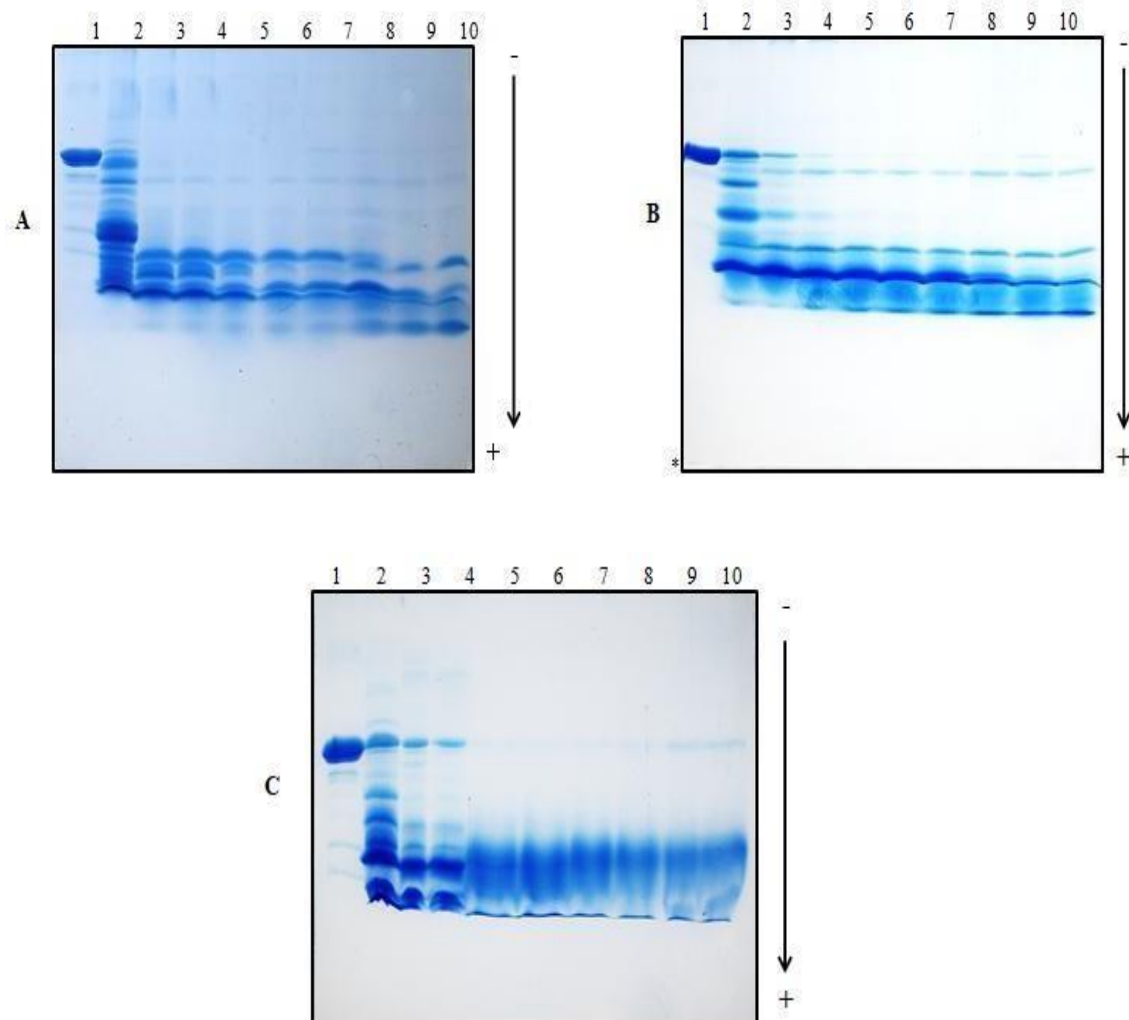


Figure 14 : Electrophorégramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques libérés après l'action des trois protéases (A : chymotrypsine ; B : trypsine ; C : pepsine) sur la beta caséine cameline (E/S= 1/100).

1 : β -CN ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 et 10 : temps d'incubation correspondant respectivement à 5 ; 15 ; 30 ; 45 ; 60 ; 90 ; 120 ; 180 et 240 mn.

Les profils électrophorétiques obtenus suite à l'hydrolyse enzymatique montrent une disparition progressive de la bande correspondante à la β -CN cameline et l'apparition successive de bandes de migration à plus fortes mobilités électrophorétiques, mais dont l'intensité diminue au cours du temps.

Sous l'action de la chymotrypsine (figure 14 A) et la trypsine (figure 14 B), une disparition complète des bandes principales est observée après 5 mn d'incubation et, au-delà d'une heure d'incubation, des bandes électrophorétiques de faible poids moléculaire sont obtenues. Ces dernières se caractérisent par une diminution de leurs intensités en fonction de la durée d'hydrolyse.

Par contre sous l'action de la pepsine, l'intensité de la bande β -CN diminue au cours du temps d'incubation jusqu'à sa disparition totale après 30 mn. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par CHAN *et al.* (2013) qui ont également mentionné que la β -CN était hydrolysée plus rapidement que les autres caséines.

La β -CN cameline possède 45 sites potentiels de clivage possibles pour la pepsine, 33 pour la chymotrypsine et 13 seulement pour la trypsine (<http://www.expasy.org>). Ce qui explique les différences observées dans les cinétiques d'hydrolyse conduites avec ces enzymes et ses hydrolysats analysés en RP-HPLC (Figure 15), où nous relevons que le profil de l'hydrolysats pepsique présente un plus grand nombre de pics comparé aux hydrolysats chymotrypsique et tryptique.

Les Chromatogrammes en RP-HPLC des hydrolysats libérés montrent la disparition totale des pics de la β -CN cameline et l'apparition de plusieurs pics correspondant aux peptides libérés après l'action des enzymes considérées.

Ces résultats sont confirmés par les profils chromatographiques des hydrolysats obtenus après 240 mn d'incubation analysés par RP-HPLC.

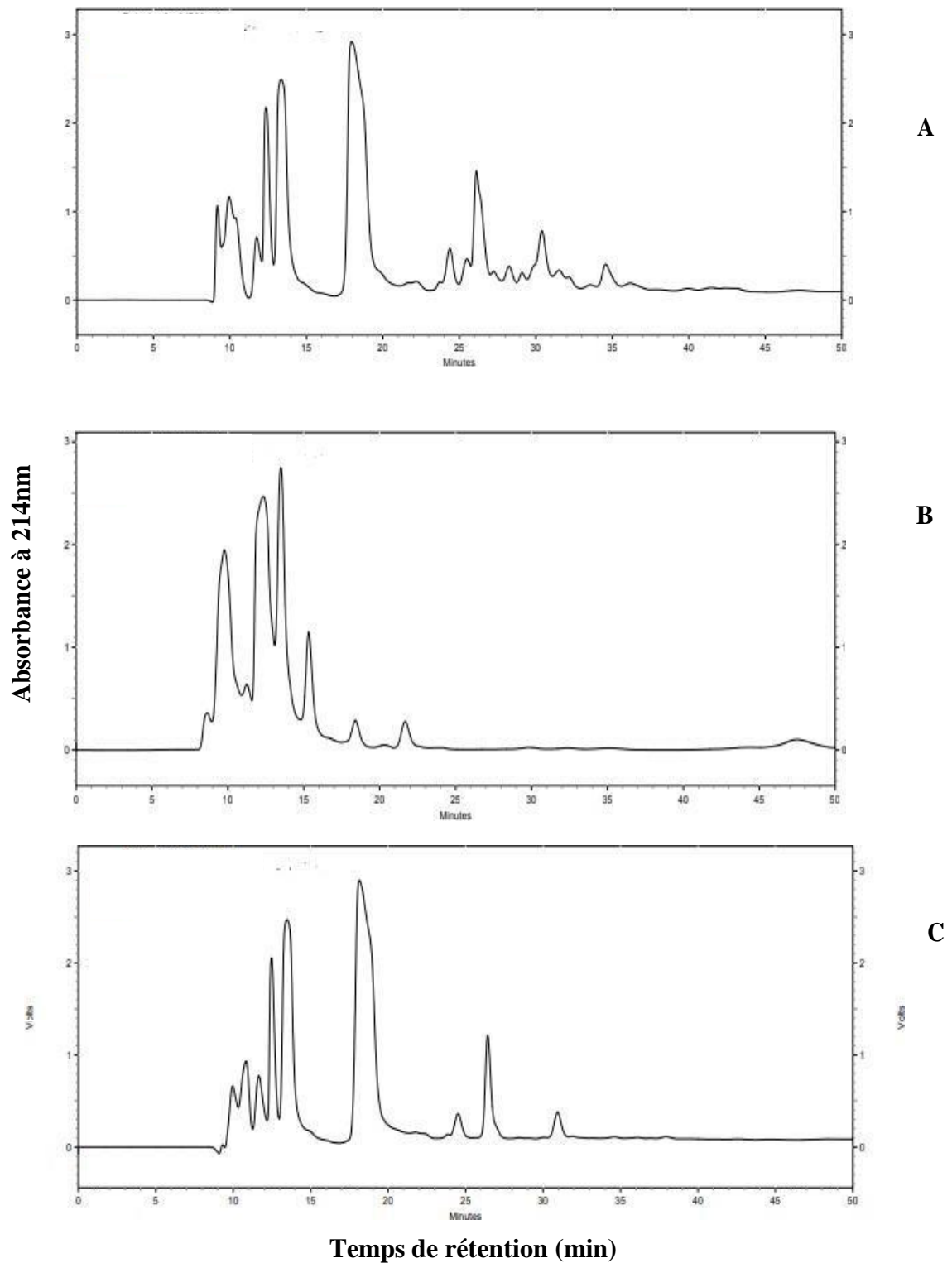


Figure 15 : Chromatogrammes de l'hydrolyse de la β -caséine cameline par les protéases digestives après 240 mn d'incubation en RP-HPLC. A : hydrolysats pepsique ; B: hydrolysats trypsique ; C : hydrolysats chymotrypsique. (Colonne C8 ; débit : 0,2mL ; Température : 38°C ; absorbance à 214 nm)

3.2. Evaluation des activités biologiques de la β -caséines cameline

3.2.1. Piégeage du radical libre DPPH

Le radical DPPH• est généralement l'un des composés les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH• comparés à l'acide ascorbique antioxydant de référence.

Les résultats du piégeage du radical libre DPPH par la β -CN cameline et son hydrolysate pepsique sont représentés dans la figure 16. Les courbes ont une allure logarithmique.

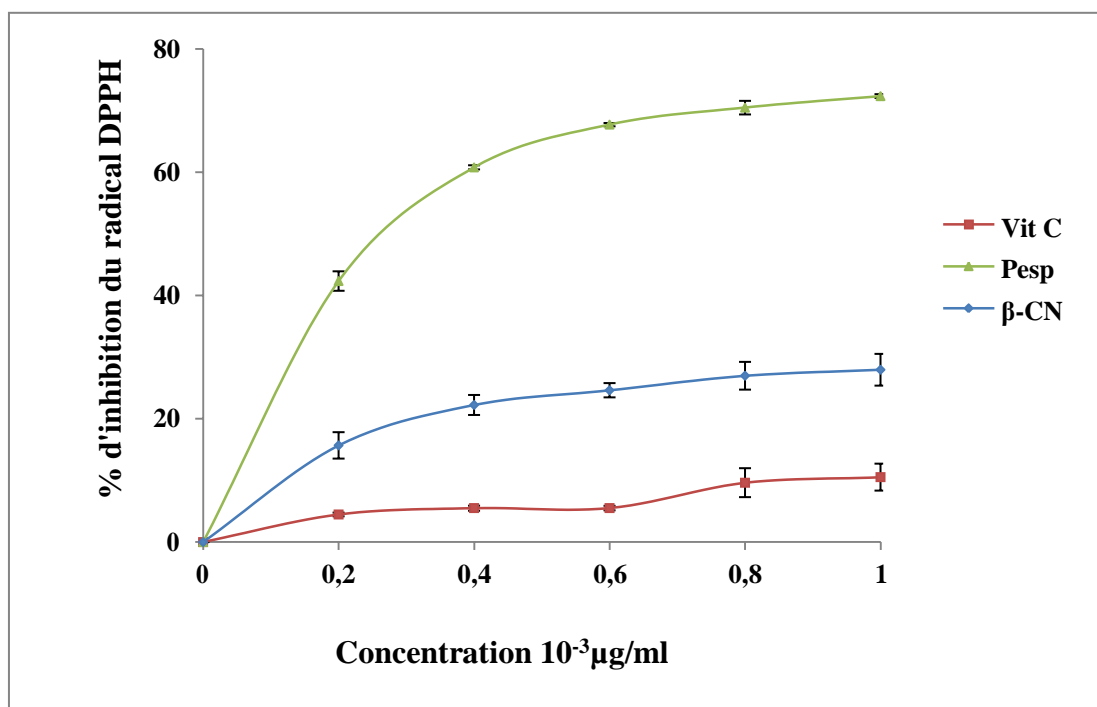


Figure 16 : Activité anti-radicalaire (% d'inhibition du DPPH) en présence de la vitamine C comme référence ; d'hydrolysats pepsique et de la β caséine native.

Les résultats obtenus du pouvoir anti-radicalaire pour des concentrations différentes de la β -CN cameline native, son hydrolysate pepsique et de l'acide ascorbique montrent une dose réponse entre le pourcentage de réduction augmenté et la concentration des échantillons (le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration).

Nous avons observé que le pourcentage d'inhibition de l'hydrolysate pepsique est supérieur à celui de la β -CN cameline native et celui de l'acide ascorbique pour toutes les concentrations. L'hydrolysate pepsique de la β -CN cameline à une concentration de 1 mg/ml enregistre le pourcentage d'inhibition le plus important de l'ordre de 72,33% comparativement à la β -CN native et à la vitamine C ; 27,95%, 10,52% respectivement.

- **Détermination de l'IC₅₀** : L'IC₅₀ est inversement proportionnel à la capacité anti-oxydante d'un composé, parce qu'il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de l'IC₅₀ est petite, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est grande. Les valeurs d'IC₅₀ de la β -CN native, son hydrolysate pepsique et de l'acide ascorbique sont représentées dans la figure 17.

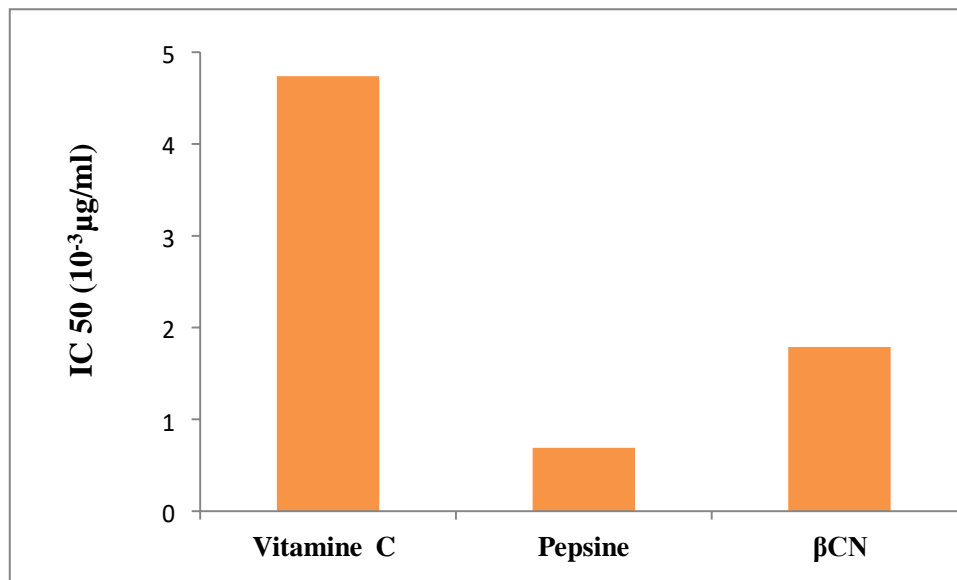


Figure 17: Valeurs de l'IC₅₀ du test DPPH.

Les résultats des IC₅₀ montrent que la molécule de référence : l'acide ascorbique possède une activité anti-radicalaire (IC₅₀ = 4,74 µg/ml) comparable à celle de la β -CN native (IC₅₀ = 1,788 µg/ml) et hydrolysate pepsique (IC₅₀ = 0,691 µg/ml). Donc, l'hydrolysate pepsique présente la meilleure activité anti-radicalaire.

A partir des résultats obtenus nous pouvons suggérer que la caséine native et ses hydrolysats contiennent des molécules agissant en tant que donneur d'électrons qui pourraient réagir avec les radicaux libres et les transformer en molécules plus stables. L'augmentation de cette activité après hydrolyse est expliquée par la libération de peptides exposant plus de fonctions intervenant dans la réaction anti-oxydante.

Il est maintenant bien connu que la β -caséine bovine produit des peptides anti radicalaire durant la digestion gastro-intestinale ou la fermentation (KANSCI *et al.*, 2004). Comme la fraction de caséines du lait camelin est riche en β -caséine (65% du total des caséines), ce composant peut être la meilleure source de peptides antioxydants (JRAD *et al.*, 2014).

La β -caséine cameline a montré une activité anti-oxydante élevée après hydrolyse avec la chymotrypsine (SALAMI *et al.*, 2011). La β -caséine cameline comprend 8 résidus de Phe, un acide aminé aromatique avec un grand pouvoir anti-radicalaire, tandis que β -caséine bovine contient 5 résidus Phe et peut être une explication de l'activité anti-oxydante potentielle des caséines camelines.

TSOPMO *et al.* (2011) ont rapporté que la présence de résidus aromatiques confère une grande activité de piégeage de radicaux libres aux peptides synthétiques, le plus efficace des résidus c'est le Tryptophane.

L'activité anti-oxydante des peptides a été attribuée à certaines séquences d'acides aminés (SUETSUNA *et al.*, 2000), ainsi qu'à la présence de liaisons peptidiques ou à l'arrangement structural (HEHNANDEZ-LEDESMA *et al.*, 2007). L'hydrophobicité des peptides semble également être un facteur important pour leur activité antioxydante due à une accessibilité accrue aux cibles hydrophobes (CHEN *et al.*, 1998). Par conséquent, un autre facteur doit être pris en compte pour expliquer l'activité anti-radicalaire des caséines camelines qui est leurs domaines polaires contenant des résidus sérine phosphorylés. Ces caséines phosphorylées et leurs phosphopeptides (appelées CPPS) ont montré une activité antioxydante directe envers les radicaux libres (KITTS, 2005).

3.2.2. Piégeage du radical ABTS

L'activité d'élimination du radical ABTS de la β -caséine cameline, de son hydrolysat pepsique et de l'acide ascorbique est présentée sur la Figure (18).

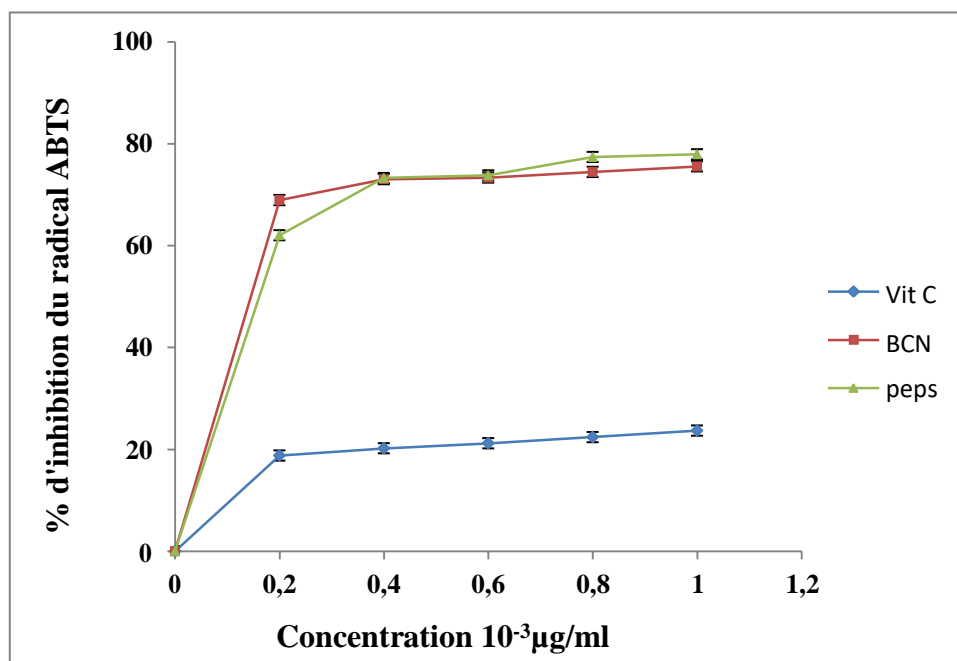


Figure 18 : Piégeage du radical ABTS \bullet^+ de la β -caséine cameline native, de l'hydrolysat pepsique et de l'acide ascorbique.

La Figure (18) montre que le radical cation ABTS \bullet^+ a été inhibé de façon significative à toutes les concentrations testées, et de manière dose dépendante par la β -CN cameline native, l'hydrolysat pepsique et l'acide ascorbique. Comme pour le test DPPH, l'hydrolysat pepsique

de la β -CN cameline a montré une meilleure activité que celui de la β -CN native et l'acide ascorbique.

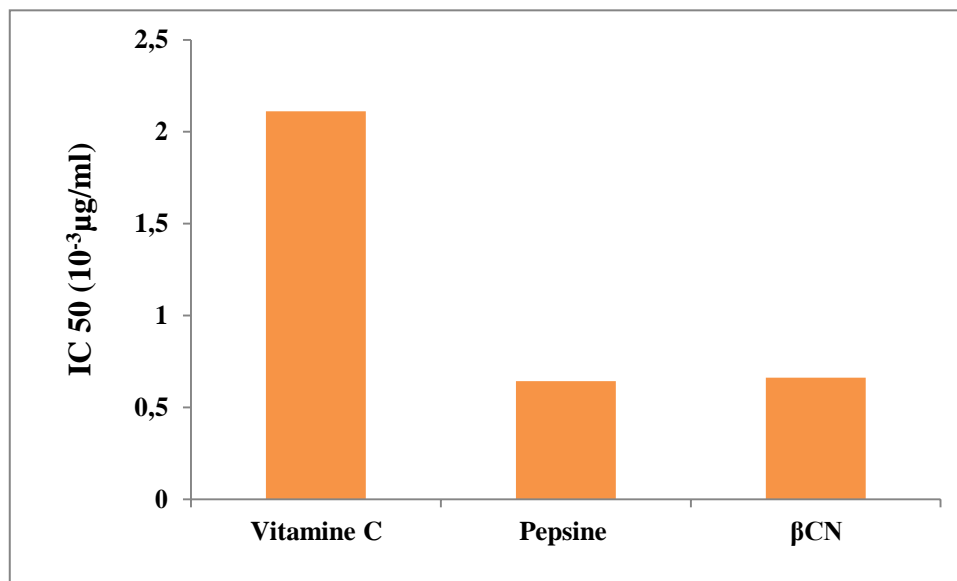


Figure 19 : Valeurs de l'IC₅₀ du test ABTS.

Les valeurs de l'IC₅₀ sont définies comme la concentration des échantillons nécessaires pour inhiber 50% de la concentration initiale du radical ABTS est de 2,11, 0,64 et 0,66 mg/ml pour l'acide ascorbique, l'hydrolysate pepsique et la β -caséine cameline native ; respectivement.

L'ABTS est un radical libre qui accepte un électron ou un hydrogène pour devenir stable. Par conséquent, il est largement utilisé comme substrat pour évaluer l'activité anti-oxydante de divers composés (RE *et al.*, 1999).

L'augmentation de l'activité de piégeage du radical ABTS après l'hydrolyse de la β -caséine cameline native suggère que l'hydrolysate contient des acides aminés ou des peptides qui sont des donneurs d'hydrogène ou des donneurs d'électrons et pourraient réagir avec le radical ABTS pour le transformer en un produit stable.

L'exposition des groupes réactifs des protéines, comme les résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes, après leur protéolyse enzymatique peut conduire à l'amélioration de l'activité antioxydante des protéines (BRANDELLI *et al.*, 2015).

OUSSAIEF *et al.* (2020) ont rapporté que les protéines de colostrum camelin ont la capacité de neutraliser les radicaux ABTS et l'activité anti-oxydante a augmenté après l'hydrolyse enzymatique par la pancréatine, la papaine et la pronase de ces protéines.

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Le lait de dromadaire présente d'excellentes propriétés thérapeutiques et fonctionnelles à l'avantage des populations humaines. Les protéines de lait camelin sont l'une des sources les plus riches en acides aminés essentiels nécessaires à la croissance et au maintien de l'organisme. Elles jouent, également, un rôle important dans la promotion de la santé et de la prévention contre plusieurs maladies.

Au terme de ce travail, nous avons ciblé la β -caséine du lait camelin. La β -caséine (β -CN) cameline a été purifiée à partir des caséines totales, issues du lait camelin collecté dans la région d'El Oued. Ces dernières sont isolées par précipitation isoélectrique ($pHi = 4,3$). La chromatographie échangeuse d'anions sur DEAE-Cellulose en batch a été utilisée pour la purification de la β -CN. La pureté de cette entité a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans diverses conditions (PAGE-Urée et PAGE-SDS) et par la chromatographie liquide haute performance en phase inverse sur colonne C8. La β -CN est obtenue avec un haut degré de pureté, comme le confirment les profils électrophorétiques (une seule bande en PAGE SDS et en PAGE-urée) et chromatographique (pic unique en RP-HPLC).

La sensibilité de la β -CN a été testée en examinant l'action de trois protéases digestives (trypsine, pepsine et chymotrypsine). Les profils électrophorétiques en PAGE-SDS des enzymes testées, ont montré une disparition progressive de la bande correspondante à la β -CN et l'apparition successive de bandes de migration à plus fortes mobilités électrophorétiques, mais dont l'intensité diminue au cours du temps. Comme pour les contrôles par HPLC, les chromatogrammes des hydrolysats ont montré la disparition totale de pic de la β -CN et l'apparition de plusieurs pics correspondant aux peptides libérés après l'action des enzymes considérées. Cette cinétique enzymatique a montré que cette protéine est sensible aux trois enzymes utilisées avec des activités protéolytiques importantes. Cependant, la β -caséine a présenté une sensibilité plus intense vis-à-vis de la pepsine.

Aussi et partant de là, nous avons choisis d'évaluer le pouvoir antioxydant de la β -CN ainsi que l'hydrolysat pepsique en se référant à la vitamine C par deux tests : DPPH et l'ABTS. Comparativement à la β -CN native et à la vitamine C, l'hydrolysat pepsique de la β -CN cameline exercent un pouvoir anti-radicalaire nettement plus important avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de $72,33 \pm 0,31$ %, contre $27,95 \pm 2,58$ % pour la β -CN native et $10,52 \pm 2,18$ % pour la vitamine C. Ces résultats ont montré que les peptides de l'hydrolysat pepsique possèdent une meilleure activité antioxydante, donc ces molécules sont considérées comme des agents antioxydants de première classe et peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention contre des maladies telles que le cancer, et les maladies cardiovasculaires.

Conclusion générale

Ces protéines, étant peu étudiées, possèdent une vraie potentialité et une source riche de peptides bioactifs d'où la nécessité d'en faire beaucoup d'autres investigations afin d'améliorer encore plus le savoir dans ce contexte, notamment à travers l'utilisation des techniques de séparation et de fractionnement plus performantes et la caractérisation de ces peptides par l'utilisation de techniques très fiables telles que la spectrométrie de masse et la chromatographie sur gel filtration et l'identification de leurs séquences en utilisant la MALDI-TOF et le séquençage par la méthode d'Edman.

Références

Bibliographiques

ABBAS S., ASHRAF H., NAZIR A. and SARFRAZ L. (2013). Physical-chemical analysis and composition of camel milk. *International Researches*, 2(2): 85-98.

ABDEL-RAHIM A.G (1987). The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelus dromedarius*) and goat (*Capra hircus*) milk. *World Review of Animal Production*, 23(1): 9-11.

ABITA J.P., DELAAGE M., LAZDUNSKI M. and SAVRDA J. (1969). The Mechanism of Activation of Trypsinogen: The Role of the Four N-Terminal Aspartyl Residues. *European Journal of Biochemistry*, 8(3): 314-324.

ADAMOU A. and FAYE B. (2007). L'élevage camelin en Algérie : contraintes et perspectives de développement. *Cahiers du CREAD*, 23(79): 77-97.

ADLER-NISSEN J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. New York: Elsevier Applied Science Publishers. 110-169p.

AKHMETSADYKOVA S., BAUBEKOVA A., KONUSPAYEVA G., AKHMETSADYKOV N., FAYE B. and LOISEAU G. (2015). Lactic acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk. *African Journal of Food Science and Technology*, 6 (3): 84-88.

AL ALAWI A.A and LALEYE L.C. (2008). Caractérisation des isolats de protéines de lait de chamelle en tant qu'ingrédients nutraceutiques et fonctionnels. Projet de recherche collaboratif (SQU\UAEU) de l'Université du Sultan Qaboos et l'Université des Émirats arabes unis. 97p.

AL-ALAWI A.A. and LALEYE L.C. (2011). Characterization of camel milk protein isolates as nutraceutical and functional ingredients. Collaborative Research Project Sultan Qaboos University & United Arab Emirates University. 1-96.

AL-AWADI F.M and SRIKUMAR T.S. (2001). Trace elements and their distribution in protein fractions of camel milk in comparison to other commonly consumed milks. *Journal of Dairy Research*, 68(3): 463-469.

AL HAJ O.A. and AL KANHAL H.A. (2010). Aspects Compositionals, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal* 20(12): 811-821.

ALIM N., Fondrini F., BonizziI., FeliginiM. andEnne G .(2005). Caraceterization of caséin fraction from Algerien dromedary (*Camelus dromedarius*) milk. *Pakistan journal of Nutrition*, 4(2): 112-116.

ALMI-SEBBANE D., ADT I., DEGRAEVE P., JARDIN J., BETTLER E., TERREUX R., OULAHAL N. and MATI. A. (2018). Casesidin-like anti-bacterial peptides in peptic hydrolysate of camel milk β -casein. *International Dairy Journal*, 86: 49-56.

ALWAN O. A., IGWEGBE A.O. and AHMAD A.A. (2014). Effects of rearing conditions on the proximate composition of Libyan Maghrebi Camels' (*Camelus Dromedarius*) milk. *International Journal of Engineering and Applied Sciences*, 4(8): 1-6.

AMELLAL R. (1995). La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. In : Allaya M. (ed.). *Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000*. Montpellier: CIHEAM. Options Méditerranéennes, Série B, *Etudes et Recherches*, (14), 229-238.

AMIOT J., FOURNIER F., LEBEUF Y., PAQUIN P. and SIMPSON R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. In *Science et technologie du lait : transformation du lait*. Presses Internationales Polytechnique, Montréal, Canada.1-74.

ASHIQ M. (1993). Characterization of camel milk beta-casein. Thèse de doctorat, Université de Karachi, Pakistan. 100p.

ATAMER Z., POST A.E, SCHUBERT T., HOLDER A., BOOM R.M and HINRICHS J. (2017). β -caséine bovine : Isolement, propriétés et fonctionnalité. A review. *International Dairy Journal*, 66: 115–125.

ATTIA H.N., KEROUATOU N. and DHOUID A. (2001). Dromedary milk lactic fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5): 263-270.

ATTIA H., KHEROUATOU N., NASRI M. and KHORCHANI T. (2000). Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Le Lait*, 80(5): 503-515.

HERNANDEZ-LEDESMA B., QUIROS A., AMIGO L. and RECIO I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17(1): 42-49.

BALTHAZAR C.F., PIMENTEL T.F., FERRÃO L.L., ALMADA C.N., SANTILLO A., ALBENZIO M., MOLLAKHALILI N., MORTAZAVIAN A. M., NASCIMENTO J. S., SILVA M. C., FREITAS M. Q., SANT'ANA A. S., GRANATO D. and CRUZ A.G. (2017). Sheep Milk : Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2): 247-262.

BARAT R.,TRANOY-OPALINSKI I., LEGIGAN T., CLARHAUT J., THOMAS M., RENOUX B. and PAPOT S. (2014). Promédicaments sensibles à la β -glucuronidase pour la chimiothérapie sélective du cancer : une mise à jour. *Journal européen de chimie médicinale*, 74: 302-313.

BARŁOWSKA J., SZWAJKOWSKA M., LITWIŃCZUK Z. AND KRÓL J. (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6): 291-302.

- BEG O.U., VON BAHR-LINDSTRÖM H., ZAIDI Z.H. and JÖRNVALL H. (1984).** A small camel-milk protein rich in cysteine/half-cystine. *Bioscience reports*, 4(12): 1065-1070.
- BEG O.U., VON BAHR-LINDSTRÖM H., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1986).** Characterization of a camel milk protein rich in proline identifies a new β -casein fragment. *Regulatory peptides*, 15(1): 55-62.
- BENDIMERAD N., KIHAL M. and BERTHIER F. (2012).** Isolation, identification, and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation. *Dairy Science & Technology*, 92(3): 249-264.
- BENGOUMI M., FAYE B. and TRESSOL J.C. (1994).** Composition minérale du lait de chamelle du sud marocain, in : Bonnet P. (Ed.), Actes de l'atelier Chameaux et dromadaires, animaux laitiers, Nouakchott, Mauritanie, Oct. 24–26, 1994, CIRAD, Montpellier, France. 145–149.
- BENKERROUM N. (2008).** Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, 7(25): 4856-4867.
- BENNEDJMA I. and ROUIDJAA S. (2015).** Evaluation de la qualité physico-chimique et biochimique et suivie de l'activité protéolytique du lait camelin (collecté localement) durant sa transformation en fromage. Master en Sciences Biologiques, spécialité, Biochimie Appliquée. Université Kasdi Merbah – Ouargla, Algérie. 59 p.
- BENYAHIA L. and MANSOURI, B. (2014).** Etude physico-chimique, biochimique et qualité microbiologique du lait camelin cru. Mémoire de licence en sciences biologiques, Université Kasdi Merbah – Ouargla, Algérie.
- BOUBEZARI M.T. (2010).** Contribution à l'étude des caractéristiques physicochimiques et mycologiques du lait chez quelques races bovines, ovines et caprines dans quelques élevages de la région de Jijel. Mémoire de Magister en médecine vétérinaire Option : hygiène alimentaire Spécialité : surveillance de la chaîne alimentaire de la filière viande. Université MENTOURI de Constantine, Algérie. 124p.
- BOUDJENAH-HAROUN S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques, option Biochimie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie. 173p.
- BOUSSOUAR N. (2017).** Caractérisation technologique et sanitaire des entérocoques isolés à partir de lait de chamelle du sud-ouest Algérien. Thèse de doctorat: Biologie Moléculaire et Cellulaire, option: Microbiologie. Université Aboubeker BELKAID, Tlemcen, Algérie. 217p.
- BRANDELLI A., DAROIT D.J., CORREA A.P.F. (2015).** Whey as source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, 73: 149–161.

BREZOVEČKI A., ČAGALJ M., FILIPOVIĆ DERMIT Z., MIKULEC N., BENDELJA-LJOLJIĆ D. and ANTUNAC N. (2015). Camel milk and products. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 65(2): 81-90.

BROWN J.R. and HARTLEY B.S. (1966). Location of disulphide bridges by diagonal paper electrophoresis. The disulphide bridges of bovine chymotrypsinogen A. *Biochemical Journal*, 101(1): 214-228.

CAYOT P. and LORIENT D. (1998). *Structure et Technofonctions des protéines du lait*, ed. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris, France. 363p.

CHAN E.W.C., LIM Y.Y., WONGL.F., LIANTO F.S., WONGS.K., LIM K.K., JOE C.E. and LIM T.Y.(2008). Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*.109 (3): 477-483.

CHAOUI- KHEROUATOU N. and ATTIA N. (2008). Etude comparative des caséines camelines (*Camelus dromaderius*) et bovines. *Sciences & Technologie*, (28): 73-79.

CHEN W., CHEN H., XIA Y., ZHAO J., TIAN F. and ZHANG H. (1998). Production, purification et caractérisation d'une galactosidase thermostable potentielle pour l'hydrolyse du lactose du lait à partir de *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 91(5): 1751-1758.

DANLEY D.E. and GEOGHEGAN K.F. (1988). Structure and mechanism of formation of recombinant-derived chymosin C. *Journal of Biological Chemistry*, 263(20): 9785-9789.

DAVALOS A., MIGUEL M., BARTOLOME B. and LOPEZ-FANDINO R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9): 1939-1944.

DE ROISSART H. and LUQUET F.-M. (1994). *Bactéries lactiques: aspects fondamentaux technologiques. I & II*, Loriga (Chemin saint Georges, F-38410, France). 1219p.

DONNELLY, W. J., CARROLL, D. P., O'CALLAGHAN, D. M., & WALLS, D. (1986). Genetic polymorphism of bovine chymosin. *Journal of dairy research*, 53(4), 657-664.

DONNELLY W.J., O'CALLAHAN D. M., CARROLL D.P., MCCONNELL, D.J. and GANNON F. (1984a). Multiple forms of calf prochymosin and chymosin. *Biochemical society Transactions*, 12: 440-441.

DUBOIS-DELVAL V. (2006). Préparation de Peptides Antimicrobiens à partir de l'Hydrolyse Enzymatique de deux protéines: l'Hémoglobuline Bovines et l' α -Lactalbumine Bovine. Thèse de doctorat en Sciences spécialité: Biochimie. Université des Sciences et Technologies de Lille. 238p.

DUNN B.M. (2002). Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews*, 102(12): 4431-4458.

EL-AGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. and ASSAF R. (1996). Purification and characterization of Lactoferrin, Lactoperoxydase, Lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, 6(2): 129-145.

EL-AGAMY E.I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68(2); 227-232.

EL-AGAMY E.I. (2000). Physicochemical, molecular and immunological characterization of camel calf rennet: a comparison with buffalo rennet. *Journal of dairy research*, 67(1): 73- 81.

EL-AGAMY E.I. (2006). Camel milk. In: *Handbook of milk of non-bovine mammals*, Park Y.W. and Haenlein F.W. (Ed.), 1st edition, Blackwell publishing Iowa, USA. Chapter 6. 297-344.

EL-AGAMY E.I., NAWAR M., SHAMSIA S.M., AWAD S. and HAENLEIN G.F. (2009). Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children? *Small Ruminant Research*, 82(1): 1-6.

EL IMAM ABDALLA A. (2012). Composition and anti hypoglycemic effect of camel milk. In proceedings of the 3rd conference of the international society of camelid research and development. Musca, Sultanate of Oman. 300-301p.

ELAMIN F. M. and WILCOX C.J. (1992). Milk composition of Majaheim camels. *Journal of Dairy Science*, 75(11): 3155-3157.

EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J. L., KHORCHANI T. and ATTIA H. (2006). Therapeutic potential of whey proteins of camel colostrums. *Microbiologie et Hygiène Alimentaire*, 18(53): 70-76.

EL-HATMI H., GIRARDET J.M., GAILLARD J.L., YAHYAOUI M.H. and ATTIA H. (2007). Characterisation of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrum. *Small Ruminant Research*, 70(2-3): 267-271.

EL-HATMI, H. ; JRAD, Z. ; KHORCHANI, T. ; JARDIN, J. ; POIRSON, C. ; PERRIN, C. ; CAKIR-KIEFER, C. AND GIRARDET, J. M. (2016). Identification of bioactive peptides derived from caseins, glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 (GlyCAM-1), and peptidoglycan recognition protein-1 (PGRP-1) in fermented camel milk . *International Dairy Journal*, 56 , 159- 168.

ESHRAGA A., ABU EL-GASIM A.Y., EFADIL E.B. and ISAM A.M.A. (2011). Physicochemical, microbiological and sensory characteristics of yoghurt produced from camel milk during storage. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, 10(6): 2305-2313.

FARAH Z. and FARAH-RIESEN M. (1985). Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40 (11): 669-671.

- FARAH Z. (1986).** Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, 41(12): 763-765.
- FARAH Z. and BACHMANN M.R. (1987).** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42(11): 689-692.
- FARAH Z. and RÜEGG M.W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Structure*, 8(2), article 6: 211-216.
- FARAH Z. and ATKINS D. (1992).** Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 59(2): 229-231.
- FARAH Z., RETTENMAIER R. and ATKINS D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 62(1): 30-33.
- FARAH Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 60(4): 603-626.
- FARAH Z. (1996).** Camel milk properties and products. Published: SKAT, Swiss Centre for Developments Cooperation in Technology and Management, Vadianstrasse-42, CH—9000 St. Gallen, Switzerland. 19-61.
- FARRELL H.M., Jr., 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 cows' milk—Sixth revision. *Journal of dairy science*, 87(6): 1641-1674.
- FERRANTI P., MALORNI A., NITTI G., LAEZZA P., PIZZANO R., CHIANESE L. and ADDO F. (1995).** Primary structure of ovine α s1- casein: Localization of phosphorylation sites and characterization of genetics variants A, C, and D. *Journal of Dairy Research*, 62(2): 281-296.
- FILION M.M. (2006).** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. *Maitrise en Sciences et Technologie des Aliments*, Université Laval Québec, Canada. 159p.
- FOLTMANN B. (1966).** A review on prorennin and rennin. *Comptes-rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg*, 35(8): 143-231.
- FOLTMANN B. (1970).** [28] Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). In *Methods in enzymology*, 19. Academic Press, New York. 421-436.
- FOLTMANN B., HARLOW K., HOUEEN G., NIELSEN P.K. and SANGILD P. (1995)** Comparative Investigations on Pig Gastric Proteases and Their Zymogens. In: Takahashi K. (eds) *Aspartic Proteinases*, Springer, Boston, MA.. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 362: 41-51.

FREDOT E. (2009). Connaissances des aliments ; Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique ; BTS diététique (2^{ème} édition. Lavoisier-Techniques Et Documentation ; Paris. France. XXXIX-530p.

GARCÍA-NEBOT M.J., CILLA A., ALEGRÍA A. and BARBERÁ R. (2011). Caseinophosphopeptides exert partial and site-specific cytoprotection against H₂O₂ -induced oxidative stress in Caco-2 cells. *Food Chemistry*, 129(4): 1495-1503.

GARNIER J. and DUMAS B.R. (1970). Structure of the casein micelle. A proposed model. *Journal of Dairy Research*, 37(3): 493-505.

GAUCHERON F. (2005). The minerals of milk. *Reproduction Nutrition Development*, 45(4): 473-483.

GAYE P., GAUTRON J.-P., MERCIER J.-C. and HAZE G. (1977). Séquences aminoterminales des précurseurs des caséines ovines. *Communications de Recherche Biochimique et Biophysique*, 79(3): 903–911.

GHASEMI M. (2007). Immobilisation de la trypsine sur un support de polyéthylène fonctionnalisé par voie plasma. Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, Spécialité: Génie des Procédés et Haute Technologie. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), France. 170p.

GHENNAM E.H., ALLOUI-LOMBARKIA O. and GHENNAM A. (2007). Evolution de quelques caractères physico-chimiques et flore microbienne du lait de dromadaire conservé aux températures ambiante et de réfrigération. *Rencontres autour des Recherche sur les Ruminants*, 14: 109.

GIARDINA P., PALMIERI G., SCALONI A., FONTANELLA B., FARACO V., CENNAMO G. and SANNIA G. (1999). Structure protéique et génétique d'une laccase bleue de *Pleurotus ostreatus*1. *Biochemical Journal*, 341 (3): 655-663.

GIRARDET J.-M., SAULNIER F., GAILLAND J.-L., RAMET J.-P. and HUMBERT G., (2000). Camel (*Camelus dromadarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(1):19-26.

GNAN S.O. and SHERIHA A.M. (1986). Composition of Libyan camel's milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, 41(1): 33–35.

GOUDA A., ZAYAT A. and SHABRAWY S.A. (1984). Electron microscopy study on the size distribution of casein micelles, fat globules and fat globule membrane of camel milk. *Annals of Agricultural Science, Ain Shams University, Cairo, Egypt*. 29 (2): 755 –762.

HAILU Y., HANSEN E.B., SEIFU E., ESHETU M., IPSEN R. and KAPPELER S. (2016). Functional and technological properties of camel milk proteins: a review. *Journal of Dairy Research*, 83(4): 422-429.

HAMIDI, M., CHOUKRI, A., & LAHRECH, A. (2014). Fabrication d'un fromage camelin avec un extrait enzymatique immobilisé de la couche de kaolin du gésier de poules. *Livestock research for rural development*, vol 27(5)

HAMDY M.E.R. and AMIN A.S. (2002). Détection des espèces de *Brucella* dans le lait des bovins, ovins, caprins et chameaux infectés par PCR. *Le Journal vétérinaire*, 163(3):299-305.

HAMIDI M. (2015). Etudes des propriétés fonctionnelles et des aptitudes à la coagulation du lait de dromadaire par la couche de kaolin du gésier des poules. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, Université Mohamed KHIDER- Biskra, Algérie. 163p.

OMER R.H. and ELTINAY A.H. (2009). Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(5):607-610.

HERNANDEZ-LEDESMA B., DEL MAR CONTREAS M., RECIO I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165(1): 23-35.

HILL R. D., LAHAV E. and GIVOL D. (1974). A rennin-sensitive bond in α s1 B-casein. *Journal of Dairy Research*, 41(1): 147-153.

HINZ K., O'Connor P.M., Huppertz T., Ross R.P. and Kelly A.L. (2012). Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. *Journal of Dairy Research*, 79(2): 185-191.

FARRELL H.M., Jr., KUMONSINSKI T.F., PULASKI P. and THOMPSON M.P. (1988). Calcium-induced associations of the caseins: A thermodynamic linkage approach to precipitation and resolubilization. , 265(1): 146 – 158.

GASTEIGER I., GATTIKER A., HOOGLAND C., IVANYI I., APPEL R.D. and AMOS BAIROCH A. (2003). ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(13): 3784-3788.

HUBER R., KUKLA D., BODE W., SCHWAGER P., BARTELS K., DEISENHOFER J. and STEIGEMANN W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 89(1): 73-101.

HUSSEIN, H.J. (2011). Study to evaluation the camel milk. effect to inhibition *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. In patients with gingivitis . *Al-Kufa J. Veter. Science*.1(2), 20-27.

JRAD Z., EL HATMI H., ADT I., GIRARDET J.M., CAKIR-KIEFER C., JARDIN J., DEGRAEVE P., KHORCHANI T. and OULAHAL N. (2014a). Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science & Technology*, 94(3): 205-224.

JRAD Z., GIRARDET J. M., ADT I., OULAHAL N., DEGRAEVE P., KHORCHANI T. and EL HATMI H. (2014b). Antioxidant activity of camel milk casein before and after in vitro simulated enzymatic digestion. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka*, 64(4): 287-294.

JRAD Z., EL HATMI H., ADT I., KHORCHANI T., DEGRAEVE P. and OULAHAL N. (2015). Antimicrobial activity of camel milk casein and its hydrolysates. *Acta Alimentaria*, 44(4): 609-616.

KADA-BENAKLI L. and ANANE N. (2018). Caractérisation physicochimique et microbiologique de laits crus de chamelle et de vache- essai de coagulation par la présure. Mémoire de Master en Agro-alimentaire et Contrôle de qualité. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou. 123p.

KAGEYAMA T., ICHINOSE M., TSUKADA-KATO S., OMATA M., NARITA Y., MORIYAMA A. and YONEZAWA S. (2000). Molecular cloning of neonate/infant-specific pepsinogens from rat stomach mucosa and their expressional change during development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267(3): 806-812.

KAMAL M. (2016). Contribution à l'étude de la structure-texture du lait de chamelle lors de la coagulation et du traitement thermique : comparaison avec le lait de vache. Thèse de Doctorat en ingénierie des Fonctions Biologiques. Université d'ARTOIS, Hauts-de-France, France. 204p.

KAMOUN M. (1990) La production de fromage à partir du lait de Dromadaire. Les petits ruminants et leurs productions laitières dans la région méditerranéenne. Dans : Actes des colloques de Paris, 5-9 Mars 1990. Options Méditerranéennes, série A(12) : 119-124.

KAMOUN M. (1995). Le lait de dromadaire: production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. In Tisserand J.-L. (ed.). *Elevage et alimentation du dromadaire Zaragoza* : CIHEAM Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 13, 81-103.

KANSCI G., GENOT C., MEYNIER A., GAUCHERON F. and CHOBERT J.M. (2004). b-Caseinophosphopeptide f1-25 confers on b-casein tryptic hydrolysate an antioxidant activity during iron/ascorbate-induced oxidation of liposomes. *Le Lait*, 84: 449-462.

KAPPELER S.R., 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(2): 498-50.

KAPPELER S. (1998). Composition and structural analysis of camel milk protéins with emphasis on protective proteins. Thèse de doctorat en Sciences Techniques (ETH, No. 12947). Institut Fédéral Suisse de Technologie, Zürich, Suisse. 150p.

KAPPELER S.R., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998). Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65(2): 209-222.

- KAUFFMAN D L. (1965).** The disulphide bridges of trypsin. *Journal of Molecular Biology*, 12(3): 929-932.
- KENJI F. (2013).** Camel Milk. In *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. Edited by Young W. Park Y.W. and George Haenlein G. F.W. First Edition. 578-589.
- KHASKHELI M., ARAIN M.A., CHAUDHRY S., SOOMRO A.H. and QURESHI T. A. (2005).** Physico-chemical quality of camel milk. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 2: 164-166.
- 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.
- KHEROUATOU N. (2004).** OU (2000 La micelle du lait camelin : caractérisation physico-chimique, rhéologique, biochimique et techno-fonctionnelle. Thèse de Doctorat, Thèse de Doctorat, Ecole National des Ingénieurs ENIS de Sfax, Tunisie. 201p.
- KITTS D.D.(2005).** Propriétés antioxydantes des caséines phosphopeptides. *Tendances des sciences et technologies alimentaires*, 16(12):549-554.
- KONUSPAYEVA G., FAYE B. and LOISEAU G. (2009).** The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2): 95-101.
- KONUSPAYEVA G., LOISEAU G. and FAYE B. (2004).** La plus-value "santé" du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan. *Rencontre Recherches Ruminants*. 11 : 47-50.
- 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(1): 38-46.
- KOTB-EL-SAYED M.I., AL-SHOEIBI Z.Y., ABD EL-GHANY A.I. and ATEF Z.A. (2001).** Effects of Camel's Milk as a Vehicle for Insulin on Glycaemic Control and Lipid Profile in Type 1 Diabetics. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4: 179-189.
- KULA J. and DECHASA T. (2016).** Chemical Composition and Medicinal Values of Camel Milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences (IJRSB)*, 4(4): 13-25.
- KUMAR A., GROVER S., SHARMA J. and BATISH V.K. (2010).** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4): 243-258.

KUMAR D., CHATLI M.K., SINGH R., MEHTA N. and KUMAR P. (2016a). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*, 96(3): 391-404.

KUMAR D., MANISH-KUMAR C., RAGHVENDAR S., MEHTAA N. and KUMAR P. (2016 b). Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Ruminant Research*, 139: 20–25.

KUMAR D., SAVITRI T.N., VERMA R. and BHALLA T.C. (2008). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, 3(12): 661-672.

KUMAR D., VERMA A.K., CHATLI M.K., SINGH R., KUMAR P., MEHTA N. and MALAV, O. P. (2016). Camel milk: alternative milk for human consumption and its health benefits. *Nutrition & Food Science*, 46 (2): 217–227.

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

LALEYE L.C., JOBE B. and WASESA A.A.H. (2008). Comparative Study on Heat Stability and Functionality of Camel and Cow's Milk Whey Proteins. *Journal Dairy Science*, 91: 4527–4534.

LIU Y. and GUO R. (2008). pH dependent structures and properties of casein micelles. *Biophysical Chemistry*, 136(2-3): 67-73.

LÓPEZ-FANDIÑO R., OTTE J. and VAN CAMP J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACEinhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11): 1277-129.

MAÂMRI H. and MEKHLLOUFI S. (2013). Caractérisation des extraits gastriques coagulants issus de dromadaire non sevré. Mémoire de Master en Sciences Biologique, Spécialité : Biochimie Appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla, Algérie. 73p.

MAL G. and PATHAK K.M.L. (2010). Camel milk and milk products. SMVS'Dairy year book, Published by ServaManavVikasSamiti,3/82, Uttar Pradesh, India. 97-103.

MARCHIN S., PUTAUX J.L., PIGNON F. and LÉONIL J. (2007). Effects of the environmental factors on the casein micelle structure studied by cryo transmission electron microscopy and small-angle x-ray scattering/ultras-small-angle x-ray scattering. *The Journal of chemical physics*, 126(4): 95-101.

MATI A.(1992). Les proteose-peptones dans les laits Bovin, Ovin et Caprin :isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction A caractère hydrophobe contenant le composant-3-. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques et Fondamentales Appliquées. Université Henri POINCARÉ-Nancy1, France.159p.

MATI A., SENOUSI-GHEZALI C., SI AHMED ZENNIA S., ALMISEBBANE D., EL-HATMI H. and GIRARDET J.M. (2016). Dromedary camel milk proteins, a source of peptides having biological activities. A review, *International Dairy Journal*, 73: 25-37.

MCLACHLAN C.N.S. (2001). β -casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. *Medical Hypotheses*, 56(2): 262-272.

MEDART J. (2005). Les troubles digestifs et la dysbiose. In : *Manuel pratique de nutrition*. Edition de Boeck, 162-184.

MEDHAMMAR E., WIJESINHA-BETTONI R., STADLMAYR B., NILSSON E., CHARRONDIERE U.R. and BURLINGAME B. (2012). Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3): 445-474.

MEDJOUR A. (2014). Etude comparative des caractéristiques physico- chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semiintensif). Thèse de Magister en Biologie appliquée. Université Mohamed KHIDER, Biskra, Algérie. 125p.

MEHAIA M.A. (1994). Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. *Food Chemistry*. 50(2): 153-155.

MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. and EL-MOUGY S.A. (1995). Milk composition of majaheim, wadiah and hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 52(2): 115-122.

MERCIER J.-C., HAZE G., ADDEO F., GAYE P., HUE D. and RAYMOND M.-N. (1980). Séquence amino-terminale de la pré- β -lactoglobuline porcine. Comparaison avec son homologue ovin. *Communications de recherche biochimique et biophysique*, 97 (2): 802-810.

MIKES O., TOMASEK V., HOLEYSOVSKÝ V. and ŠORM F. (1966). Covalent structure of bovine trypsinogen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 117(1): 281-284.

MOHAMED M.A., MURSAL A.I. and LARSSON-RAZNIKIEWICZ M.(1989). Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, 44(5): 278-280.

MOLYNEUX P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.

MORTADA M. S. AND OMER I. A. H. (2013). Effect of fortifying camel's milk with skim milk powder on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of set yoghurt. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(6): 765-770.

MOSLEHISHAD ET AL. (2013). Moslehisad M., Ehsani M.R., Salami M., Mirdamadi S., Ezzatpanah H. ; Naslaji A. N. and Moosavi-Movahedi A. A. (2013a) . The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *International Dairy Journal* ,29, 82-87.

OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. and HAERTLÉ T. (1997). Characterization of caseins from Mongolian yak, khainak, and Bactrian camel. *Le Lait*, 77(5): 601-613.

OMANE K. and ZROUG H. (2016). Etude comparative de l'activité antibactérienne du lait et du colostrum humains, camélins, bovins, ovins et caprins dans la wilaya d'El-oued. Mémoire de Master en Sciences Biologiques, spécialité: Biochimie Appliquée. Université Echahid HAMMA Lakhdar -El OUED,Algérie. 62p.

OMAR A., HARBOURNE N. and ORUÑA-CONCHA M.J. (2016). Quantification of major camel milk proteins by capillary electrophoresis. *International Dairy Journal*, 58: 31-35.

OUSSAIEF O., JRAD Z., ADT I., KHORCHANI T., EI-HATMI H. (2020). Pouvoir antioxydant des protéines de colostrum camelin et leurs hydrolysats enzymatiques. *Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants*, 25: 469-472.

PALMER D.S., CHRISTENSEN A.U., SØRENSEN J., CELIK L., QVIST K.B. and SCHIØTT B. (2010). Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine κ -casein. *Biochemistry*, 49(11): 2563-2573.

PATEL A.S., PATEL S.J., PATEL N.R. and CHAUDHARY G.V. (2016). Importance of camel milk - An alternative dairy food, *Journal of Livestock Science*, 7:19-25.

PEDERSEN V.B., CHRISTENSEN K.A., AND FOLTMANN B. (1979). Investigations on the activation of bovine prochymosin. *European. Journal of Biochemistry*, 94(2): 573-580.

PESIC M.B., BARAC M.B., VRVIC M.M., RISTIC M.M., MACEJ O.D., STANOJEVIC .S.P. and KOSTIC A.Z. (2011 a). The distributions of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal*, 21(10): 831-838.

PESIC M.B., BARAC M., VRVIC M., RISTIC N., MACEJ O. and STANOJEVIC S. (2011 b). Qualitative and quantitative analysis of bovine milk adulteration in caprine and ovine milks using native-PAGE. *Food Chemistry*, 125: 1443-1449.

PETIT H. V., IVAN M. and BRISSON G.J. (1987). Duodenal flow of digesta in preruminant calves fed clotting or nonclotting milk replacer. *Journal of dairy science*, 70(12): 2570-2576.

PIGNON F., BELINA G., NARAYANAN T., PAUBEL X., MAGNIN A. and GÉSANGUIZIOU G. (2004). Structure and rheological behavior of casein micelle

suspensions during ultrafiltration process. *The Journal of Chemical Physics*, 121(16): 8138-8146.

RAISONNIER A. (2004). Digestion- Détoxification. DCEM1. Partie II et III. Université Paris-VI, Pierre et Marie Curie, France. 53-165.

RAMET J.P. (2003). Aptitude à la conservation et à la transformation fromagère du lait de chamelle. Actes de l'Atelier International sur « lait de chamelle pour l'Afrique » du 5-8 novembre, Niamey, Niger. FAO production et santé animales. Chapitre 09. 93-111.

RAMPILLI M., LARSEN R. and HARBOE M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International dairy journal*, 15(11): 1130-1137.

RASMUSSEN L.K., DUE H.A. and PETERSEN T.E. (1995). Human α S1-casein : purification and characterization. *Biochemistry and Molecular Biology*, 111(1):75-81.

RE R., PELLEGRINI N., PROTEGGENTE A., PANNALA A., YANG M. and RICEEVANS C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10) 1231–1237.

REN J., ZHAO M., SHI J., WANG J., JIANG Y., CUI C., KAKUDA Y. and XUE S.J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108(2): 727–736.

RIVAL S.G., BOERIU C.G. and WICHERS H.J. (2001). Caséines et hydrolysats de caséine. 2. Propriétés antioxydantes et pertinence pour l'inhibition de la lipoxigénase. *Journal de Chimie Agricole et Alimentaire*, 49 (1): 295-302.

RIYADH S.A., FARIS F.A., ELSYED I., A.MOHAMMED A., AHMAD S. AND A. MOEZ A. (2012). Effects of production system, breed, parity, and stage of lactation on milk composition of dromedary camels of Saudi Arabia. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 11(1):141-147.

SAADAOUI B., BIANCHI L., HENRY C., MIRANDA G., MARTIN P. and CEBO C. (2014). Combining proteomic tools to characterize the protein fraction of llama (*Lama glama*) milk. *Electrophoresis*, 35(10):1406-1418.

SADAT L., CAKIR-KIEFER C., N'NEGUE M.A., GAILLARD J.L., GIRARDET J.M. MICLO L. (2011). Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(4): 214-221.

SALAH S. (2008). Etude de l'hydrolyse enzymatique par la trypsine et la chymotrypsine des protéines du lactosérum bovin combinée aux rayonnements des micro-ondes. Mémoire de Magistère en Biologie, option physiologie de la nutrition et de la sécurité alimentaire. Université d'Oran 1- Ahmed BEN BELLA, Algérie. 99p.

SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M.R., DALGALARRONDO M., CHOBERT J.M., HAERTLE T., RAZAVI S.H., SABOURYA.A., Niasari-Naslaji.A. and MOOSAVI-MOVAHEDI A.A. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18(12): 1097-1102.

SALAMI M., MOOSAVI-MOVAHEDI A.A., MOOSAVI-MOVAHEDI F., EHSANI M. R., YOUSEFI R., FARHADI M., NIASARI-NASLAJI A., SABOURY A.A., CHOBERT J.M. and HAERTLE T. (2011). Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research*, 78(4): 471-478.

SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M.R., DALGALARRONDO M., CHOBERT J. M., HAERTLÉ T., RAZAVI S.H., SABOURY A.A., NIASARI-NASLAJI A. and MOOSAVI-MOVAHEDI A.A. (2008). Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal*, 18(12): 1097-1102.

SANOGO T., PAQUET D., AUBERT F. and LINDEN G. (1989). Purification de la S1-Caséine par chromatographie liquide rapide des protéines. *Journal of Dairy Science*, 72(9): 2242-2246.

SAWAYA W.N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A. and AL-MOHAMMAD H. (1984). Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science*, 49(3): 744-747.

SBoui A., ARROUM S., HAYEK N., MEKRASI H. and KHORCHANI T. (2015). Etude comparative de l'effet de la pasteurisation et de l'ébullition sur la composition physicochimique des laits camelin et bovin. *Journal of New Science, Agriculture Biotechnology*, volume JS-INAT(18): 943-949.

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: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 5(2): 293-304.

SCHMIDT D.G. (1980). Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 34(1): 42-64.

SCHMIDT D.G. (1982). Association of caseins and casein micelle structure. In *Developments in Dairy Chemistry 1—Proteins*, ed. P. F. Fox. Applied Science Publishers, Elsevier London, U.K. 61-85.

SENOUSSI C. (2011). Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algériens : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone. Thèse de Magister en Sciences Biologiques, option Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud MAMMERI, Tizi- Ouzou, Algérie. 97p.

SHUANGQUAN., TSUDA H AND MIYAMOTO T. (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in skim milk fermented with *Lactobacillus helveticus* 130B4 from camel milk in Inner Mongolia, China. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 2688–2692.

SHUIEP E.T.S., GIAMBRA I.J., EL ZUBEIR I.E.Y.M. and ERHARDT G. (2013). Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of α S1-casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. *International Dairy Journal*, 28(2): 88-93.

SHUIEP E.T.S., EL ZUBEIR I.E.M. AND YOUSIF I. A. (2014). Compositional Quality of Camel Milk and Some Husbandry Practices Associated with Camel Milk Production in Two Production Systems in Sudan. *SUST Journal of Agricultural and Veterinary Sciences*, 15 (2):10-17.

SI AHMED-ZENNIA S., ALMI D., SENNOUSSI C., BOUDJENAH S.H. and MATI. A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25 (4): 283-290.

SIBOUKEUR O. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, option Science Alimentaires. Institut National d'Agronomie d'EL-Harrach-Alger, Algérie. 92p.

SOLIMAN G.Z.A. (2005). Comparison of chemical and mineral content of milk from human, cow, buffalo, camel and goat in Egypt. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, 21(1): 116-13.

SOUID W. (2011). Effet des bactériocines (type NISINE) produites par une souche lactique isolée à partir du fromage camelin, sur une souche psychotrope. Mémoire de Magister, option : Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie. 80p.

STRANGE E.D., VAN HEKKEN D. and THOMPSON M.P. (1991). Qualitative and Quantitative Determination of Caseins with Reverse-Phase and Anion-Exchange HPLC. *Journal of Food Science*, 56(5): 1415-1420.

SUETSUNA K., UKEDA H. and OCHI H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(3): 128-131.

BARŁOWSKA J., KROL J. and LITWIŃCZUK Z. (2011). Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system –a review. *Animal Science Papers and Reports*, 29(4): 269-280.

TAGLIAZUCCHI D. ; SHERIF SHAMSIA S. AND CONTE A . (2016). Release of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides during in vitro gastro-intestinal digestion of camel milk. *International Dairy Journal* , 56, 119–128.

- TAYEFI-NASRABADI H., HOSEINPOUR-FAYZI M.A. and MOHASSELI M. (2011b).** Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in camel milk: A comparison with bovine lactoperoxidase. *Small Ruminant Research*, 99(2-3): 187-190.
- THOMPSON M.P., TARASSUK N.P., JENNESS R., LILLEVIK H.A., ASHWORTH U.S. and ROSE D. (1965).** Nomenclature of the proteins of cow's milk. Second revision. Report of the Committee on Milk Protein Nomenclature, Classification, and Methodology of the Manufacturing Section of ADSA for 1963-64. *Journal of Dairy Science*, 48(2): 159-169.
- THOMPSON M.P. (1966).** DEAE-cellulose-urea chromatography of casein in the presence of 2-mercaptoethanol. *Journal of Dairy Science*, 49(7): 792-795.
- TRIVIN F. and LE BRICON T. (2003).** Nouvelles techniques d'électrophorèse : applications aux protéines et à l'ADN. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 18(1): 11–22.
- TSOPMO A., ROMANOWSKI A., LYNESS BANDA L., LAVOIE J.C., JENSSEN H. and FRIEL J.K. (2011).** Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry*, 126 (3): 1138–1143.
- CAVALLI S.V., SILVA S.V., CIMINO C., MALCATA F.X. and PRIOLO N. (2008).** Hydrolyse des protéines du lait caprin et ovin, provoquée par les peptidases aspartiques des fleurs de *Silybum marianum*. *Food Chemistry*, 106(3): 997–1003.
- VALERIE E. (2007).** Hygienic status of camel milk in Dubai (United Arab Emirates) under two different milking management systems. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire. Dubai (United Arab Emirates). 120p.
- WANG J., CHEN Y., YANG S., UTTURKAR S., CRODIAN J., CUMMINGS S and CASEY T. (2017).** Effet d'un régime riche en graisses sur le transcriptome du lait sécrété chez les souris en milieu de lactation. *Génomique physiologique*, 49 (12): 747-762.
- WANGO J., FARAH Z., and PUHAN Z. (1998).** Iso-electric focusing of camel milk proteins. *International Dairy Journal*, 8(7): 617-621.
- WAUGH D.F., SLATTERY C.W. and CREAMER L.K. (1971).** Binding of cations to caseins. Site binding, Donnan binding, and system characteristics. *Biochemistry*, 10(5): 817-823.
- XIE N., WANG C., AO J. and LI B. (2013).** Non-gastrointestinal-hydrolysis enhances bioavailability and antioxidant efficacy of casein as compared with its in vitro gastrointestinal digest. *Food Research International*, 51(1): 114-122.
- YAGIL R. (1982).** Camels and camel milk. In *Animal production and health report*, paper, n° 26. 1 Publication FAO. Rome, Italy. 69p.

ZHANG H., YAO J., ZHAO D., LIU H., LI J., and GUO M. (2005). Changes in chemical composition of Alxa Bactrian camel milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 88(10): 3402-3410.

ZHAO D.B., BAI Y. H. and NIU Y.W. (2015). Composition and characteristics of Chinese Bactrian camel milk. *Small Ruminant Research*, 127: 58-67.

ZHOU D. Y., ZHU B. W., QIAO L., WU H.T., LI D. M., YANG J. F. and MURATA Y. (2012). *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2) : 148-154.