

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



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Spécialité : Sciences Biologiques
Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Détermination de l'activité anti-oxydante des protéines
sériques du lait de chamelle et de leurs hydrolysats
trypsiques et chymotrypsiques.**

Présenté par : M^{elle} BELABID Samira
M^{elle} DJOUDER Ouardia

Soutenu le : 19/07/2016
Devant le jury composé de :

Président :	Mr SEBBANE H.	Maitre-assistant A	UMMTO
Rapporteur :	M^{me} GHEZALI-SENOUSSI C.	Maitre-assistante A	UMMTO
Examineurs :	M^{me} SEBBANE-ALMI D.	Maitre-assistante A	UMMTO
	M^{me} OULARBI-SENANI N.	Maitre-assistante A	UMMTO

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Nous remercions Dieu de nous avoir donné la patience et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nous tenons à remercier sincèrement Monsieur MATI A., Professeur en biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pour nous avoir accueillis dans son laboratoire.

Nos remerciements s'adressent à notre promotrice M^{me} GHEZALI-SNOUSSI C, maître-assistante A à la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, d'avoir proposé et dirigé ce travail.

Que M^r BARIZ K, soit vivement remercié pour son aide si efficace et ses précieux conseils.

Nous remercions vivement M^r SEBBANE, maître-assistant A à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour avoir accepté de présider le jury.

Nos remerciements s'adressent à M^{me} SEBBANE-ALMI D maître-assistante A l'UMMTO, pour nous avoir guidés pendant la réalisation de la partie expérimentale et d'avoir accepté d'être membre de jury.

Nos remerciements vont aussi à M^{me} OULARBI-SENNANI N maître assistante A à l'UMMTO pour nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je dédie ce travail :

A mes chers parents pour leur amour inestimable, leur soutien et leurs sacrifices, que Dieu les protège et les bénisse.

A mes très chers frères et sœurs, pour leurs tendresses et leurs précieux encouragements.

A mes neveux et nièces, ma plus grande source de bonheur, j'espère que la vie leur réserve le meilleur.

A toute ma famille ainsi qu'à mes amies.

Ouardia DJOUDER

Je dédie ce modeste travail à :

- la mémoire de ma chère et regretté mère*
- mon père pour son grand soutien*
- mon cher époux qui ma beaucoup aidé, ses services m'ont été
d'un grand secours.*
- mes frères, mes sœurs*
- toute personne qui a souhaité mon succès.*

Samira BELABID

LISTE DES ABREVIATIONS

ABTS	2, 2-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
α- La	α - lactalbumine
α_s-CN	Caséine α_s
β- CN	Caséine β
β-La	β - lactoglobuline
κ-CN	Caséine κ
2ME	2 mércaptoéthanol
CN	Caséines
CNc	Caséines camelines.
CWBP:	«Camel Whey Basic Protein»
DO	Densité optique
DPPH	2,2 –diphényl-1-picryl-hydrazyle
FAO	Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.
FRAP	Ferric Reducing Atioxydant Power
IgGs	Immunoglobulines G
GLYCAM-1	Protéine murine d'adhésion cellulaire glycosylée-1
LF	lactoferrine
MM	Masse moléculaire
OSCN⁻	Hypothiocyanate
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PGRP	Protéine de reconnaissance du peptidoglycane
PM	Poids moléculaire
PP3	Composant -3 des protéose- peptones
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SCN⁻	Thiocyanate
TCA	Acide trichloracétique
TEMED	N, N, N', N'- tetramethyl-éthylène diamine.
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane.
WAP	Whey Acide Protein.

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET ANNEXES

N°	Titre	Page
Figures		
01	Structure de la micelle de CN dans un modèle de submicelles, montrant la protrusion du domaine C-terminal de la κ -caséine proposée par WALSTRA (PHADUNGATH, 2005)	7
02	Comparaison des régions sensibles à la chymotrypsine des caséines- κ Camelines et bovines (KAPPELER <i>et al</i> , 1998).	9
03	Structure de l' α -lactalbumine (BUSHMARINA <i>et al</i> , 2005)	10
04	Les étapes suivies pour l'isolement des protéines sériques à partir du lait de chamelle.	23
05	Structure du gel de polyacrylamide	24
06	Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS)	25
07	Schéma résumant les différentes étapes suivies pour déterminer le pouvoir réducteur du fer des séroprotéines camelines et leurs hydrolysats.	27
08	Réduction du radical DPPH en DPPH-H	28
09	Contrôle électrophorétique en PAGE SDS de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques camelines ; gel de séparation (T= 17% ; C= 2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% ; C=2,7% ; pH 6,8)	31
10	Histogramme illustrant le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) des protéines sériques et leurs hydrolysats.	33
Tableaux		
I	La composition chimique du lait de chamelle (%) (AL HAJ et AL KANHAL, 2010).	3

II	Concentration moyenne des protéines du lait camelin et leurs fonctions. (KAPPELER <i>et al</i> , 2003) in BOUDJENAH-HAROUN.	13
III	Quelques peptides bioactifs isolés du lait camelin fermenté par <i>Streptococcus thermophilus</i> et leurs homologues bovins (EL- HATMI <i>et al</i> , 2016).	19
IV	Le pouvoir d'inhibition de DPPH (%).	34
Annexes		
01	Préparation des tampons phosphate	
02	Pouvoir réducteur	
03	Figure illustrant l'intensité de la couleur verte dans le milieu réactionnel des protéines sériques camelines et leurs hydrolysats .	
04	Hydrolyse enzymatique	
05	Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2 β -ME	

SOMMAIRE

1. Synthèse des données bibliographiques	Pages
Introduction	1
1.1. Présentation du lait de chamelle	2
1.1.1. Production laitière.....	2
1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques.....	2
1.1.3. Composition chimique du lait de dromadaire.....	3
1.1.4. Aptitude du lait de chamelle aux transformations technologiques.....	4
1.1.5. Les vertus thérapeutiques du lait de chamelle.....	5
1.1.5.1. L'effet hypoallergénique.....	5
1.1.5.2. Effet antimicrobien.....	6
1.1.5.3. Effet hypocholestérolémiant.....	6
1.1.5.4. Effet hypoglycémiant.....	6
1.2. Les protéines du lait de chamelle.....	7
1.2.1. Les protéines micellaires.....	7
1.2.1.1. L'organisation micellaire des caséines camelines.....	7
1.2.1.2. Caractéristiques structurales.....	8
1.2.2. Les protéines sériques.....	9
1.2.2.1. Les protéines majeures.....	9
1.2.2.1.1. L' α -lactalbumine.....	9
1.2.2.1.2. L'albumine sérique.....	11
1.2.2.1.3. La β -Lactoglobuline.....	11
1.2.2.1.4. Les protéose peptones.....	11
1.2.2.2. Les protéines mineures	12
1.2.2.2.1. La lactoferrine.....	12
1.2.2.2.2. Lactoperoxydase.....	14
1.2.2.2.3. Le lysozyme.....	15
1.2.2.2.4. Les immunoglobulines.....	15
1.2.2.3. Les protéines spécifiques.....	15
1.3. Les activités biologiques des peptides issus de l'hydrolyse des protéines camelines.....	16
1.3.1. Activité antioxydante.....	16
1.3.2. Activité antibactérienne	18

1.3.3. Activité anti-hypertensive.....	18
2. Matériel et méthodes	
2.1. Matériel	20
2.1.1. Produits chimiques.....	20
2.1.2. Appareillage	20
2.1.3. Petit matériel.....	21
2.1.4. Matériel biologique.....	21
2.1.5. Matière première.....	21
2.2. Méthodes.....	21
2.2.1. Collecte du lait.....	21
2.2.2. Isolement des protéines sériques camelines.....	21
2.2.2.1. Ecrémage	21
2.2.2.2. Précipitation acide.....	22
2.2.2.3. Dialyse.....	22
2.2.2.4. Congélation et lyophilisation.....	22
2.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques.....	22
2.2.4. Contrôle électrophorétique de l'hydrolyse enzymatique.....	22
2.2.4.1. Principe de l'électrophorèse en PAGE- SDS.....	24
2.2.4.2. Conditions expérimentales.....	25
2.2.5. Détermination de l'activité antioxydante des protéines sériques totales et de leurs hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques.....	26
2.2.5.1. Test de la réduction du fer (test FRAP).....	26
2.2.5.1.1. Principe.....	26
2.2.5.1.2. Mode opératoire.....	26
2.2.5.2. Test de piégeage du radical DPPH (test DPPH).....	28
2.2.5.2.1. Principe.....	28
2.2.5.2.2. Conditions expérimentales.....	28
3. Résultats et discussion	
3.1. Isolement des protéines sériques.....	30
3.2. Contrôle électrophorétique en PAGE-SDS de l'hydrolyse des protéines sériques.....	30
3.3. Résultats de l'activité antioxydante	32
3.3.1. Le pouvoir réducteur du fer.....	32
3.3.2. Pouvoir d'inhibition du radical DPPH.....	34

Conclusion..... 36

Références bibliographiques

Résumé

Le lait de chamelle, principal produit alimentaire des populations des régions arides et semi-arides, présente des propriétés biologiques intéressantes qui font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques.

Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des protéines sériques camelines ainsi que leurs hydrolysats tryptiques et chymotryptiques.

Les protéines sériques isolées du lait camelin ont subi une hydrolyse enzymatique par deux protéases, la trypsine et la chymotrypsine. Cette hydrolyse a été contrôlée par électrophorèse en conditions dénaturantes PAGE-SDS. Le profil électrophorétique a révélé que les protéines sériques camelines sont plus susceptibles à l'hydrolyse par la chymotrypsine que par la trypsine. L'activité anti-oxydante a été évaluée par le biais de deux tests, le pouvoir réducteur du fer (test FRAP) et le pouvoir d'inhibition du radical DPPH.

Les résultats obtenus ont montré que les séroprotéines camelines présentent une activité anti-oxydante qui est plus importantes avec les hydrolysats chymotryptiques qui ont montré un haut pouvoir à réduire le fer et à piéger le radical DPPH (taux d'inhibition de 43,46 %).

Mots clés : Protéines sériques, lait de chamelle, hydrolyse enzymatique , trypsine, chymotrypsine, activité anti-oxydante, pouvoir réducteur, radical DPPH.

Abstract

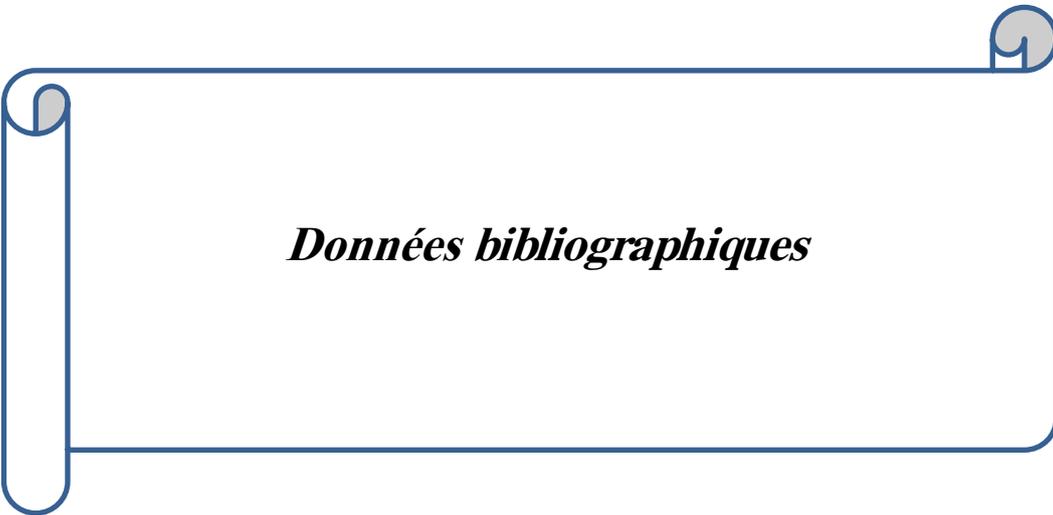
Camel milk, the main food product of people in arid and semi-arid areas. It presents interesting biological properties that are currently the subject of much scientific researches.

In this current study, we are interested to evaluate the antioxidant activity of camel whey proteins and their trypsin and chymotrypsin hydrolysates.

Whey proteins from camel milk were isolated, then they underwent an enzymatic hydrolysis by two proteases, trypsin and chymotrypsin. The enzymatic hydrolysis was monitored by electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE). The antioxidant activity was evaluated through two tests, ferric reducing antioxidant power (FRAP assay) and DPPH radical scavenging activity.

The electrophoretic profile revealed that camel whey proteins are more susceptible to hydrolysis by chymotrypsin than by trypsin. The results of the antioxidant activity showed that camel whey proteins exhibit an antioxidant activity which is greater with the chymotrypsin hydrolysates. We noticed a high ferric reducing power and DPPH scavenging activity with 43.46% of inhibition.

Keywords: whey proteins, camel milk, enzymatic hydrolysis, trypsin, chymotrypsin, antioxidant activity, reducing power, DPPH radical.



Données bibliographiques

Introduction

Le lait est connu comme un aliment naturel le plus complet, du fait de sa richesse en nutriments de base (protéines, glucides et lipides), en sels minéraux et en vitamines. Cet aliment noble est indispensable pour les nourrissons, mais aussi pour la nutrition des adultes.

Le lait de chamelle constitue la principale ressource alimentaire pour la population des régions arides et semi-arides, il est consommé à l'état cru ou sous forme de produit fermenté.

En effet, la production laitière cameline dans notre pays est loin d'être négligeable, elle est estimée à 13000 tonnes /an du lait qui sont produits par un effectif estimé à 28 % de chameaux. Cette production est destinée principalement pour la nourriture des chameaux et à l'auto-consommation.

Le lait de chamelle est connu par sa richesse en vitamine C, il possède un système protéique similaire à celui du lait de bovin sauf qu'il se singularise par l'absence de la β -Lactoglobuline, ce qui le rapproche du lait humain. De plus, il se caractérise par un système protecteur très puissant, lié à des taux relativement élevés en lysozyme, en lactoperoxydase et en lactoferrine. Cette composition présente un avantage certain pour la conservation du lait à l'état frais, mais devient un inconvénient lors de la transformation en produits dérivés (fromage, beurre, lait fermenté ...).

A côté de ses caractéristiques nutritives, le lait de chamelle s'avère présenter des propriétés médicinales. Il a été pendant longtemps utilisé à des fins thérapeutiques pour le traitement de plusieurs maladies telles que la tuberculose, le diabète, les diarrhées...

Ces propriétés thérapeutiques pourraient être assignées à la composition particulière de ce lait et à certains peptides bioactifs qui sont générés lors de la digestion des protéines.

Actuellement, les peptides bioactifs font l'objet de plusieurs études scientifiques liées principalement à leurs activités anti-oxydantes, anti-bactériennes et anti-hypertensives. Ces études se sont focalisées sur les protéines bovines et à moindre degré les protéines des autres espèces laitières telles que les protéines camelines alors qu'elles ont montré de nombreuses activités biologiques.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre étude qui a tracé comme objectif l'évaluation de l'activité anti-oxydante des protéines sériques du lait de chamelle, ainsi que celle des peptides libérés après une hydrolyse mimant la digestion gastro-intestinale par l'utilisation de la trypsine et de la chymotrypsine.

1.1. Aperçu sur le lait de chamelle

1.1.1. La production laitière

Le dromadaire est considéré comme une source importante de lait et de viande. Il est aussi utilisé comme moyen de transport lors des transhumances. Quant au lait de chamelle, il a un rôle nutritionnel important pour les populations des régions arides. Il contient les nutriments de base (protéines, lipides et glucides) analogues et en proportions convenables à ceux retrouvés dans le lait bovin (EL-AGAMY *et al*, 1998 ; KARUE, 1998).

La population cameline mondiale est estimée à 24,1 millions de têtes (FAO, 2012). La grande majorité de cette population (84%) sont des dromadaires (*Camelus dromadarius*) qui vivent dans les régions arides du Nord et du Nord-Est de l'Afrique, les 16% de cette population sont représentés par l'espèce *Camelus bactrianus* peuplant les régions froides de l'Asie.

En 2013, l'effectif camelin en Algérie a été estimé à environ 344 millions de têtes (FAO, 2014), ces dromadaires sont répartis sur trois zones principales : Sud-Est, Sud-Ouest et l'extrême sud Algérien.

En l'an 2010, la production laitière mondiale était estimée à 2,12 millions de tonnes de lait pour un effectif de 5,25 millions têtes de chameles (FAO, 2012).

Récemment, la production du lait de chamelle est évaluée à 5,3 millions de tonnes par an (FAO, 2014). L'Algérie produit environ 13000 tonnes de lait camelin /an avec un effectif représenté par 28% de femelles laitières (FAO, 2013). Une grande partie de cette production est consommée localement par les familles des éleveurs et par les petits chameles.

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques et organoleptiques du lait de chamelle

Le lait de dromadaire est un liquide de couleur blanc mat. Son goût est légèrement salé, il est attribué à la disponibilité de l'eau et au type d'alimentation des chameles (FARAH, 1993).

Le pH du lait de chamelle varie de 6,5 à 6,7. Il est légèrement plus bas que celui du lait de vache (6,8) (MEHAIA *et al*, 1995 ; KHASKHELI *et al*, 2005). Le lait de chamelle se caractérise par un haut pouvoir tampon, ce qui explique son acidification lente et sa conservation longue à des températures ambiantes (SAWAYA *et al*, 1984 ; KAMOUN, 1994 ; OMER et ELTINAY, 2009).

La densité du lait camelin est estimée à 1.029g/cm³ (FARAH, 1996). La viscosité du lait camelin est plus faible que celle du lait de vache, elle est estimée à 1,72 mPa s (KAMOUN, 1995) contre 2,04 mPa s pour le lait de vache (KHEROUATOU *et al*, 2003).

1.1.3. Composition chimique du lait de dromadaire

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

Tableau I : La composition chimique du lait de chamelle (%) (AL HAJ et AL KANHAL, 2010).

Composant	Teneur en %	Références
Eau	86,3-88,5	KHAN et IQBAL (2001)
Protéines totales	3,11	FARAH et RUEGG (1989)
	2,69	HADDADIN <i>et al</i> (2008)
	2,54	AL HAJ et AL KANHAL (2010)
Protéines sériques	0,63-0,80	FARAG et KABARY (1992) ;
		MEHAIA <i>et al</i> (1995) ; KHASKHELI <i>et al</i> (2005).
Caséines	1,63-2,76	
Matière grasse	3,95	EL-AGAMY <i>et al</i> (1998)
	1,2	ATTIA <i>et al</i> (2001)
	4,47	INDRA (2003)
Lactose	5,4	ATTIA <i>et al</i> (2001)
	3,92	HADDADIN <i>et al</i> (2008)
	2,9	SHUIEP <i>et al</i> (2008)
Fraction minérale	0,6-0,90	KONUSPAYEVA <i>et al</i> (2009)
Vitamine C	34,6 mg/l	SAWAYA <i>et al</i> (1984) ; FARAH <i>et al</i> (1992) ; HADDADIN <i>et al</i> (2007).

L'eau est l'élément le plus important qui affecte cette composition. La chamelle produit un lait plus dilué en période de sécheresse, la teneur en eau en été est de 89,8 % alors qu'elle est de 86,1% en hiver (AL HAJ et AL KANHAL, 2010). La dilution du lait est un

mécanisme d'adaptation naturelle des chamelles pour procurer de l'eau aux chamelons pendant les périodes de sécheresse.

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

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

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

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

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

1.1.4. Aptitude du lait de chamelle aux transformations technologiques

Le lait de chamelle, du fait de sa composition et de la structure particulière de certains de ses composants, est connu à l'origine pour avoir des aptitudes technologiques assez limitées, notamment dans la fabrication du fromage et du beurre. Les facteurs qui limitent ces aptitudes technologiques peuvent être résumés comme suit :

- La faible proportion en κ -CN et la grande taille des micelles de caséines limitent le processus de coagulation lors de la fabrication fromagère (ATTIA *et al*, 2000) ;
- Le lait de chamelle contient des facteurs antimicrobiens en grande quantité ce qui rend difficile son acidification (EL-AGAMY *et al*, 2000 ; ATTIA *et al*, 2001) ;
- La petite taille des globules gras rendant la séparation de la matière grasse difficile par écrémage, de ce fait, des contraintes ont été rencontrées pour l'obtention du beurre à partir du lait de chamelle notamment, un temps de barattage long, un rendement faible et une texture défectueuse (YAGIL, 1982 ; KARRAY *et al*, 2005).

Cependant ces contraintes ont été contournées par des adaptations technologiques sur ce lait. C'est ainsi que des essais concluants de transformation du lait de chamelle en produits dérivés ont été rapportés par plusieurs auteurs, notamment pour la fabrication du lait en poudre (ABU-LEHIA, 1994), du beurre (FARAH *et al*, 1989 ; FARAH et RÜEGG, 1991), du fromage (MOHAMED *et al*, 1990 ; KAMOUN, 1990 ; 1995 ; MEHAIA, 1993a ; 1993b ; RAMET, 1993), du yaourt et du lait fermenté (FARAH *et al*, 1990 ; ABU-TARBOUSH, 1996 et 1998) et des crèmes glacées (ABU-LEHIA *et al*, 1989).

1.1.5. Les vertus thérapeutiques du lait de chamelle

Le lait de chamelle est utilisé traditionnellement pour ses nombreuses vertus thérapeutiques et médicinales. Ce lait est couramment utilisé pour le traitement de certaines maladies infectieuses notamment la tuberculose. En Inde, le lait de chamelle est utilisé contre la jaunisse, les problèmes de la rate, l'asthme et l'anémie (EL AWADI et STRIKUMAR, 2001). Il est connu également pour ses effets immunostimulants contre les cancers. Son efficacité dans le traitement des ulcères et du diabète est également observée (MOHAMED *et al*, 2009). Ces propriétés peuvent être associées à certains composants de ce lait, particulièrement les facteurs antimicrobiens, l'insuline et la vitamine C (KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

1.1.5.1. Effet hypoallergénique

L'allergie aux protéines du lait de vache représente l'une des allergies alimentaires les plus fréquentes chez les enfants (SAMPSON, 2004 ; KATZ *et al*, 2010). En Algérie, ce type d'allergie est estimé à 3,6% (BOUGHELLOUT *et al*, 2015).

La β -lactoglobuline, principale protéine allergène du lait bovin, est complètement absente dans le lait camelin (FARAH, 1993 ; MERIN *et al*, 2001 ; FIOCCHI, 2010 ; HINZ *et al*, 2012). ce qui fait que ce lait a des caractéristiques proches du lait maternel (KATZ, 2008),

donc il pourrait être une alternative nutritionnelle pour les enfants allergiques aux protéines du lait de vache. Cet effet hypoallergénique est dû également à la faible quantité en caséine α_s (EL-AGAMY *et al*, 2009).

1.1.5.2. Effet antimicrobien

L'effet antibactérien du lait camelin est attribué à certains de ses composés comme la lactoferrine, le lysozyme, les immunoglobulines et la lactoperoxydase (EL-AGAMY *et al*, 1992 ; LOISEAU *et al*, 2001 ; EL-HATMI *et al*, 2006).

Le lysozyme est une protéine qui constitue le système antibactérien puissant du lait de chamelle. Le lysozyme camelin montre une forte activité contre *Salmonella typhimurium*, par comparaison aux autres types de lysozymes (EL-AGAMY, 2000).

La lactoferrine possède des propriétés antivirales et antifongiques. Elle agit sur des virus comme l'herpès, le virus de l'hépatite C et sur le VIH (JOUAN, 2002). Son effet sur la croissance de certaines mycètes pathogènes a été démontré par ANDERSON (2000).

Le lait camelin fermenté est riche en bactéries lactiques qui renforcent les propriétés anti microbiennes contre des germes pathogènes. Le shubat est ainsi fréquemment utilisé dans la prévention et la lutte contre les diarrhées. (KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

1.1.5.3. Effet hypocholestérolémiant

Un effet hypocholestérolémiant du lait de chamelle a été observé. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer cet effet. Parmi les mécanismes avancés, il y'a l'interaction entre les peptides bioactifs dérivés des protéines camelines et le cholestérol (SEELIG et SEELIG, 1996 ; Li et PAPADOPOULOS, 1998) ainsi que la présence de l'acide orotique en concentration élevée dans le lait camelin, estimée à 76,1 mg/l (HADDADIN *et al*, 2007) qui pourrait être responsable de la réduction du taux de cholestérol chez l'homme (KORYCKA *et al*, 1979 in HADDADIN *et al*, 2007 ; BUONOPANE *et al*, 1992).

1.1.5.4. Effet hypoglycémiant

L'amélioration du statut glycémique chez les diabétiques traités au lait de chamelle serait due à la présence de l'insuline à une forte concentration 52 μ U/ml (AGRAWAL *et al*, 2003) et 40,5 μ U/ml estimée par WERNERY *et al* (2006). L'insuline est normalement neutralisée suite au caillage du lait dans l'estomac sous l'effet de l'acidité du milieu, mais la particularité du lait de chamelle c'est qu'il ne caille pas sous l'effet de l'acidité de l'estomac,

ce qui augmente la disponibilité de l'insuline qui sera absorbée par les intestins (AGRAWAL *et al*, 2003).

1.2. Les protéines du lait de chamelle

Le lait de chamelle est une source considérable de protéines et de peptides capables de moduler diverses fonctions physiologiques. Sur le plan nutritionnel, il est de bonne qualité puisqu'on y retrouve tous les acides aminés essentiels (AZZA *et al*, 2007).

1.2.1. Les protéines micellaires

1.2.1.1. L'organisation micellaire des caséines camelines

Les caséines du lait camelin sont des phosphoprotéines qui possèdent une organisation micellaire (figure 01). Ces micelles sont des colloïdes édifiés à partir de quatre types de caséines (α S1, α S2, β et κ -CN) en interaction avec une fraction minérale dont le composant prédominant est le phosphate de calcium (LEONIL *et al*, 2007).

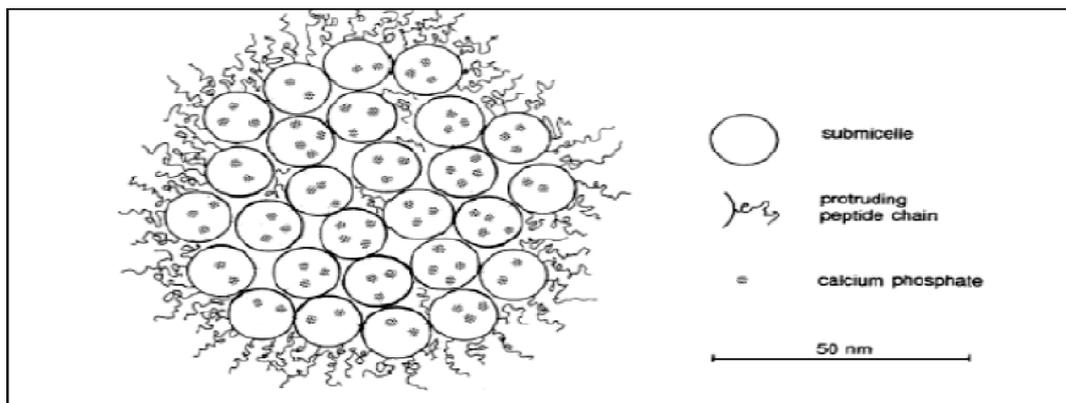


Figure 1 : Structure de la micelle de CN dans un modèle de submicelles, montrant la protrusion du domaine C-terminal de la κ -caséine proposée par WALSTRA (PHADUNGATH, 2005)

La micelle des caséines dans le lait de dromadaire se caractérise par un diamètre supérieur (260-300nm) à celui de la micelle bovine (100-140nm) (ATTIA *et al*, 2000). La micelle de caséine cameline est fortement minéralisée que son homologue bovin, le taux en minéraux et en citrate est évalué à 98 mg/g de caséines dans le lait de chamelle (ATTIA *et al*, 2000) contre 67 mg/g de caséines dans le lait de vache (SCHMIDT, 1982).

Les proportions respectives en Mg, en P et en citrate sont plus élevées dans le lait de chamelle, elles représentent 2/3, 2/3 et 1/3 contre 2/5, 3/5 et 1/10 pour la micelle bovine.

Au cours de l'acidification, la micelle du lait de dromadaire paraît préserver son intégrité jusqu'aux environs du pH 5.5. A pH 5.0 le lait de dromadaire est caractérisé par une structure ouverte, un minimum de viscosité et par un maximum d'hydratation (ATTIA *et al*, 2000).

1.2.1.2. Caractéristiques structurales

Dans le lait camelin, le contenu en caséines peut aller de 52 à 87% (Al HAJ et Al KANHAL, 2010). Les différentes fractions caséiniques se répartissent dans des proportions différentes (β -CN (65%), α S1-CN (22%), α S2-CN (9,5%) et κ -CN (3,5%)) (KAPPELER, 1998).

Comparées au lait bovin, les caséines camelines montrent une faible teneur en κ -CN et une proportion plus importante en β -CN ainsi qu'une mobilité électrophorétique différente (FARAH *et FARAH-RIESEN*, 1985 ; LARSSON-RAZNIKIEWICZ *et MOHAMED*, 1986 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ; KAPPELER *et al*, 1998). La composition en acides aminés est partiellement similaire entre les caséines camelines et bovines (LARSSON-RAZNIKIEWICZ *et MOHAMED*, 1986 ; OCHIRKHUYAG *et al*, 1997)

Concernant la caséine α S1 cameline, deux variants génétiques (A et B) ont été décrits. La séquence primaire du variant A renferme 207 résidus d'acides aminés, alors que le variant B se caractérise par l'insertion de 8 résidus d'acides aminés entre les résidus Gln¹⁵⁴ et Pro¹⁵⁵ du variant A (KAPPELER *et al*, 1998).

D'après une étude réalisée par EL-TAHIR *et al* (2012), un autre variant génétique C a été identifié. Comme le variant A, sa séquence primaire compte 207 résidus d'acides aminés. La différence entre ces deux variants réside dans leurs pI, où des valeurs de 3,22 et 2,77 ont été attribuées pour les variants A et C respectivement.

La caséine α S2 est composée de 178 résidus d'acides aminés pour une MM de 21,26 KDa (KAPPELER, 1998). Elle est caractérisée par la présence de deux résidus cystéine.

La β -CN est la fraction la plus abondante dans le lait camelin, elle renferme 217 résidus d'acides aminés et 4 sites de phosphorylation en positions Ser (15-17-18 et 19). La masse moléculaire de la β -CN est estimée à 26KDa (KAPPELER *et al*, 1998 ; EL-AGAMY *et al*, 2009). La β -CN joue le rôle d'une molécule chaperonne où elle prévient l'agrégation protéique (MORGAN *et al*, 2005 ; ZHANG *et al*, 2005). Sur le plan structural, la β -CN possède un court domaine N-terminal hydrophile et un large domaine C-terminal hydrophobe.

Comme d'autres molécules chaperons, la β -CN est dépourvue de résidus cystéine mais elle est riche en résidus proline (SWAISGOOD et DAIRY, 1993).

La κ -CN est présente dans le lait de chamelle en très faible quantité. Sa migration électrophorétique fait apparaître une fine bande contigüe avec la β -CN d'intensité négligeable (CHAOUI-KHEROUATTOU et ATTIA, 2008). La κ -CN n'occupe que 3,5% des caséines totales (EL-AGAMY, 2006). Sa structure primaire compte 162 acides aminés, sa masse moléculaire est de 22,9KDa (EL-AGAMY *et al*, 2009 ; KAPPELER, 1998). Le site de clivage de la κ -CN cameline par la chymosine est au niveau de la liaison Phe⁹⁷- Ile⁹⁸ au lieu de la liaison Phe¹⁰⁵- Met¹⁰⁶ dans le cas du lait bovin (KAPPELER *et al*, 1998) (figure 02).

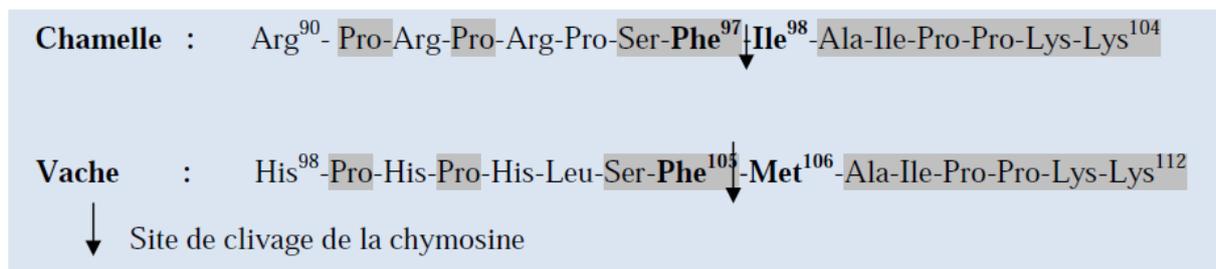


Figure 02 : Comparaison des régions sensibles à la chymotrypsine des caséines- κ Camelines et bovines (KAPPELER *et al*, 1998).

1.2.2. Les protéines sériques du lait camelin

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

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

1.2.2.1. Les protéines majeures

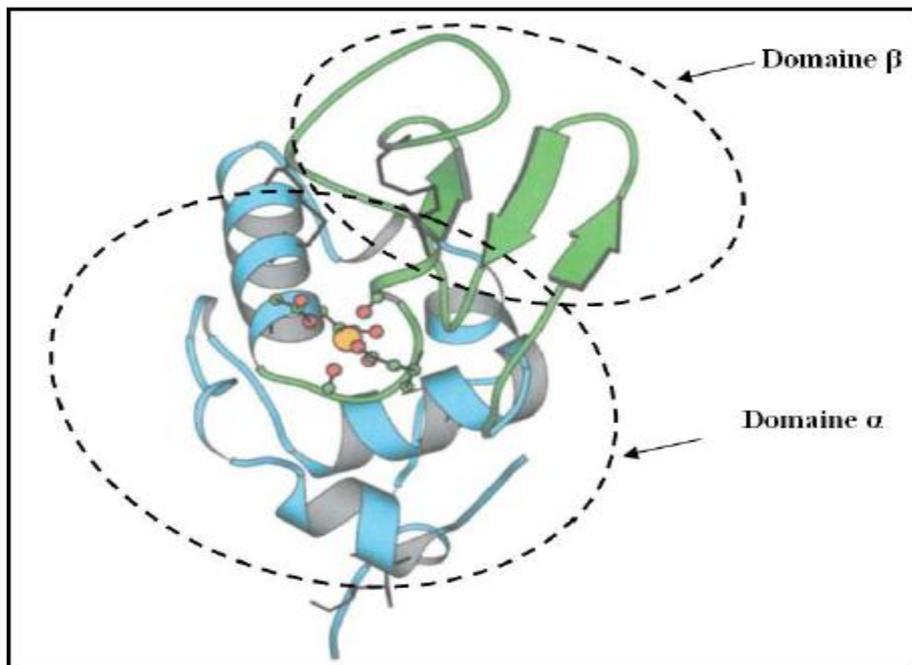
1.2.2.1.1. L' α -Lactalbumine

L' α -La est une protéine globulaire compacte de la famille des métalloprotéines capable de se lier à plusieurs ions métalliques, principalement le calcium (Ca²⁺) (figure 03). C'est la protéine majeure du lactosérum camelin (BEG *et al*, 1985), sa teneur moyenne est de

2,2 g/l (EL-HATMI *et al*, 2007) similaire à celle dans le lait bovin (2,04 g/l) (LEVIEUX et OLLIER, 1999).

La structure primaire de l' α -La compte 123 résidus d'acides aminés et une masse moléculaire de 14,2KDa. Son pHi est de 5,01.

L' α -La est une protéine de très bonne qualité nutritionnelle où les acides aminés essentiels occupent 63,2% du total des acides aminés composant cette protéine dans le lait bovin (FARRELL *et al*, 2004). Le rôle principal de l' α -La est la synthèse du lactose du lait en interagissant avec la $\beta(1,4)$ galactosyl transférase pour former le complexe lactose synthase (MESSER et ELLIOT, 1987).



**Figure 03 : Structure de l' α -lactalbumine (BUSHMARINA *et al*, 2005)
Les ponts disulfures sont représentés par des traits noirs et Le calcium est indiqué par un rond jaune.**

1.2.2.1.2. L'albumine sérique

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

L'albumine sérique est responsable à 80% du maintien de la pression osmotique dans le corps (QUINLAN *et al*, 2005).

Sa concentration dans le lait camelin est estimée à 9,2g/l (EL-HATMI *et al*, 2007). Sa séquence primaire est constituée de 583 résidus d'acides aminés, avec une masse moléculaire de 66339Da.

1.2.2.1.3. La β -Lactoglobuline

La β -Lg est la protéine sérique majeure secrétée dans le lait des mammifères (HAMBLING *et al*, 1992). Sa structure primaire est composée de 126 acides aminés. Cette protéine est absorbée dans l'intestin sous forme native ou faiblement hydrolysée, ce qui explique son potentiel allergénique (SCHMIDT *et al*, 1995).

La β -Lg appartient à la superfamille des lipocalines (FLOWER, 1996). Il a été suggéré que cette protéine a une fonction similaire à celle de la protéine transporteuse du rétinol (RBP ou retinol binding protein) en se complexant à la vitamine A et la transportant dans l'intestin du nouveau-né (GODOVAC-ZIMMERMANN, 1988).

Le profil électrophorétique des protéines sériques camelines diffère considérablement de celui des protéines bovines. L'absence de la bande correspondante à la β -Lg dans le lait camelin est caractéristique de ce lait (FARAH, 1993 ; EL-HATMI *et al*, 2007). Ce qui rapproche le lait de chamelle du lait de femme qui est dépourvu de la β -Lg, principal composant allergénique du lait chez le nourrisson.

1.2.2.1.4. Le composant 3 des protéose-peptones

Selon ROWLAND (1938), l'appellation « protéose-peptones » désigne la fraction des protéines du lait soluble après traitement thermique à 95°C pendant 30min suivi d'une acidification à pH 4.6.

Le PP3 est le composant majeur des protéoses-peptones, c'est une phosphoglycoprotéine isolée à partir du lait bovin (GIRARDET *et al*, 1996). Des homologues à cette protéine ont été identifiés dans le lait des autres espèces, comme le lait camelin (BEG *et al*, 1987) ovin et caprin (SORENSEN *et al*, 1997 ; LISTER *et al*, 1998).

Le PP3 a été isolé pour la première fois dans le lait de chamelle par BEG *et al*(1987). Il est parmi les protéines sériques les plus abondantes dans ce lait, sa concentration est évaluée entre 0,9g/l (KAPPELER *et al*, 1999b) et 1,1g/l (Girardet *et al*, 2000).

La structure primaire de cette protéine comprend 135 résidus d'acides aminés (GIRARDET *et al*, 1996). L'étude du profil des acides aminés du PP3 camelin révèle une faible proportion en acides aminés aromatiques et en acides aminés soufrés (NG *et al*, 1970 ; KESTER et BRUNNER, 1982 ; PAQUET et ALAIS, 1982). Cette protéine se caractérise également par son hydrophobicité élevée (PAQUET *et al*, 1985).

Le PP3 appelé également lactophorine (SORENSEN et PETERSON, 1993) appartient à la famille des GLYCAM-1 (molécule d'adhésion cellulaire glycosylation dépendante -1) et pourrait par conséquent jouer un rôle dans la défense immunitaire du chamelon (GIRARDET *et al*, 2000). Cependant, plusieurs fonctions sont assignées au PP3 bovin, cette protéine possède des propriétés moussantes et émulsifiantes (INNOCENTE *et al*, 2002), inhibe la lipolyse spontanée du lait (ANDERSON, 1982 ; CARTIER et CHILLIARD, 1986 ;

CARTIER *et al*, 1990) et pourrait également compléter l'effet antibactérien des IgG quand le lait remplace le colostrum (EL-HATMI *et al*, 2006).

1.2.2.2. Les protéines mineures

Un certain nombre de protéines quantitativement mineures ont été isolées du lait. Ces protéines mineures, de par leur structure, ont des propriétés protectives intéressantes.

1.2.2.2.1. La lactoferrine

La lactoferrine c'est une glycoprotéine qui appartient à la famille des transferrines. Elle se trouve dans le lait ainsi que dans les sécrétions biologiques. Sur le plan structural, la lactoferrine est formée de deux lobes homologues (N et C) qui sont connectés par un petit peptide charnier, chaque lobe possède un site de fixation du fer (MOORE *et al*, 1997 ; ANDERSON *et al*, 1998). La lactoferrine cameline est composée de 689 résidus d'acides aminés. Elle possède 17 ponts disulfures et 4 sites de glycosylation. Sa masse moléculaire est estimée à 80KDa (KAPPELER *et al*, 1999).

Tableau II : Concentrations moyennes des protéines du lait camelin et leurs fonctions (KAPPELER *et al*, 2003) in BOUDJENAH-HAROUN (2012).

Protéine	Concentration (mg/l)	Fonction principale
α s 1-Caséine	5000	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
α s 2-Caséine	2200	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
β -Caséine	15000	Nutritive (acides aminés, Ca, P)
κ -Caséine	800	Coagulation de la micelle de caséines
α -lactalbumine	3500	Synthèse du lactose
β -Lactoglobuline	-	Liaison et transport des acides gras et du rétinol
Wheyacidicprotein (WAP)	157	Régulation dans la croissance épithéliale ; similaire au WDNM
Lactophorine (PP3)	950	Inhibition de la lipolyse
Lactopherrine	95	Anti-inflammatoire, nutritive, fixation du fer
Lactoperoxydase	-	Anti-inflammatoire, activité bactéricide
Petidoglycan recognition protein (PGRP)	107	Anti-inflammatoire
Lysosyme C	-	Activité bactéricide, N-acetylmuramidase.

La concentration de la lactoferrine est deux fois plus importante dans le lait camelin, 220mg/l contre 140mg/l dans le lait bovin (KAPPELER, 1998).

La lactoferrine inhibe la croissance de certaines bactéries pathogènes en séquestrant le fer privant ainsi le milieu de croissance de cet élément essentiel (WEINBERG, 1995). En plus de son action bactériostatique, la LF possède un pouvoir bactéricide. Elle peut s'attacher directement à la surface de la membrane des bactéries et provoquer ainsi leur lyse cellulaire (YAMAUCHIE et al, 1993).

En plus de sa capacité de fixer le fer, la lactoferrine peut se lier à plusieurs types de cellules (BERGENS *et al*, 1983), à l'ADN (FURMANSKI, 1995, aux glycosaminoglycanes et aux lipopolysaccharides (ELASS-ROCHARD *et al*, 1995). C'est ce qui explique les différentes fonctions assignées à cette protéine, telles que le rôle antimicrobien, antiviral, antioxydant, modulateur de la réponse inflammatoire (CROUCH *et al*, 1992 ; SANCHEZ *et al*, 1992) et facteur de croissance (SANCHEZ *et al*, 1992).

1.2.2.2. La lactoperoxydase

Les peroxydases c'est un ensemble d'enzymes qui appartiennent aux systèmes non-immuns de la défense anti- microbienne du lait (KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

La lactoperoxydase du lait camelin est une glycoprotéine cationique, son pHi est estimé à 8,63 et sa masse moléculaire est de 69460 Da (KAPPELER, 1998).

Cette protéine possède une forte stabilité vis-à-vis des traitements thermiques, la rendant impropre comme témoin de la pasteurisation du lait de chamelle (SABUMUKAMA, 1997 in KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

Cette enzyme catalyse l'oxydation des thiocyanates (SCN^-) endogènes en présence d' H_2O_2 afin de produire des composés intermédiaires, les hypothiocyanates (OSCN^-), qui possèdent des propriétés antimicrobiennes (VISALSOK *et al*, 2004).

Le système lactoperoxydase agit en perturbant les activités cellulaires faisant intervenir des protéines, telles que l'inhibition de la chaîne respiratoire, la perturbation de la synthèse d'ADN et d'ARN. Ceci suite à la fixation des hypothiocyanates sur les groupements SH libres des protéines membranaires et des enzymes clés du métabolisme. (HUI, 1993 ; KUSSENDRAGER et VAN HOOIJDONK 2000) in ADOLPHIE (2006).

1.2.2.2.3. Le lysozyme

C'est une protéine naturellement présente dans le lait des mammifères. Cette enzyme est considérée comme un facteur antimicrobien très puissant, elle catalyse l'hydrolyse de la liaison β (1-4) entre l'acide N-acétylemuramique et N-acétyl glucosamine du peptidoglycane de la paroi bactérienne (JOHANSON, 1994 ; TAYLER et LEACH, 1995).

La concentration du lysozyme dans le lait de chamelle est plus élevée que dans le lait de vache. Les valeurs sont estimées entre 62 à 684 $\mu\text{g/ml}$ dans le lait camelin (EL-AGAMY *et al*, 1996) contre 7 à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans le lait bovin (KORHONEN, 1997).

Il a été rapporté par EL-AGAMY *et al*(1996) que l'activité enzymatique du lysozyme camelin est plus importante que celle du lait bovin. Comme toutes les protéines camelines et comparativement aux lactoprotéines bovines, le lysozyme est plus thermorésistant car il résiste à un chauffage de 85 °C/30mn (EL-AGAMY, 2000).

1.2.2.2.4. Les immunoglobulines

Le dromadaire possède un système immunitaire unique, qui est différent de celui des autres mammifères. Les IgG_s camelins ne se limitent pas à une seule sous-classe, mais elles englobent 3 sous-classes principales (IgG₁, IgG₂, IgG₃) (MARTIN *et al*, 1997). Les sous-classes IgG₂ et IgG₃ sont dépourvues des chaînes légères et possèdent des homodimères de chaînes lourdes de 45 et 42KDa (HAMERS-CASTERMAN *et al*, 1993). Il a été suggéré que le domaine fonctionnel de la partie variable de la chaîne lourde (VH) de ces anticorps interfère avec plusieurs processus biologiques. Les IgG₂ et IgG₃ agissent comme de vrais inhibiteurs compétitifs de certaines enzymes, en pénétrant dans leurs sites actifs (MARTIN *et al*, 1997 ; HOLT Li *et al*, 2003) telles que les enzymes cruciales dans le cycle de vie du HIV, la transcriptase reverse, la protéase et l'intégrase (LAUWEREYS *et al*, 1998).

1.2.2.3. Les protéines spécifiques du lait de chamelle

KAPPELER *et al*(1998) et OCHIRKHUYAG *et al* (1998) ont montré que des protéines n'ayant aucun homologue dans le lait bovin sont présentes dans le lait camelin. Le profil électrophorétique du lactosérum camelin révèle la présence de trois bandes spécifiques avec des PM différents (ABBEDRAHMANE *et al*, 2015).

La CWBP (Camel Whey Basic Protein) a été identifiée pour la première fois dans le lait de chamelle par OCHIRKHUYAG *et al* (1998). C'est une protéine à pHi basique et de masse moléculaire évaluée par SDS-PAGE à 20KDa. La CWBP a été détectée dans le lait

des chamelles après 148 heures de la mise bas à une concentration pouvant varier de 1,7 g/l à 3,01 g/l (EL-HATMI, 2007).

La WAP (Whey Acidic Protein) a été détectée par BEG *et al* (1984 ; 1986). Sa masse moléculaire est estimée à 14 KDa. C'est une protéine à caractère acide (KAPPELER, 1998), avec un pHi de 4,7. Sa séquence primaire renferme 117 résidus d'acides aminés avec 16 résidus cystéine (BEG *et al*, 1986 ; BEG, 1986).

La PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein) a été isolée par KAPPELER *et al* (2004), purifiée et cristallisée par SHARMA *et al* (2008). Sa masse moléculaire est évaluée à 19,1 KDa, elle est caractérisée par un pHi basique (9,02) (KAPPELER *et al*, 2004). C'est une protéine protectrice (EL-HATEMI, 2006), elle possède une activité antibactérienne. Dans le lait camelin, la PGRP se présente à des concentrations plus élevées que les autres protéines antibactériennes telles que la lactoferrine, la lactoperoxydase ou le lysozyme (KAPPELER *et al*, 1999).

1.3. Les activités biologiques des peptides issus de l'hydrolyse des protéines camelines

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

Des peptides dérivés des protéines du lait possèdent des fonctions biologiques différentes. Ces peptides sont obtenus soit *in vivo* par des protéases digestives ou *in vitro* par hydrolyse enzymatique. Comme ils peuvent être libérés par fermentation du lait en utilisant différentes bactéries lactiques acides (LAB) (PESCUMA *et al*, 2011).

Les principales activités attribuées aux peptides issus des protéines camelines sont les activités anti-oxydante, anti-bactérienne et anti-hypertensive (QUAN *et al*, 2008 ; SALAMI *et al*, 2009 ; 2010 ; 2011 ; HOMAYOUNI-TABRIZI *et al*, 2015 ; EL-HATMI *et al*, 2016 ; SOLEYMENZADEH *et al*, 2016).

1.3.1. Activité anti-oxydante

Plusieurs acides aminés offrent une activité anti-oxydante aux protéines par leur capacité à donner des protons aux radicaux libres (Trp, Phe, Tyr, His, Cys) ou par leur aptitude à chélater les ions métalliques (Glu, Asp, Lys, Arg, His) (ELIAS *et al*, 2005).

L'activité anti-oxydante des peptides dépend non seulement de leur composition en acides aminés mais aussi de leur taille et la position de ses acides aminés (SALAMI *et al*, 2011).

L' α -lactalbumine se caractérise par une forte activité anti-oxydante, elle se trouve à des concentrations élevées dans le lait camelin. Cette activité peut être expliquée par son contenu élevé en acides aminés essentiels qui ont des propriétés anti oxydantes en particulier Trp, Cys et Lys (HEINE *et al*, 1991). D'après LIEN (2003), il semble que la Cys est un élément important dans le système antioxydant du nouveau-né.

Le mécanisme antioxydant de la lactoferrine est principalement lié à sa capacité à chélater des métaux (Fe^{3+} , Cu^{2+}) qui catalysent les réactions d'oxydation des acides gras insaturés.

Certains travaux (SALAMI *et al*, 2011 ; KUMAR *et al*, 2015 ; EL-HATEMI *et al*, 2016) ont montré que les caséines du lait de chamelle constituent une bonne source de peptides possédant des propriétés anti-oxydantes, principalement la β -CN qui est riche en acides aminés aromatiques.

L'étude de HOMAYOUNI-TABRIZI *et al* (2015) a montré que l'hydrolyse des protéines camelines par les enzymes digestives libère deux peptides avec de potentielles propriétés anti-oxydantes, les (NV-13) et (KQ-15) qui sont homologues aux séquences 153-164 de α S1-CN de *Camelus dromedarius* et à la séquence 185-197 de la β -CN de *Camelus bactrianus*, respectivement. Ces peptides possèdent des MM respectives de 1348,38 et 1780,15 Da. Leur action réside dans l'augmentation de l'expression du gène de la superoxyde dismutase (SOD) et ainsi l'inhibition de la peroxydation des lipides.

SOLEYMENZADEH *et al* (2016) ont montré l'activité anti-oxydante du lait camelin fermenté par différentes bactéries lactiques acides notamment, *Leuconostoc lactis*. Des peptides bioactifs ont été identifiés dans le lait camelin fermenté par *Staphylococcus thermophilus*, ces peptides sont principalement dérivés des caséines, de la lactophorine et de la PGRP (EL-HATMI *et al*, 2016) (tableau III).

MOLEHISHAD *et al* (2013) ont démontré que des peptides générés du lait fermenté par *Lactobacillus rhamnosus* possèdent une activité anti-oxydante très forte qui serait dûe aux peptides libérés de l' α S₁-CNet de la β -CN.

1.3.2. Activité antibactérienne

Dans une étude comparative, SALAMI *et al* (2010) ont montré que les protéines sériques camelines ainsi que leurs hydrolysats présentent une forte activité antibactérienne contre *Escherichia coli* par rapport à leurs homologues bovins. Cette activité s'est avérée plus importante avec les peptides de 3KDa issus de l'hydrolyse par la protéinase K.

Dans d'autres travaux (JRAD *et al*, 2014 ; EL-HATMI *et al*, 2016), l'activité antibactérienne des protéines camelines et leurs hydrolysats a été démontrée sur différentes souches bactériennes.

D'après BENKERROUM (2010), les peptides dérivés des protéines du lait possèdent souvent un caractère amphiphile et cationique, qui explique leur pouvoir antimicrobien par des interactions électrostatiques entre ces peptides et les membranes bactériennes (chargées négativement), conduisant à la formation des pores et la mort cellulaire.

1.3.3. Activité anti-hypertensive

En plus des deux activités biologiques précédemment cités, d'autres peptides ont été identifiés avec des activités diverses, telles que l'inhibition de l'angiotensine convertase-1.

Dans ce contexte, les travaux de (QUAN *et al*, 2008 ; SALAMI *et al*, 2010 MOSLEHISHAD *et al*, 2013 ; JRAD *et al*, 2014 ; TAGLIAZUCCHI *et al*, 2016) ont identifiés des peptides avec une activité anti-hypertensive suite à l'hydrolyse des protéines camelines par des enzymes digestives ou bactériennes.

QUAN *et al* (2008) ont pu identifier un peptide (107-115) de la κ -CN libéré suite à la fermentation du lait camelin par *Lactobacillus helveticus*, il s'avère que ce peptide est très stable aux protéases digestives et au traitement thermique.

En utilisant une autre espèce fermentaire, MOSLEHISHAD *et al* (2013) ont mis en évidence l'activité anti-hypertensive sur du lait fermenté par *Lactobacillus rhamnosus*.

Récemment, TAGLIAZUCCHI *et al* (2016) ont séquencé un tripeptide IPP libéré suite à l'hydrolyse de la κ -CN par des enzymes digestives présentant une forte activité inhibitrice de l'angiotensine convertase-1. JRAD *et al* (2014) ont montré que l'effet anti-hypertensif du lait camelin est amélioré après hydrolyse enzymatique.

Tableau III : Quelques peptides bioactifs isolés du lait camelin fermenté par *Streptococcus thermophilus* et leurs homologues bovins (EL- HATMI *et al*, 2016)

Peptides camelins bioactifs	Homologues bovins	L'activité biologique	Référence
Peptides dérivés de β -CN : Peptide (179-184) VPYPQR Peptide (201-207) PVRGLHP	Peptide (177-183) AVPYPQR Peptide (199-208) GPVRGPFPII	Anti-oxydante et anti-hypertensive. Anti-oxydante	RIVAL <i>et al</i> (2001) HERNANDEZ-LEDESMA <i>et al</i> (2005).
α _{S2} -CN: Peptide 3P (1-22) KHEMDQGGΣΣΣEESINV SQQKFK	Bovine α S2-CN-4P (1-32): KNTMEHVSSSEESIIS QETYKQEKNMAINPS K	Anti-oxydante ; fixation des minéraux ; immuno-modulation.	MEISEL (2004)
κ -CN: Peptide (35-41) YPSYGIN	Bovine κ -CN (35-41) YPSYGLN	Antagoniste opioïde	CHIBA <i>et al</i> (1989).
PGRP: Peptide (147-154) HRDVQPTL	HSHRDFQPVLHL-NH2	Inhibition de l'angiogenèse ; anti-tumorales.	KOLOZSI (2009).



Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

L'objectif de la partie expérimentale est d'évaluer le pouvoir réducteur et la capacité de piégeage du radical DPPH des protéines sériques camelines totales et leurs hydrolysats par la trypsine et la chymotrypsine. Cette partie a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de Biochimie de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU, durant la période allant du mois d'Avril au mois de Mai 2016.

2.1. Matériel

2.1.1. Produits chimiques

KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , DPPH, ethanol (70 %), ferricyanure de potassium, acide trichloroacétique (TCA), chlorure de fer, chlorure de sodium, dodecyl sulfate de sodium, glycérol, Tris, 2-mercaptoethanol, acrylamide, bis-acrylamide, bleu de bromophenol, TEMED, bleu de coomassie, glycine, persulfate d'ammonium.

2.1.2. Appareillage

-Unité d'électrophorèse : plaques en verre et en silice, cuve d'électrophorèse, générateur de courant, espaceurs.

-spectrophotomètre UV-Visible (SHINADZU) ;

-centrifugeuse (SIGMA), max 15000 g ;

-bain-marie (MEMMERT Allemagne) ;

-pH mètre (Hanna 808351);

-balance de précision (OHAUS, USA) (0.001 g) ;

-balance analytique (0.01 g) ;

-agitateurs (magnétique, vortex, basculant) ;

-lyophilisateur ;

-étuve.

2.1.3. Petit matériel

Autre matériel a été utilisé au cours de la manipulation notamment :béchers, fioles jaugées, flacons, tubes à essai, tubes à hémolyse, tubes à centrifugation, micropipette, pipette graduée....

2.1.4. Matériel biologique

Deux enzymes protéolytiques ont été utilisées qui sont la chymotrypsine (avec une activité enzymatique de 57,74) et la trypsine (1645U/mg).

2.1.5. Matière première

Lait de chamelle d'origine Oued Souf (sud d'Algérie).

2.2. Méthodes

2.2.1. Collecte du lait

Le lait est trait à partir de chammelles saines, il est immédiatement additionné d'un antibactérien (azide de sodium 0,01%) puis acheminé au laboratoire dans une glacière à +4°C.

A l'arrivée, une mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH mètre à +20°C. Une moitié du lait a été acidifiée pour isoler les échantillons protéiques, alors que l'autre moitié a été fractionnée et congelée à -18°C.

2.2.2. Isolement des protéines sériques camelines

C'est une opération à plusieurs étapes, qui a pour objectif l'isolement de la fraction sérique des protéines totales du lait camelin, ces étapes sont illustrées dans la figure (04).

2.2.2.1. Ecrémage

L'écémage du lait entier est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 20 min à +4°C. Cette étape a été répétée deux fois à cause des difficultés rencontrées lors de l'écémage du lait camelin. La matière grasse est récupérée à l'aide d'une spatule.

2.2.2.2. Précipitation acide

La précipitation est réalisée par l'ajout d'une solution d'HCl4N, ainsi le pH est amené progressivement à 4,3. C'est le pH isoélectrique des caséines camelines qui permet leur précipitation. Le lait acidifié est ensuite centrifugé à 3500 g pendant 15 min à 20°C.

Le culot de centrifugation constitue la fraction caséinique et le surnageant représente les protéines sériques totales. Ce dernier est neutralisé à pH 7,00 par NaOH1N pour une meilleure solubilisation des protéines.

2.2.2.3. Dialyse

La fraction des protéines sériques est dialysée contre l'eau distillée pendant 48 à 72h à 4°C et sous agitation douce, en utilisant des membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 8000 Da.

2.2.2.4. Congélation et lyophilisation

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

2.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques

L'hydrolyse enzymatique a été réalisé selon le protocole décrit par SALAMI *et al* (2008). Les protéines sériques obtenues sont solubilisées à raison de 25 mg /ml dans le tampon phosphate 50 mM, pH 7,8. Des volumes appropriés de solution enzymatiques de chymotrypsine et de trypsine sont ajoutés séparément aux solutions protéiques de façon à obtenir un ratio enzyme/substrat de 1%. Ensuite, les solutions sont incubées au bain marie à 37°C pendant 4h. L'ajout des solutions d'enzymes se fait d'une manière progressive pour éviter l'autolyse des enzymes.

Après 4h d'incubation, la réaction d'hydrolyse est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 min. Les solutions d'hydrolysats sont ensuite congelées puis lyophilisées.

2.2.4. Contrôle électrophorétique de l'hydrolyse enzymatique

L'électrophorèse est une méthode d'analyse fondée sur la migration différentielle des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

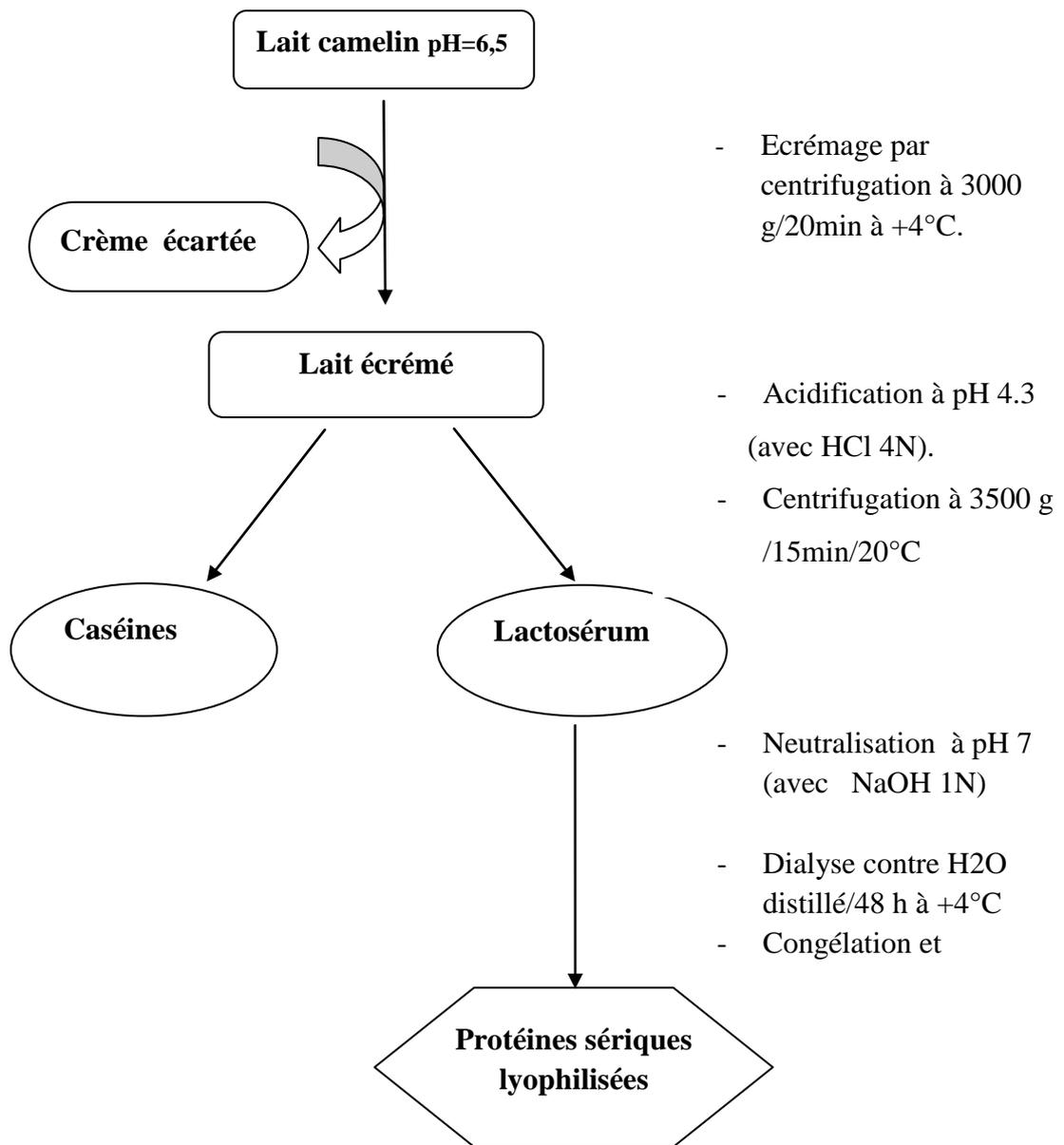


Figure 04 : Les étapes suivies pour l'isolement des protéines sériques à partir du lait de chamelle.

Le gel de polyacrylamide, est l'un des supports les plus utilisés. Il est constitué de la polymérisation entre des monomères d'acrylamide (C_3H_5NO) sous forme de longues chaînes et un co-monomère bifonctionnel, le N, N'-méthylène bis acrylamide ($C_7H_9N_2O_2$), formant des ponts interchaines (figure 05). La polymérisation est catalysée par le persulfate d'ammonium $(NH_4)_2S_2O_8$ et le N, N, N, N- tétra méthylène diamine (TEMED).

Les propriétés du gel sont déterminées par les indices T et C et sa porosité est ajustée en faisant varier les concentrations de l'acrylamide et du bis- acrylamide.

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

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

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

2.2.4.1. Principe de l'électrophorèse en PAGE- SDS

Un échantillon protéique est chauffé à $100^\circ C$ pendant 5 min, en présence d'un détergent anionique le dodécylsulfate de sodium (SDS ; 10 % P/V) (figure 06) et d'un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfure, le 2-mercaptoéthanol (2-ME ; 4% V/V). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et ne seront séparés que suivant leur taille dans un gel de porosité appropriée.

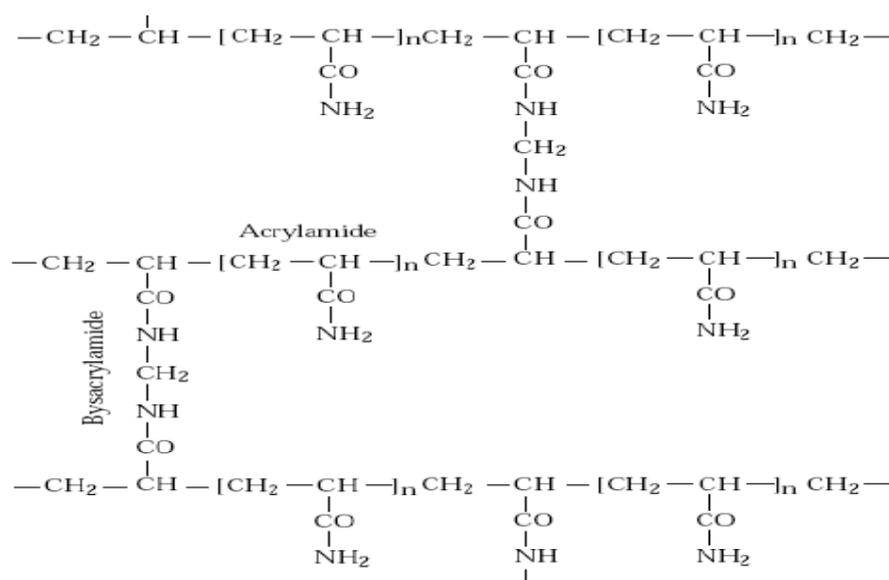


Figure 05: Structure du gel de polyacrylamide.

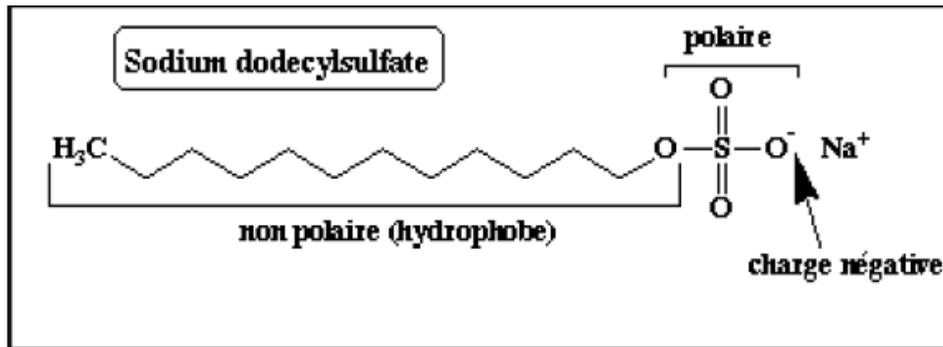


Figure 06 : Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS)

2.2.4.2. Conditions expérimentales

Les fractions issues de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques ont été analysées par électrophorèse en présence du SDS. L'électrophorèse a été réalisée dans une cuve verticale selon les conditions opératoires suivantes : gel de concentration (T=4,8% ; C=2,7%) en tampon (Tris 0,49 M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T=17% ; C=2,7%) en tampon (Tris 1,5M ; pH 8). Le tampon d'électrode est composé du Tris, glycine et SDS, pH8,3.

Les échantillons (protéines sériques et leurs hydrolysats) sont dissous à raison de 1,5 mg/ml dans le tampon Tris-HCl 50mM ; pH 6,8 contenant du SDS à 4%, 2-ME à 3%, glycérol à 10% et du bleu de bromophénol. Les échantillons subissent un traitement thermique à 100°C pendant 5min puis ils sont refroidis à l'eau de robinet.

Des volumes de 10 µl ont été déposés dans les puits du gel, la migration électrophorétique a été effectuée sous des conditions électriques de 20 mA, 250 V et 10W pendant 2h30.

Après migration, les échantillons sont fixés dans une solution de TCA 12 % pendant 45 min, puis colorés dans une solution de coloration (bleu de coomassie R250 2%, éthanol 30%, acide acétique 5% et eau distillée 65%) pendant 1 h. La décoloration du gel s'effectue dans le mélange d'acide acétique 5%, d'eau distillée 65 % et de l'éthanol 30%.

2.2.5. Détermination de l'activité anti-oxydante des protéines sériques totales et de leurs hydrolysats tryptiques et chymotrypsiques

L'activité anti-oxydante des protéines sériques et des hydrolysats obtenus par l'action de la trypsine et de la chymotrypsine est évaluée sur deux aspects, la réduction du fer et la capacité de ces molécules à piéger le radical DPPH. Tous ces tests sont réalisés en 3 essais.

2.2.5.1. Test de la réduction du fer (Test FRAP)

2.2.5.1.1. Principe

Ce test repose sur la capacité des échantillons protéiques à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Pour réaliser ce test, nous avons adopté la méthode décrite par OYAIKU (1988). Le composant antioxydant réduit le ferricyanure de potassium en ferrocyanure qui est par combinaison avec les ions ferriques, conduit à la formation d'un complexe de couleur verte qui absorbe dans l'UV- visible à 700 nm.

2.2.5.1.2. Mode opératoire

Les échantillons sont d'abord solubilisés dans de l'eau distillée à raison de 2mg/ml. 1ml de la solution protéique et de chaque hydrolysats est additionné de 1ml du tampon phosphate (0,2M ; pH6, 6) et de 1ml de la solution de ferricyanure de potassium à 1%.

Après 20 min d'incubation à 50°C, 1 ml de la solution d'acide trichloracétique à 10% est ajoutée et le mélange est ensuite centrifugé pendant 10 min à 1500g. Le surnageant récupéré est additionné de 1ml d'eau distillée et de 0,2 ml de la solution aqueuse de chlorure de fer à 0,1%.

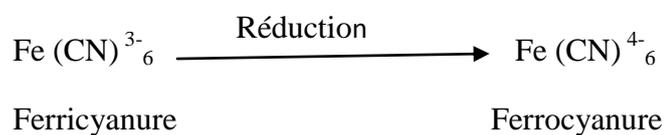
Le milieu réactionnel est incubé à température ambiante pendant 10 min, puis les absorbances sont mesurées à 700nm.

Le contrôle négatif de la réaction est réalisé en mélangeant tous les réactifs et en suivant toutes les étapes, sauf que les échantillons sont remplacés par de l'eau distillée.

Les étapes suivies dans ce test sont résumées dans la figure (07).

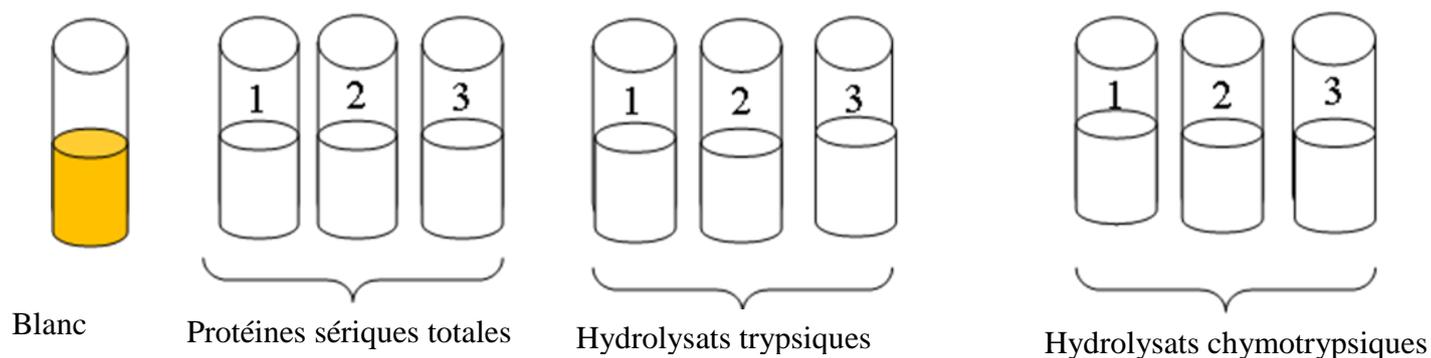
Etape 1 : ajout aux échantillons
tampon phosphate ; K_3FeCN

Incubation 50 °C/20min



Ajout de TCA

Centrifugation 1500g/10min



Etape 2 : ajout aux surnageant

H_2O ; $FeCl_3$.

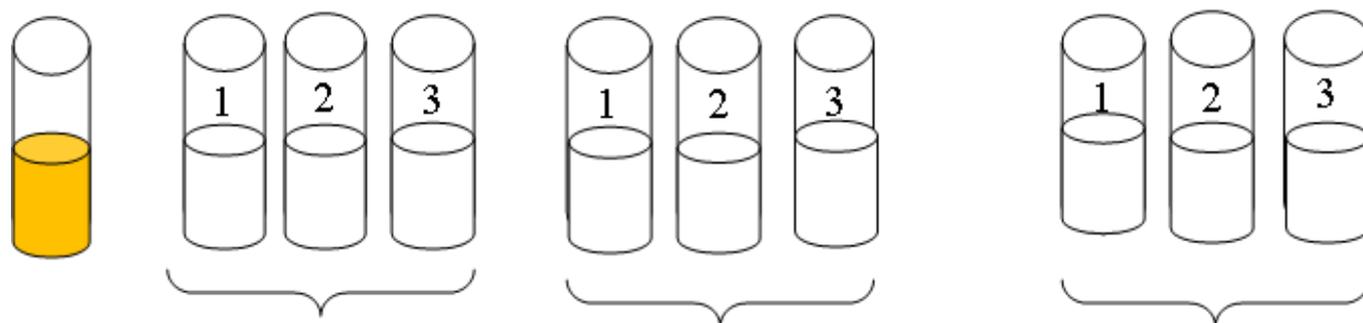
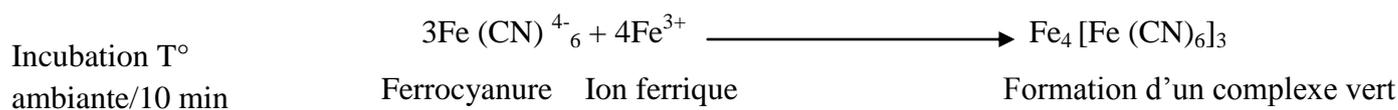


Figure 07: Schéma résumant les différentes étapes suivies pour déterminer le pouvoir réducteur du fer des séroprotéines camelines et leurs hydrolysats.

2.2.5.2. Test de piégeage du radical DPPH (Test DPPH)

2.2.5.2.1. Principe

Le DPPH est un radical libre qui possède un électron non apparié sur un atome d'azote. Du fait de la délocalisation de cet électron, les molécules du radical ne forment pas de dimères. Cette délocalisation est à l'origine de la couleur violacée intense bien caractéristique de la solution DPPH qui absorbe dans l'UV-visible à la longueur d'onde de 517 nm.

Le DPPH est le substrat ordinaire utilisé pour déterminer la capacité anti-oxydante des composés. En réagissant avec une molécule anti-oxydante, il se transforme en DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) (figure 08).

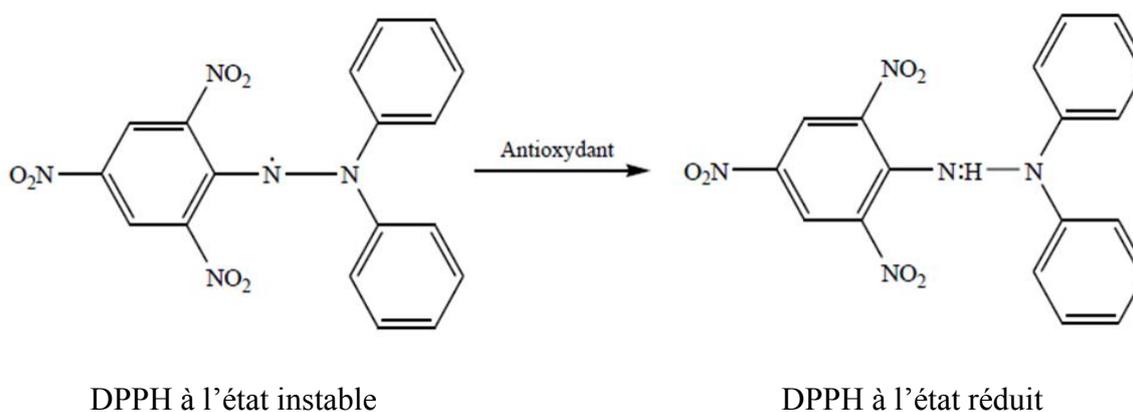


Figure 08 : Réduction du radical DPPH en DPPH-H

2.2.5.2.2. Conditions expérimentales

La méthode utilisée pour réaliser ce test est celle décrite par ZHU *et al* (2008). La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4 mg de DPPH (0,1 mM) dans 100 ml d'éthanol à 70%.

Comme pour le test précédent, les échantillons de protéines sériques et des hydrolysats trypsiques et chymotrypsique sont solubilisés dans de l'eau distillée (2mg/ml)

Un volume de 2ml de la solution du DPPH est ajouté à 1ml de chaque échantillon. Après incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, les absorbances sont mesurées à 517 nm.

La solution de DPPH dans l'éthanol est considérée comme un contrôle.

Le pouvoir anti-oxydant est évalué en calculant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = (\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle} \times 100.$$



Résultats et discussion

3. Résultats et discussion

3.1. Isolement des protéines sériques

Ce travail expérimental a pour objectif d'évaluer l'activité anti-oxydante des protéines sériques totales camelines et des peptides générés par hydrolyse chymotrypsique et trypsique de ces protéines.

L'état de fraîcheur de l'échantillon de lait de chamelle a été vérifié en mesurant le pH, la valeur retrouvée est de 6,4. Cette valeur correspond au pH normal du lait de chamelle et elle est similaire aux résultats rapportés par la littérature (SAWAYA *et al*, 1984 ; AHMED, 1990) qui ont rapporté des valeurs de 6,53 et 6,49 respectivement. Alors que KHASKHELI *et al*(2005), ils ont avancé une valeur légèrement plus élevée (6,77).

Les protéines sériques totales sont isolées par acidification du lait camelin à pH 4,3. Ce pH correspond au pHi des caséines camelines (WANGOH *et al*, 1998) c'est un pHi légèrement plus bas que le pHi des caséines bovines qui est de 4,6.

3.3. Contrôle électrophorétique en PAGE-SDS de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques

Afin de mimer la digestion, deux enzymes protéolytiques ont été utilisés, la trypsine (EC 3.4.21.4) et la chymotrypsine (EC 3.4.21.1). Ces deux enzymes appartiennent à la famille des sérine-protéases. La trypsine clive spécifiquement au niveau des extrémités carboxyliques des acides aminés basiques (Lysine et Arginine), alors que la chymotrypsine coupe au niveau des extrémités C-terminales des acides aminés aromatiques.

L'hydrolyse enzymatique des séroprotéines est évaluée par PAGE-SDS, en comparant le profil électrophorétique des hydrolysats obtenus à celui des protéines sériques totales considérées comme témoin négatif.

En s'appuyant sur des données bibliographiques, les bandes qui apparaissent sur le profil électrophorétique représenté en figure (09) pourraient correspondre selon leur mobilité électrophorétique croissante aux Igs, CSA et l' α -La.

Les Igs migrent à un niveau plus très faible, vue leur PM très élevé. L' α -lactalbumine cameline est représenté par une bande bien focalisée, son PM est faible, elle migre à un niveau plus loin.

L'analyse du profil électrophorétique représenté en figure (09) montre une diminution de l'intensité des bandes électrophorétique qui est très accentuée dans le cas des hydrolysats

chymotrypsiques. Dans ce cas, nous constatons la disparition des bandes électrophorétiques qui caractériseraient la CSA et l' α -La

Ces résultats suggèrent que le temps d'incubation de 4 heures fixé n'est pas suffisant pour une hydrolyse totale des protéines sériques.

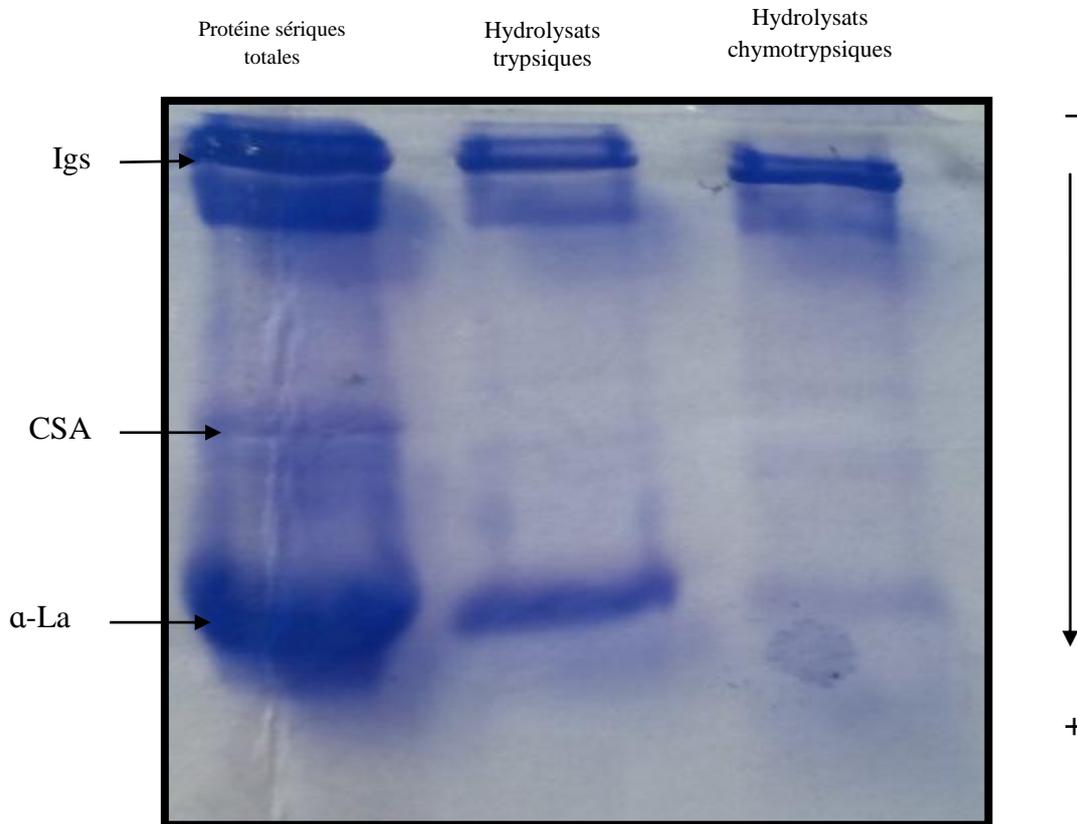


Figure 09: Contrôle électrophorétique en PAGE SDS de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques camelines ; gel de séparation (T= 17% ; C= 2,7% ; pH 8,8) ; gel de concentration (T= 4,8% ; C=2,7% ; pH 6,8)

Des résultats similaires ont été rapportés par SALAMI *et al* (2008) dans leur étude sur la caractérisation de la cinétique d'hydrolyse des protéines camelines et bovines par la trypsine et la chymotrypsine. Ils ont constaté pour les deux espèces, cameline et bovine, une hydrolyse faible et lente des protéines sériques. L'hydrolyse n'a été observée qu'après 6h d'incubation. Contrairement aux caséines, une hydrolyse rapide a été réalisée par les mêmes enzymes seulement après 3h d'incubation.

Dans cette étude comparative, il a été montré que les séroprotéines camelines sont plus résistantes à l'action des protéases que leurs homologues bovines. EL-AGAMY (2000) a rapporté que les protéines sériques camelines ont une grande stabilité thermique, il apparaît que cette propriété serait à l'origine de cette résistance.

Par ailleurs, ABDERRAHMANE *et al* (2015) ont réalisés une digestion enzymatique des protéines sériques camelines et bovines par la pepsine suivie d'un mélange trypsine-chymotrypsine. Ils ont constaté que les séroprotéines camelines ont une meilleure digestibilité avec un haut degré d'hydrolyse en les comparants aux protéines sériques bovines.

La structure des protéines influence leur digestibilité, ainsi les caséines dotées d'une structure ouverte et une grande flexibilité, sont plus digestibles que les protéines sériques de structure globulaire et compacte (SALAMI *et al*, 2008).

Quant à la différence de l'action des deux enzymes sur les protéines sériques, elle est attribuée d'après SALAMI *et al* (2008) aux nombres de sites de clivage des enzymes. Notant que l' α -lactalbumine, la protéine majeure du lait camelin, est faiblement hydrolysée par la trypsine mais intensément dégradée par la chymotrypsine car elle ne possède que 16 sites de clivage spécifique pour la trypsine contre 26 sites de clivage spécifique pour la chymotrypsine.

3.4. Résultats de l'activité antioxydante

3.4.1. Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+})

Par ce test, la capacité des protéines sériques et de leurs hydrolysats à transformer le fer ferrique en fer ferreux a été évalué. Ce mécanisme est connu comme étant un indicateur de l'activité donatrice d'électrons, caractéristique de la capacité antioxydante.

Le ferricyanure de potassium est réduit en ferrocyanure par des peptides antioxydants, ainsi la combinaison des ions ferriques avec le ferrocyanure conduit à la formation d'un complexe d'une couleur verte qui absorbe dans UV-visible à 700 nm. Il existe une relation proportionnelle entre les DO mesurées et l'activité antioxydante.

Le pouvoir réducteur du fer des séroprotéines camelines et de leurs hydrolysats est illustré par l'histogramme en figure (10).

L'analyse de l'histogramme révèle une différence dans la capacité des protéines sériques totales et leurs hydrolysats à réduire le fer.

Un haut pouvoir réducteur a été enregistré pour les hydrolysats chymotrypsiques, suivie des protéines sériques totales. Par contre une faible capacité réductrice a été constatée pour les hydrolysats trypsiques.

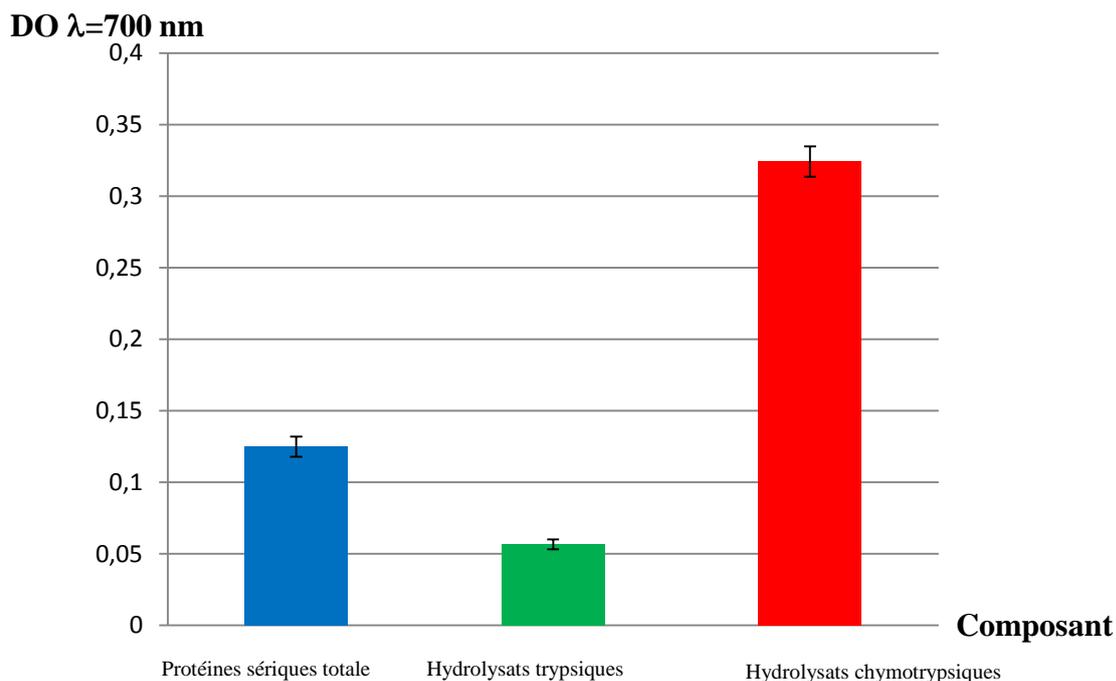


Figure 10: Histogramme illustrant le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) des protéines sériques et leurs hydrolysats.

Le milieu réactionnel des hydrolysats chymotrypsiques, après l'ajout de FeCl_3 , a montré une couleur intense indiquant la formation d'une quantité importante du complexe $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, ainsi la réduction d'une quantité appréciable du ferricyanure (Fe^{3+}) par les peptides.

Concernant les protéines sériques totales et leurs hydrolysats tryptiques, ils ont montrés une couleur plus claire, expliquant qu'une faible quantité de ferricyanure a été réduite (annexe 03).

WU et al (2003) ont montrés que les liaisons peptidiques, les acides aminés chargés et les groupements carboxyliques terminaux, participent généralement dans le mécanisme des réactions d'oxydoréductions. De plus GÜLÇİN (2007) a suggéré que la L-Trypsine est capable de transformer le Fe^{3+} en Fe^{2+} .

D'après les données de WU *et al* (2003) et GÜLÇİN (2007), la forte capacité réductrice des hydrolysats chymotrypsiques revient à la spécificité de cette enzyme de couper au niveau des extrémités C-terminal des résidus d'acides aminés, ainsi libération des groupements carboxyliques terminaux générant des peptides avec un haut pouvoir réducteur.

Le pouvoir réducteur du Fer peut être attribué à la composition en acides aminés des peptides libérés.

3.4.2. Pouvoir d'inhibition du radical DPPH

Les résultats obtenus à partir du test de DPPH appliqué sur les 3 échantillons, protéines sériques totales, hydrolysats trypsiques et les hydrolysats chymotrypsiques sont regroupés dans le tableau IV, où les valeurs sont exprimées en pourcentage (%) d'inhibition

Tableau IV : Le pouvoir d'inhibition (%) du radical DPPH.

Composant	E1	E2	E3	Moyenne
Protéines sériques totales	31,8	27	23	27,26±4.40
Hydrolysats trypsiques	32	36,4	39,2	35,86±3.62
Hydrolysats chymotrypsiques	43	43,4	44	43,46±0.5

E1, E2 et E3 représentent les 3 essais effectués

Les protéines sériques camelines et leurs hydrolysats possèdent une activité antioxydante, ils sont capables de piéger le radical DPPH. Cependant les hydrolysats montrent des pourcentages plus importants par rapport aux protéines sériques totales. L'amélioration de l'activité antioxydante des protéines sériques totales après hydrolyse pourrait être expliquée par l'exposition des résidus d'acides aminés qui possèdent des propriétés antioxydantes aux extrémités des peptides. Comme le montre les résultats de la présente étude, plus forte activité antioxydante par les hydrolysats chymotrypsiques avec un pourcentage d'inhibition du radical DPPH de 43,46% contre 35,86% pour les hydrolysats trypsiques.

La différence dans la capacité antioxydante entre les deux hydrolysats peut être attribuée aux nombres et aux niveaux des sites de clivage spécifiques pour chaque enzyme.

Dans ce cadre, l'étude de SALAMI *et al* (2010) s'est intéressée à l'évaluation de l'activité anti-oxydante des protéines camelines et bovines et leurs hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques en utilisant le radical ABTS. Dans cette étude, il a été rapporté que l'activité anti-oxydante des protéines camelines est plus forte que celle des protéines bovines et plus importante avec les hydrolysats chymotrypsiques.

La chymotrypsine clive spécifiquement au niveau des sites carboxyliques des résidus d'acides aminés aromatiques et hydrophobes, elle génère des peptides contenant des acides aminés avec des propriétés anti-oxydantes sur leur extrémité C-terminal (PIHLANTO, 2006). Contrairement à la trypsine qui coupe spécifiquement au niveau des acides aminés basiques Lys et Arg produisant des peptides avec de faibles propriétés anti-oxydantes (ANTAL *et al*, 2001).

L'analyse de la structure primaire des protéines camelines démontre que ces derniers sont riches en acides aminés qui suggérés avoir des propriétés anti-oxydantes (Phe, Trp, Ty, His, Cys, Glu, Asp, Lys, Arg) (SALAMI *et al*, 2010).

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

Il a été avancé par certaines études (SALAMI *et al*, 2010 ; ABDERRAHMANE *et al*, 2015) qu'une forte activité anti-oxydante est obtenue avec des peptides de faible PM de 5 et 10 KDa, suggérant ainsi que la capacité anti-oxydante dépend de la taille et de la composition des peptides (PENG *et al*, 2009).

MOSLEHISHAD *et al* (2013) ont constatés une capacité inhibitrice du radical ABTS des peptides purifiés à partir du lait camelin fermenté par *Lactobacillus rhamnosus*. Ils ont rapportés que la capacité antioxydante des peptides issus du lait camelin fermenté est plus importante que celle des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique par la trypsine et la papaïne.

Parallèlement aux études effectuées sur l'activité anti-oxydante des protéines sériques camelines, des travaux se sont également intéressés aux caséines de ce lait. Ces travaux (SALAMI *et al*, 2011 ; EL-HATMI *et al*, 2016 ; KUMAR *et al*, 2016) ont démontré que les propriétés anti-oxydante des protéines sont plus importante après hydrolyse enzymatique.

Conclusion

L'espèce cameline dont la particularité réside dans le fait qu'elle est capable, dans des conditions de sécheresse extrêmes et en manque de pâturage, de produire un lait de très bonne qualité qui pourrait être une source précieuse de nutriments pour l'homme.

En plus de son intérêt nutritionnel, le lait de chamelle est doté de plusieurs activités biologiques attribuées à sa particulière composante protéique.

Dans l'étude actuelle, l'activité anti-oxydante des protéines sériques camelines et des peptides dérivés de leur hydrolyse enzymatique, trypsique et chymotrypsique, a été mise en évidence.

Dans un premier temps, les protéines sériques camelines sont isolées par précipitation acide à pH 4,3 des caséines. Ensuite, une hydrolyse enzymatique par la trypsine et la chymotrypsine a été réalisée puis contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes en présence du SDS et de β -ME.

Le profil électrophorétique obtenu a montré que la sensibilité des protéines sériques camelines à l'hydrolyse enzymatique est plus importante pour la chymotrypsine par comparaison à la trypsine.

L'activité anti-oxydante, y compris la capacité réductrice du fer et le pouvoir du piégeage du radical DPPH, a été démontrée pour les protéines sériques totales ainsi que pour leurs hydrolysats particulièrement les hydrolysats obtenus par l'action de la chymotrypsine.

Ces résultats ont montré également que l'activité anti-oxydante des protéines sériques totales est améliorée après hydrolyse enzymatique.

Les peptides dérivés des protéines sériques camelines ont montré de bonnes propriétés anti-oxydantes, de ce fait, des utilisations comme agents antioxydants naturels pour la conservation des aliments ainsi que des applications médicales pourraient être envisagées.

Références bibliographiques

- **ABDERRAHMANE F., MEZMAZE F., CHEKROUN A., SAIDI DJ. and KHEROUA O. (2015).** In vitro digestibility of the dromedary whey proteins: potential uses in infant milk allergies. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2**(7), 115-120.
- **ABU-LEHIA I. H. (1989).** Physical and chemical characteristics of camel milk fat and its fractions. *Food Chemistry*, **34**, 261-271.
- **ABU-LEHIA I. H. (1994).** Recombined camel's powder. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- **ABU-TARBOUSH H. M. (1996).** Comparison of growth and proteolytic activity of yogourtstarters in whole milk from camels and cows. *Journal of Dairy Science*, **79**, 366-371.
- **ABU-TARBOUSH H. M., AL-DAGAL M. M. and AL-ROYLI M. A. (1998).** Growth, viability and proteolytic activity of Bifidobacteria in whole camel milk. *Journal of Dairy Science*, **81**, 354-361.
- **ADOLDHIE Y. (2006).** Etude du fonctionnement du système lactoperoxydasique et validation de son effet inhibiteur vis-à-vis de flores du poisson. *Thèse Doctorat*. INPL. Lorraine.
- **AGRAWAL R. P., SWAMI S. C., BENIWAL R., KOCHAR D. K., SAHANI M. S., TUTEJA F. C. (2003).** Effect of camel milk on glycemic control, lipid profile and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomised prospective controlled cross over study. *Indian Journal of Animal Science*, **73**, 1105-1110
- **AHMED M. M. (1990).** The analysis and quality of camel milk. Index of the thesis accepted for higher degrees by the Universities of Great Britain and Ireland and the councils. *For National Academic Awards*, **38**, 1356.
- **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**, 463-469.
- **AL- HAJ O. A., HAMAD A. and AL KANHAL A. (2010).** Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, **20**, 811-821.
- **ANDERSON B. F., BAKER H. M., NORRIS G. E., RICE D.W. and BAKER E. N. (1989).** Structure of human lactoferrin: Crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **209**, 711-734.

- **ANDERSON M. (1981).** Inhibition of lipolysis in bovine milk by proteose-peptone. *Journal of Dairy Research*, **48**, 247-252.
- **ANTAL J., PAL G., ASBOTH B., BUZAS Z., PATTHY A. and GRAF L.N (2001).** Specificity assay of serine proteinases by reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of competing oligopeptide substrate library. *Analytical Biochemistry*, **288**, 156-167.
- **ATTIA H., KHEROUATOU N., NASRI M. and KHORCHANI T. (2000).** Characterization of the dromedary milk casein micelle and study of its changes during acidification. *Lait*, **80**, 503–515
- **ATTIA H., KHEROUATOU. N. and DHOUB A. (2001).** Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **26**, 263-270.
- **AZZA M. K., SALAMA O. A. and EL-SAIED K. M. (2007).** Changes in amino acids profile of camel milk protein during the early lactation. *International Journal of Dairy Science*, **2** (3), 226-234.
- **BARZEGAR A., YOUSEFI R., SHARIFZADEH A., DALGALARRONDO M., CHOBERT G. M., GANJALI M. R., NOROUZI P., EHSANI M. R., NIASARI-NASLAJI A., SABOURY A. A., HAERTLE T. and MOOSAVI-MOVAHEDI A. A. (2008).** Chaperone activities of bovine and camel caseins: Importance of their surface hydrophobicity in protection against alcohol dehydrogenase aggregation. *International Journal of Biological Macromolecules*, **42**, 392-399.
- **BEG O.U. (1986).** Characterization of camel milk whey proteins. *Thèse Doctorat*. Université de Karachi, Pakistan.
- **BEG O. U., BAHR-LINDSTRÖM H. V., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1984).** A small camel protein rich in cysteine / half cysteine. *Bioscience Reports*, **4**, 1065-1070.
- **BEG O. U., BAHR-LINDSTRÖM H. V., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1985).** The primary structure of α -Lactalbumin from camel milk. *European Journal of Biochemistry*, **147**, 233-239.
- **BEG O. U., BAHR-LINDSTRÖM H. V., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1986).** A camel milk whey protein rich in half-cysteine, primary structure, assessment of variations, international repeat pattern and relationships with neurophysin and other active peptides. *European Journal of biochemistry*, **159**, 195-201.

- **BEG O. U., BAHR-LINDSTRÖM H. V., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1987).** Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Febbs Letters*, **216**, 270-274.
- **BENKERROUM N. (2010).** Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in the food industry. A review, *International Journal of Dairy Technology*, **63**, 320-338.
- **BIRGENS H. S., HANSEN N. E. and KRISTENSEN L. O.(1983).** Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *British Journal of Hematology*, **54**, 383–391.
- **BOUDJNAH-HAROUN S. (2012).** Aptitude à la transformation du lait de chamelle en produit dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. *Thèse Doctorat*, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.
- **BOUGHELLOUTA H., CHOISET B. Y., RABESONAB H., CHOBERT B. J. M., HAERTLEB T. and ZIDOUNEA M. N. (2015).** Lait camelin : nouvelle source de protéines pour enfants allergiques aux protéines du lait de vache ? *Revue Française d'Allergologie*, **840**, 1-5. . .
- **BUONOPANE G. J., KILARA A., SMITH J. S. and MCCARTHY R. D. (1992).** Effect of skim milk supplementation on blood cholesterol concentration, blood pressure, and triglycerides in a free-living human population. *Journal of American College of Nutrition*, **11**, 56-67.
- **BUSHMARINA N. A., BLANCHET C., VERNIER G. et FORGE V. (2005).** Repliement des protéines: exemple de l' α -Lactalbumine. *Journal de physique IV (proceedings)*. **130**, 209-228.
- **CALS M. M., MAILLIAR, P., BRIGNON G., ANGLADE P. and RIBADEAU DUMAS B. (1991).** Primary structure of bovine lactoperoxidase, a fourth member of a mammalian heme peroxidase family. *European Journal of Biochemistry*, **198**, 733-739.
- **CHAOUI-KHEROUATOU N. et ATTIA H. (2008).** Etude Comparative des Caseines Camelines (*Camelus dromedarius*) et Bovines. *Sciences & Technologie*, **28**, 73-79.
- **CHIBA H., TANI F. and YOSHIKAWA M. (1989).** Opioid antagonist peptides derived from k-casein. *Journal of Dairy Research*, **56**, 363-366.
- **CROUCH S. P., SLATER K. J. and FLETCHER J.(1992).** Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron binding protein lactoferrin. *Blood*, **80**, 235-240.

- **CURRY S., BRICK P. and FRANKS N. P. (1999).** Fatty acid binding to human serum albumin: New insights from crystallographic studies. *Biochemical and Biophysical Acta*, **1441**, 131–140. .
- **EL-AGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P. and ASSAF R. (1992).** Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *Journal of Dairy Research*, **59**,169-175.
- **EL-AGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMAGNE C. P and ASSAF R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel milk. *International Dairy Journal*, **6**,129-145.
- **EL-AGAMY E. I., ABOU-SHLOUE Z. I. and ABDEL-KADER Y. I. (1998).** Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, **43**, 57-70.
- **EL-AGAMY E.I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk. *Food Chemistry*, **68**, 227-232.
- **EL-AGAMY, E. I. (2006).** Camel milk; in Park Y.W. and Haenlein F.W.ed. Handbook of non-bovine mammals Iowa, NJ, USA: Blackwell Publisher Professional.
- **EL-AGAMY E.I., NAWAR M.A., SHAMSIA S.M., AWAD S. and HAENLEIN G. (2009).** Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children. *Small Ruminant Research*, **82**, 1-6.
- **EL-HATMI H., LEVIEUX A. and LEVIEUX D. (2006),** Camel (*Camelus dromedarius*) immunoglobulin G, α -lactalbumin, serum albumin and lactoferrin in colostrum and milk during the early post partum period. *Journal of Dairy Research*. **73**, 288-293.
- **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 Hygiene Alimentaire*. **53**(18), 70-76.
- **EL-HATMI H., GIRARDET J. M, GAILLARD J. L., YAHYAOUI M. H. and ATTIAH. (2007).** Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, **70**, 267–271
- **EL-HATMI H., JRAD Z., KHORCHANI T., JARDIN J., POIRSON C., PERRIN C., CAKIER-KEIFER 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.

- **EL-NAGGAR M. A. (1998)**. The camel is the goal animal in arid zones and dry lands for the coming 21st century. Presented at Third Annual Meeting for Animal Production under Arid Conditions (Camel Production and Future Perspectives), 2-3 May, AI-Ain, UAE.
- **ELAMIN F. M. and WILCOX C. J. (1992)**. Milk composition of Majaheim camels. *Journal of Dairy Science*, **75**, 3155-3157.
- **ELASS-ROCHARD E., ROSEANU A., LEGRAND D., TRIF M., SALMON V., MOTAS C., MONTREUIL J. And SPIK G.(1995)**. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: Involvement of the 28-34-loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to *Escherichia coli* 055B5 lipopolysaccharide. *Biochemical Journal*, **312**,839-845..
- **ELIAS R. J., MCCLEMENTS D. J. and DECKER E. A. (2005)**. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **53**, 10248–10253.
- **ELLOUZ S and KAMOUN N. (1989)**. Evaluation de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de la lactation. *Options Méditerranéennes-Série Séminaires*. **6**, 307-311.
- **FARAG S. I. and KABARY K. M. (1992)**. Chemical composition and physical properties of camel's milk and milk fat; in «*Proceedings of the 5th Egyptian Conference on Dairy Science and Technology*». Cairo, Egypt.
- **FARAH Z. (1993)**. Composition and characteristics of camel milk: review article. *Journal of Dairy Research*, **60**, 603–26.
- **FARAH Z. (1996)**. Camel milk properties and products. Centre for Development Cooperation in Technology and Management, Switzerland, Swiss.
- **Farah Z. and FARAH- RIESEN M. (1985)**. Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, **40**, 669-671.
- **FARAH Z. and RÜEGG M. W. (1989)**. The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, **8**, 211-116.
- **FARAH Z. and RÜEGG M. W. (1991)**. The creaming properties and size distribution of Fat globules in camel milk. *Journal of Dairy Science*, **74**, 2901-2904.

- **FARAH Z., STREIFF T. and BACHMAN M. R. (1989).** Manufacture and characterization of camel milk butter. *Milchwissenschaft*, **44**, 412- 416.
- **FARAH Z., STREIFF T. and BACHMAN M. R. (1990).** Preparation and consumer acceptability tests of fermented camel milk in Kenya. *Journal of Dairy Research*, **57**, 281-283.
- **FARAH Z., RETTENMAIER R. and ATKINS D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research*, **62**, 30-33.
- **FAYE B., KONUSPAYEVA G., MESSAD. S., LOISEAU .G. (2008).** Discriminant milk components of bactrian camel (*Camelus bactrianus*), dromedary (*Camelus dromedarius*) and hybrids. *Dairy Science and Technology*. **88**, 607-617.
- **FIOCCHI A., BROZEK J., SCHUNEMANN H. (2010).** World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. *World Allergy Organ Journal*, **04**, 57-161.
- **FLOWER D. R. (1996).** The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochemical Journal*, **318**, 1-14.
- **FURMANSKI H. E. J. P. (1995).** Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. *Nature*, **373**, 721-724.
- **GIRARDET J. M. and LINDEN G. (1996).** PP3 component of bovine milk: a phosphorylated whey glycoprotein. *Journal of Dairy Research*, **63**, 333-350.
- **GIRARDET, J. M., SAULNIER, F., GAILLARD, J. L., RAMET, J. P. and HUMBERT, G. (2000).** Camel (*Camelus dromedarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochimie et biologie cellulaire*, **78**, 19-26
- **GODOVAC-ZIMMERMANN J. (1988).** The structural motif of α -lactoglobulin and retinol binding protein: A basic framework for binding and transport of small molecules? *Trends Biochemical Science*, **13**, 64-66.
- **GÜLÇİN İ (2007).** Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of l-tyrosine and l-Dopa. *Amino Acids* **32**, 431-438.
- **HADDADIN M.S., GAMMOH S. I. and ROBINSON R.K. (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, **75**, 8-12.
- **HAMBLING S.G., MCALPINE A.S. and SAWYER L. (1992).** α -Lactoglobulin; in «*Advanced Dairy Chemistry-1: Proteins*» Fox P. F. ed. Elsevier Science, New York.

- **HAMERS-CASTERMAN C., ATARHOUCHE T., MUYLDERMANS S., ROBINSON G., HAMERS C., SONGA E.B., et al. (1993).** Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, **363**,446-48
- **HEINE W.E., KLEIN P.D. and REEDS P.J. (1991).** The importance of a-Lactalbumin in infant. *Nutrition* 1. *Journal of Nutrition*, **121**, 277–283.
- **HERNANDEZ-LEDESMA B., MIRALLES B., AMIGO L., RAMOS M. and RECIO I. (2005).** Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, **85**, 1041-1048.
- **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**,185–91.
- **HOLT L.J., HERRING C., JESPERSEN L.S., WOOLVEN B.P. and TOMLINSON I.M.(2003).** Domain antibodies: proteins for therapy. *Trends in Biotechnology*, **21**, 484-490.
- **HOMAYOUNI-TABRIZI M., SHABESTARIN H., ASOODEH A. and SOLTANIM.(2015).** Identification of two novel antioxidant peptides from camel milk using digestive Proteases: Impact on expression gene of Superoxide Dismutase (SOD) hepatocellular carcinoma cell line. *International Journal of Peptide Research*.
- **INDRA R. (2003).** Temet (Bactrian camel from Mongolia). Oulaan-Bator, Mongolia: Mongolian State University of Agriculture.
- **INNOCENTE N., COMPARIN D. and CORRADINI C. (2002).** Proteose-peptone Whey fraction as emulsified in ice-cream preparation. *International Dairy Journal*, **12**, 69-74.
- **JOHNSON E. A., SIM J. S. and NAKAI S. (1994).** Egg White Lysozyme as a Preservative for Use in Foods, in, *Egg Uses and Processing Technologies—New Developments* .ed. CAB International, Wallingford.
- **KAMOUN M. (1990).** La production de fromage à partir du lait de dromadaire. *Options Méditerranéennes*, **12**, 119-124.
- **KAMOUN M.(1994).** Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. Actes du Colloque, 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie
- **KAMOUN M. (1995).** Le lait de dromadaire : production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. *Options Méditerranéennes*, **13**, 81-103.
- **KAPPELER S. (1998).** Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph. D. thesis. Swiss Federal Institute of Technology. Zurich, Switzerland.

- **KAPPELER S., FARAH Z. and PUHAN Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, **65**, 209-222.
- **KAPPELER S., ACKERMANN M., FARAH Z and PUHAN Z.(1999).**Sequence analysis of *Camelus dromedarius* lactoferrin. *International Dairy Journal*, **9**,481–486.
- **KAPPELER, S.R., FARAH, Z. and PUHAN, Z. (1999b).** Alternative splicing of lactophorin mRNA from lactating mammary gland of the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Dairy Science*, **82**, 2084-2093.
- **KAPPELER S., HEUBERGER C., FARAH Z. and PUHAN Z. (2004).** Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, **87** (8), 2660-2668.
- **KARRAY N., LOPEZ C., OLLIVON M., and ATTIA H. (2005).** La matière grasse du lait de dromadaire: composition, microstructure et polymorphisme. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12(5-6), 439-446.
- **KARUE C. N. (1998).** The dairy characteristics of the Kenyan camel. Actes du colloque. *Dromadaires et chameaux*, animaux laitiers. Nouakchott, Mauritanie.
- **KATZ Y., GOLDBERG M. R., ZADIK-MNUHIN G., LESHNO M. and HEYMAN E. (2008).** Cross-sensitization between milk proteins: reactivity to a Kosher epitope? *Israel Medical Association Journal*, **10**, 85–8.
- **KATZ Y., RAJUAN N. and GOLDBERG M .R. (2010).** Early exposure to cow's milk protein is protective against IgE-mediated cow's milk protein allergy. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, **126**(1),77–82.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.04.020>.
- **KESTER J. J. and BRUNNER J. R. (1982).** Milk-fat globule membrane as possible origin of proteose-peptone glycoprotein. *Journal of Dairy Science*, **65**, 2241-2252.
- **KHAN B. B. and IQBAL A. (2001).** Production and composition of camel milk: A review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, **38**, 64-68.
- **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*, **1**(2), 164-166.
- **KOLOZSI A., JANCZO A., NAGY N. V. and GAJDA T. (2009).**N-terminal fragment of the anti-angiogenic human endostatin binds copper (II) with very high affinity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **103**, 940-947.

- **KONUSPAYEVA G., LOISEAU G. and FAYEB B. (2004).**La plus-value « santé » du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience du Kazakhstan : *Rencontre Recherche Ruminants*, **11**, 47-50.
- **KONUSPAYEVA G., 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**, 95-101.
- **KORHONEN, H. (1977).** Antimicrobial factors in bovine colostrum. *Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland*, **49**, 434–447.
- **KUMAR D., KUMAR P., MEHTA N., CHATLI M.K. and SINGH R.(2016).**Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science and Technology*.
- **LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. and MOHAMED M.A. (1986).** Analysis of the casein content in camel (*camelusdromedarius*) milks. *Swedish Journal of Agricultural Research*, **16**, 13-18.
- **LAUWEREYS M., GHAHROUDI M. A., DESMYTER A., KINNE J, HOLZER W., GENST ED., WYNS L. and MUYLDERMANS S. (1998).** Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO Journal*,**17**, 3512-3520.
- **LEONIL J., MARCHIN S., GWENAELLE H., DIANE J. and PUTAUX J.L. (2007).** La caséineκ : quel rôle dans la structuration de la micelle des caséines ? Colloque société française des microscopies, Grenoble, 5-8, juin, France.
- **LEVIEUX D. and OLLIER A. (1999).** Bovine immunoglobulin G,β- lactoglobulin, α-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post-partumperiod. *Journal Dairy Research*, **66**, 421–430.
- **LI H. and PAPADOPOULOS V. (1998).** Peripheral-type benzodiazepine receptor function in cholesterol transport. Identification of a putative cholesterol recognition interaction amino acid sequence and consensus pattern. *Endocrinology*, **139**,4991-4997.
- **LIEN E. L. (2003).** Infant formulas with increased concentrations of a-lactalbumin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **77**, 1555S–1558S.
- **LOISEAU G., FAYE B., SERIKBAEVA A. and MONTET D. (2001).** Enzymes ability to serve as markers of pasteurized camel milk. International Conference. On new horizons in biotechnology, 18- 21 avril 2001, Trivandrum, Inde.

- **MARTIN F., VOLPARI C., STEINKUHLER C. and DIMAS N. (1997).** Affinity selection of acamelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3protease. *Protein Engineering*, **10**, 607-614.
- **MATI A. (1992).** Les protéose-peptones dans les laits bovin, ovin et caprin: isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction à caractère hydrophobe contenant le composant-3. *Thèse Doctorat*, Université de Nancy I.
- **MEHAIA M. A. (1993a).** Fresh soft white cheese (Domiaty type) from camel milk; composition, yield and sensory evaluation. *Journal of Dairy Science*, **6**, 2845-2855.
- **MEHAIA M. A. (1993b).** Composition, yield and organoleptic evaluation of the fresh Domiatycheese made from a mixture of camel and cow Milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, **48**, 74-77.
- **MEHAIA M. A. (1994).** Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heattreatments. *Food Chemistry*, **50**, 153-155.
- **MEHAIA M. A., HABLAS M. A., ABDEL-RAHMAN K. M. and EL-MOUGY S. A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia, *Food Chemistry*, **52**(2), 115-122.
- **MEISEL, H. (2004).** Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *Biofactors*, **21**, 55-61.
- **MERIN U., BERNSTEIN S., BLOCH-DAMTI A., YAGIL R., VAN CREVELD C. And LIND-NER P. (2001).** A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelusdromedarius*) and bovine colostrum. *Livest Production Science*, **67**, 297-301.
- **MESSER M. and ELLIOT C. (1987).** Changes in α -lactalbumin, total lactose, UDP-galactose hydrolase and other factors in tammar wallaby (*Macropuseugenii*) milk during lactation. *Australian Journal of Biology Science*, **40**, 37-46.
- **MOHAMED M. A., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. and MOHAMUD M. A. (1990).** Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, **45**, 716-718.
- **MOHAMAD R. H., ZEKRY Z. K., AL-MEHDAR H. A., SALAMA O., EL-SHAIEB S. E., EL-BASMY A. A., AL-SAID M. G., SHARAWY S. M. 2009.** Camel milk as an adjuvant therapy for the treatment of type 1 diabetes: verification of a traditional ethnomedical practice. *Journal of Medicine and Food*, **12**(2), 461-465.
- **MOORE S. A., ANDERSON B. F., GROOM C. R., HARID S. M. and BAKER E. N. (1997).** Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **274**, 222-236.

- **NG W. C., BRUNNEUR J. R. And RHEE K. C. (1970).** Proteose –peptone fraction of bovine milk: lacteum serum component 3. A whey glycoprotein. *Journal of Dairy Science*, **53**, 987-1007.
- **OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISSET Y. and HAERTLE T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian Yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, **77**, 601-613.
- **OCHIRKHUYAG B., DALGALARRONDO M., CHOBERT J. M., CHOISSET Y. and HAERTLE T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, **22**, 105–124.
- **OMER R. H. and ELTINAY A. H. (2009).** Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8**, 607–610.
- **OYAIZU M. (1988).** Antioxydative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin- layer chromatography. *Nippon ShokuhimKogyo Gakkaishi*, **35**, 771-775.
- **PAQUET D. and ALAIS C. (1982).** Purification et quelques caractéristiques moléculaires du "composant 3" des protéoses peptones. *Lait*, **62**, 338-349.
- **PAQUET D., NEJJAR Y. and ALAIS C. (1985).** Electrophoretic and chromatographic behavior of proteose peptone fraction of cow's milk. *Milchwissenschaft*, **40**, 200-203.
- **PELLEGRINI A., THOMAS U., BRAMAZ N., HUNZIKER P. and VON FELLEBERG R. (1999).** Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine α -lactalbumin molecule. *Biochemical and Biophysical Acta*, **1426**, 43-48.
- **PENG X., XIONG Y. L. and KONG B. (2009).** Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, **113**, 196-201.
- **PESCUMA M., HEBERT E. M., RABESONA H., DROUET M., CHOISSET Y., HAERTLE T., MOZZI F., FONT D.E VALDEZ G. and CHOBERT J. M. (2011).** Proteolytic action of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 656 reduces antigenic response to bovine lactoglobulin. *Food Chemistry*, **127**, 487-492.
- **PHADUNGATH G. (2005).** Casein micelle structure: SongKlanaKarin. *Journal of Science and Technology*, **27**(1), 201-212.
- **PIHLANTO A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, **16**, 1306-1314.

- **QUINLAN G. J., MARTIN G. S. and EVANS T. W. (2005).** Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, **41**, 1211–1219.
- **RAMET J.P. (1993).** La technologie des fromages au lait de dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude F.A.O., *Production et santé animale*, 113.
- **RIVAL S. G., BOERIU C. G. and WICHERS H. J. (2001).**Caseins and casein hydrolysates. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 295-302.
- **SAITMURATOVA K.H., SULAIMANOVA G. I. and SADYKOV A. A. (2001).** Camel's milk and shubat from the aralregion. *Chemistry of Natural Compounds*, **37(6)**,566-568.
- **SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M. R., DALGALARRONDO M., CHOBERT J. M., HAERTLE 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**, 1097-1102.
- **SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M. R., RAZAVI S. H., CHOBERT J. M., SABOURY A. A., ATRI M. S., NIASARI-NASLAJI A., AHMED F. and MOOSAVI- MOVAHEDI A. A. (2009).** Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel a-lactalbumin: Possible significance for use in infant formula. *International Dairy Journal*, **19**, 518-523.
- **SALAMI M., MOOSAVI_MOVAHEDI A. A., EHSANI M. R., YOUSEFI R., HEARTLE T., CHOBERT J. M., RAZAVI S. H., HENRICH R., BALALAIIE S., EBADI S.A., POUTAKDOOST S. and NIASARI-NASLAJI A.(2010).**Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **58**, 3297-3302.
- **SALAMI M., MOOSAVI-MOVAHEDI A. A., MOOSAVI-MOVAHEDI F., EHSANI M. R., YOUSEFI R., FARHADI M., NIASARI-NASLAJI A., SABOURY A. A., CHOBERT J. M and. HAERTLÉ T. (2011) .**Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research*, **78**, 471-478.
- **SAMPSON H.A. (2004).** Update on food allergy. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, **113**, 805–19.
- **SANCHEZ L., CALVO M. and BROCK J. H. (1992).** Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*, **67**, 657-661.

- **SAWAYA W. N., KHALIL J. K., AL-SHALHAT A. and AL-MOHAMED H. (1984).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science*, **49**, 744-747.
- **SCHMIDT D. G. (1982).** Association of caseins and casein micelle structure; in « Developments in Dairy Chemistry». Fox P.F. ed. Applied Science Publishers, London.
- **SCHMIDT D. G., MEIJER R. J. G. M., SLANGEN C. J. and VAN BERESTEIJN E. C. H. (1995).** Raising the pH of the pepsin catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clinical and Experimental Allergy*, **25**, 1007-17.
- **SHARMA P., SINGH N., SINHA M., SHARMA S., PERBANDT M., BETZEL C., KAUR P., SRINIVASAN A., TEJ P., and SING H. (2008).** Crystal structure of the peptidoglycan recognition protein at 1,8°A resolution reveals dual strategy to combat infection through two independent functional homodimers. *Journal of Molecular Biology*, **378**(4), 923-932.
- **SHIN K., WAKABAYASHI H., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S., TAMURA Y., KUROKAWA M. and SHIRAKI, K. (2005).** Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *Journal of Medical Microbiology*, **54**(8), 717-723.
- **SHUIEP E. S., EL ZUBEIR I. E. M., EL OWNI, O. A. O. and MUSA. H. H. (2008).** Influence of season and management on composition of raw camel (*Camelus dromedarius*) milk in Khartoum state, Sudan. *Tropical and Subtropical Agro ecosystems*, **8**, 101-106.
- **SHUIEP E. S., GIAMBRA I. J., EL ZUBEIR I. E. M. and ERHARDT G. (2013).** Biochemical and molecular characterization of polymorphisms of α 1-casein in Sudanese camel (*Camelus dromedarius*) milk. *International Dairy Journal*, **28**, 88-93.
- **SIBOUKEUR O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physicochimiques et microbiologiques ; aptitude à la coagulation. *Thèse Doctorat*. INA El Harrach, Alger.
- **SI AHMED Z. S. (2015).** Isolement et séparation des protéines sériques du lait de chamelle : mise en évidence du phénomène de désamidation de l' α -Lactalbumine ; conséquence sur la stabilité structurale. *Thèse Doctorat*. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Alger.
- **SOLEYMANZADEH N., MIRDAMADI S. and KIANIRAD M. (2016).** Antioxidant activity of camel and bovine milk fermented by lactic acid bacteria

isolated from traditional fermented camel milk (Chal). *Dairy of Science and Technology*.

- **SØRENSEN E. S. and PETERSEN T. E. (1993).** Phosphorylation, glycosylation and amino acid sequence of component PP3 from the proteose-peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, **60**, 535-542.
- **STAHL T., SALLMANN H. P., DUEHLMEIER R. and WERNERY U. (2006).** Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrums. *Journal of Camel Practice and Research*, **13**, 53-57.
- **TAYLOR A. J., LEACH R. M., TUCKER G. A. and L. F. J. (1995).** Enzymes in the Food Industry, in, *Enzymes in Food Processing*. Woods. ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow. to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, **68**, 227-232.
- **UGUZ M. T. and OZDEMIR H. (2005).** Purification of bovine milk lactoperoxidase and investigation of antibacterial of different thiocyanates mediated. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **41**(4), 349-353.
- **WANGO J., FARAH H. and PUHAN Z. (1998).** Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, **53** (3), 136-139.
- **WEINBERG E. D. (1995).** Acquisition of iron and other nutrients in vivo. ed. Virulence mechanisms of bacterial pathogens, Washington.
- **WERNERY U., JOHNSON B. and ISHMAIL T. (2006).** Insulin content in raw dromedary milk and serum measured over one lactation period. *Journal of Camel Practice and Research*. **2**(13), 89-90.
- **WU H. C., SHIAU C. Y., CHEN H. M. and CHIOU T. Z. (2003).** Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *Journal of Food and Drug Analysis*, **11**(2), 148-153.
- **YAGIL R. (1982).** Camels and Camel Milk. FAO, Animal Production and Health, Paper N° **26**, 1-69.
- **YAMAUCHI K., TOMITA M., GIEHL T. J. and ELLISON R. T. (1993).** Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. *Infection and Immunity*, **61**(2), 719-728.
- **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**, 3402-3410.

- **ZHANG X., FU X., ZHANG H., LIU C., JIAO W. and CHANG Z. (2005).** Chaperone-like activity of β -casein. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,**37**, 1232-1240
- **ZHU L., CHEN J., TANG X. and XIONG Y. (2008).**Reducing, radical scavenging and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolyzates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2714-2721.

Annexes

Annexe 01 : préparation des tampons

- Tampon phosphate 50 mM pH 7.8

Composition en g/100 ml :

Phosphate monopotassique (KH_2PO_4) 0.68g

Phosphate dissodique (Na_2HPO_4) 0.70g

Dans un bécher introduire 0.68 de KH_2PO_4 et 0.70 g de Na_2HPO_4 avec un petit volume d'eau distillée.

Introduire le mélange dans une fiole jaugée de 100 ml, puis compléter au trait de jauge avec l'eau distillée.

- Tampon phosphate 0.2M pH 6.6

- KH_2PO_4 0.45g /50 ml

- Na_2HPO_4 0.29 g /25 ml

Mélanger 26.6 ml de KH_2PO_4 avec 23.4 ml de Na_2HPO_4 .

Annexe02 : Pouvoir réducteur

- Solution tampon phosphate 0.2 M pH 6.6
- Solution de ferricyanure de potassium (K_3FeCN) 1% (p/v).
- Solution de chlorure de fer (FeCl_3) 0.1 % (p/v).
- Trichloracétique (TCA) 10% (p/v).
- Eau distillée.
- Solution d'échantillon mère 2mg /ml

Mode opératoire :

Préparer 16mg /8ml pour chaque échantillon de : protéines sériques camelines, hydrolysats tryptiques et les hydrolysats chymotrypsiques.

Réaliser 3 essais pour chaque échantillon.

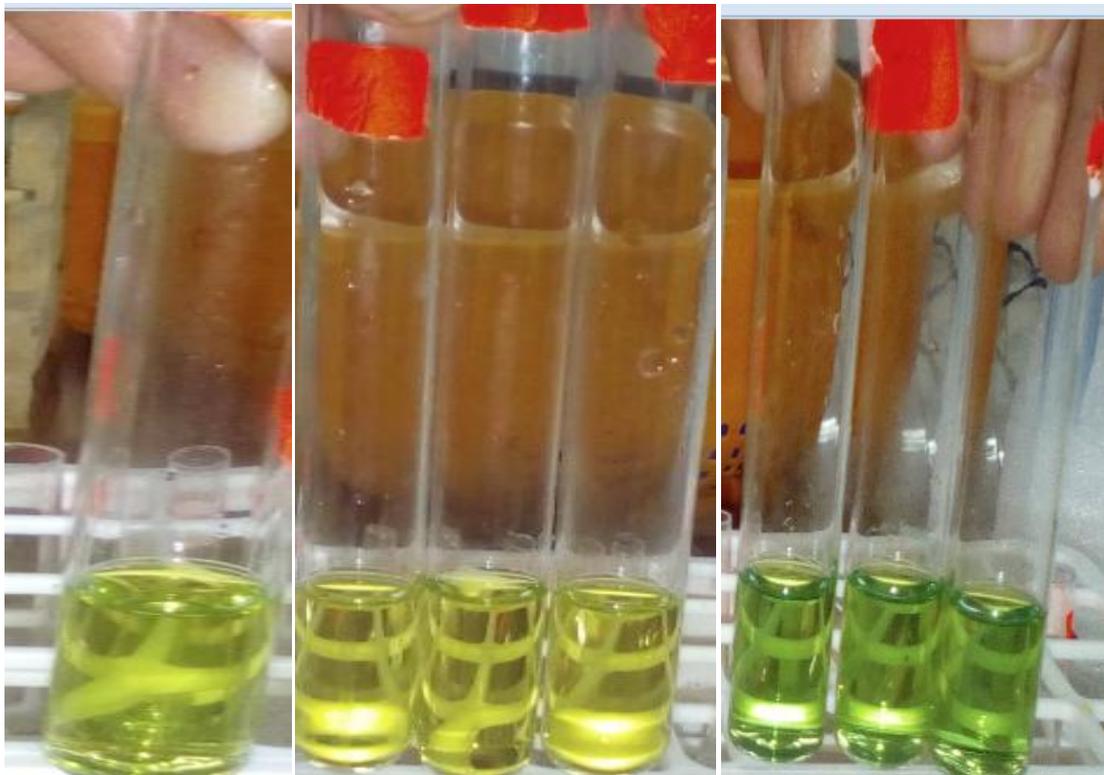
Dans un tube à hémolyse introduire :

- 1 ml d'échantillon
- 1 ml de tampon phosphate
- 1ml de ferricyanure de potassium, agiter.
- Incuber à 50°C/20min
- Ajouter 1ml de TCA pour arrêter la réaction.
- Centrifuger 5000g/10min
- Récupérer tout le surnageant.

Ajouter aux surnageant :

- 0.2 ml de chlorure de fer
- 1ml d'eau distillée
- Laisser 10 min
- Pour le calibrage de l'appareil, un blanc de la même composition excepté l'échantillon a été préparé.
- Mesurer l'absorbance à 700 nm.

Annexe 03 : Figure illustrant l'intensité de la couleur verte dans le milieu réactionnel des protéines sériques et leurs hydrolysats.



PST

H try

H chymo

Annexe 04 :L'hydrolyse enzymatique

- Solution de tampon phosphate 50mM pH 7.8.
- Solutions d'enzymes :

Prendre deux tubes eppendofs, introduire dans :

Le 1^{er} tube : 2mg de la chymotrypsine avec 1ml d'eau distillée, agité.

Le 2^{eme} tube : 2mg de la trypsine avec 1ml d'eau distillée.

- Solutions d'échantillons :

Prendre deux tubes à essai, dans chacun introduire :

200mg de protéines sériques lyophilisées

8 ml du tampon phosphate

Homogénéiser

Mode opératoire :

Prendre les tubes des échantillons, introduire dans l'un des deux 0.5 ml de la solution enzymatique trypsiques et 0.5 ml de la solution chymotrypsiques dans l'autre tube.

Incuber à 37°C, après 2 h de temps ajouter les 0.5ml des solutions enzymatiques. Laisser encore incuber pendant 2h.

Annexe 05 : électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et du 2-βmercaptoethanol (PAGE-SDS)

Solution d'acrylamide (A)

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

Tampon de gel de séparation (S)

- Tris 18.15g
- Eau distillée 100ml

Ajuster a pH 8.8 avec du HCL 4N

Tampon de gel de concentration (C)

- Tris 6g

- Eau distillée 100ml
- Ajuster a pH 6.8 avec du HCL 4N

Tampon d'électrode

- Tris 3g
 - Glycine 14.4g
 - SDS 0.5g
 - Eau distillée 500ml
- Ajuster a pH 8.3 avec du Tris

Tampon d'échantillon : SDS (4%), 2 ME (3%), glycérol (10%), Tris/HCL 50Mm , pH 6.8, bleu de bromophénol.

Dissoudre 1mg de l'échantillon dans 1ml de tampon d'échantillon, chauffage à 100°C pendant 4-5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide.

Solution de persulfate d'ammonium (10%)

Conduite d'électrophorèse

Préparation du gel de séparation : T=17% C=2.7%

Solution(A) 4.60ml

- Solution (A) 4.60ml
- Solution (S) 2.51ml
- Eau distillée 2.73ml

Dégazer pendant 2 min max

- SDS(10%) 100µl
- TEMED 50µl
- Persulfate d'ammonium 80µl

Couler a environ 2/3 de la plaque

Préparation du gel de concentration : T = 17% et C = 2.7 %.

- Solution A 650 µl
- Solution C 1250 µl
- Eau distillée 2900 µl

Dégazer

- Solution de SDS (10%) 100µl

- TEMED 50 μ L
- Persulfate d'ammonium (10%) 80 μ l

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

Solution de coloration : éthanol (30%), acide acétique (5%), bleu de Coomassie R250 (2%), eau distillée (65%).

Solution de décoloration : acide acétique (5%), eau distillée (65%), éthanol (30%).

Dépôt d'échantillon 10-20 μ l

Mise sous tension 20mA 250 V

Fixation : 45min dans la solution de fixation

Coloration : 1h dans la solution de coloration

Décoloration : plusieurs passages dans la solution de décoloration.