

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master type stage
Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME

**Les protéines sériques du lait à effet antibactérien ;
caractéristiques, mode d'action et comparaison inter-espèces**

Travail réalisé par :

M^{elle} MEHDI Fatima

M^{elle} NAIT ABDELAZIZ Amal

Présenté le : 20 /09 / 2017

Devant le jury :

Président	: M ^{me} SENANI- OULARBI N.	(Maitre assistante à l'UMMTO)
Promoteur	: M ^{me} SENOUSI-GHEZALI C.	(Maitre assistante à l'UMMTO)
Examineurs :	M ^{me} ALMI- SEBBANE D.	(Maitre assistante à l'UMMTO)
	M ^{me} BEDOUHENE- FENANE S.	(Maitre assistante à l'UMMTO)

Avant propos

Le mémoire de master ainsi présenté a consisté en un stage pratique bloqué réalisé au laboratoire de Biochimie de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO, pour lesquels les responsables des formations suivantes :

- Master de Biochimie Appliquée ;
- Master de Biochimie de la Nutrition,

en concertation avec les responsables du département de Biochimie-Microbiologie de la faculté, ont arrêté des dispositions communes quant à la présentation finale du mémoire, tenant compte des objectifs attendus pour sa réalisation, tant les volets liés à la recherche bibliographique et la rédaction de synthèses appropriées ainsi qu'aux diverses manipulations pratiques qui ont été centrés sur le contrôle et l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

De ce fait, ce mémoire comporte deux parties à parts égales :

- une synthèse des données bibliographiques sur le thème suivant :
Les protéines sériques à effet antibactérien ; caractérisation, mode d'action et comparaison inter-espèces.
- une partie pratique liée au contrôle et à l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu le dieu le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la volonté afin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre promotrice Mme **SENOUSSI-GHEZALI** Chahra, maitre assistante à l'université Mouloud **MAMMERRI** de Tizi-ouzou pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de son élaboration.*

*Nous remercions vont à Mme **SENANI- OULARBI N.**, Maitre assistante à l'**UMMTO**, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Nous somme reconnaissantes à Mme **ALMI- SEBBANE D.**, Maitre assistante à l'**UMMTO** et à Mme **BEDOUHENE- FENANE S.**, Maitre assistante à l'**UMMTO**, d'avoir accepté de siéger dans ce jury et d'avoir consacré une partie de leur temps à examiner ce travail.*

*Nous tenons à remercier également toute l'équipe du laboratoire **LABAB**, et à tout ceux qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- ❖ *A mes précieux parents Ibrahim et Nouara pour leur exprimer tout le respect et l'amour que j'ai pour eux et pour leur témoigner ma reconnaissance pour tout les efforts et sacrifices qu'ils ont entrepris à mon égard ;*
- ❖ *A mes chers sœurs Dalila, Saliha et Meriem, ainsi que leurs maris et leurs enfants ;*
- ❖ *A mon frère Tarik, sa femme Dalila et leurs enfants ;*
- ❖ *A mes cousines Zohra et Hania ainsi que toute la famille NAIT ABDELAZIZ ;*
- ❖ *A mes très chers ami(e)s ;*
- ❖ *A toute la promotion biochimie appliquée ;*
- ❖ *A tous les enseignants qui m'ont encadré durant toute la période passée de mon cursus universitaire*

Je dédie mon travail

NAIT ABDELAZIZ Amal

Dédicaces

*Je dédie ce travail à ma chère mère pour son amour et son sacrifice
tout au long de mes études*

Je le dédie à mon cher et regretté père

Je le dédie à mes chères frères et sœurs

Je le dédie à ma famille et mes amies

MEHDI Fatima

Liste des abréviations

α -La	α Lactalbumine
BSA	Albumine Sérique Bovine
β -Lg	β Lactoglobuline
CN α S1/ α S2	Caséine α S1/ α S2
CN β	Caséine β
CN κ	Caséine κ
Cp	Centipoise
C-t	C-terminale
GMP	Glycomacropéptide
GMPg	Glycomacropéptide hautement glycosylé
LF	Lactoferrine
LP	Lactoperoxydase
LPS	Lactoperoxydase enzyme system
LPSs	Lipopolysaccharides
LV	Lait de vache
LZ	Lysozyme
NADHP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite
N-t	N-terminale
OSCN ⁻	L'hypothiocyanite
PAGE	Polyacrylamid Page Electrophoresis
R ²	Coefficient de corrélation
SCN ⁻	L'anion thiocyanate
SDS	Dodécylsulfate de sodium
SH	Les groupements thiols
Si	Simulation
spp	Toutes les espèces (ensemble du genre)
TN	Témoin négatif
UHT	Ultra Haute Température

Liste des tableaux

N°	Titres	Pages
I	Propriétés physico-chimiques du lait de quelques espèces animales	02
II	Composition du lait bovin, ovin, caprin et humain en nutriments de base	04
III	Tableau récapitulatif des concentrations en vitamines et en sels minéraux du lait de vache	05
IV	Tableau récapitulatif de quelques paramètres physico-chimiques des principales caséines bovines	08
V	Caractéristiques physico-chimiques des protéines de lactosérum du lait bovin	11
VI	Protéines mineures identifiées dans le lactosérum bovin	12
VII	Caractéristiques physico-chimiques de la lactoferrine bovine et cameline	14
VIII	Effet du LPS sur les bactéries les plus répandus du lait	17
IX	Propriétés antibactériennes de quelques protéines sériques du lait et leurs mécanismes d'action	23
X	Principales propriétés physico-chimique du LZ du lait de différentes espèces de mammifères	23
XI	Concentration des protéines sériques antibactériennes dans le lait de quelques espèces animales	24
XII	Peptides antibactériens issus des protéines sériques du lait	30
XIII	Peptides antibactériens issus des caséines générés sous l'action des protéases digestives	31
XIV	Résultats d'analyse biochimique des échantillons de lait	40

Liste des figures

N°	Titres	Pages
1	Représentation de la structure micellaire des caséines bovines selon le modèle de SCHMIDT (1980)	07
2	Structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline bovine obtenue par diffraction aux rayons X	09
3	Structure tridimensionnelle de l' α -lactalbumine bovine en présence d'ion Ca^{2+} obtenue par diffraction aux rayons X	10
4	Structure tridimensionnelle d'une lactoferrine saturée en fer	13
5	Structure moléculaire de la lactoperoxydase	15
6	Schéma d'une molécule d'immunoglobuline	18
7	Distribution relative des IgA, IgM et IgG dans le colostrum et dans le lait de cinq différentes espèces	20
8	Structure tridimensionnelle du lysozyme du lait bovin montrant la prédominance des hélices α	21
9	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry. L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisé comme protéine étalon	33
10	Courbe étalon du dosage de lactose réalisé avec une solution de lactose comme référence.	33
11	Etapas suivies pour l'isolement des caséines et des protéines sériques du lait	35
12	Etapas suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines (protéines sériques et caséines) par la trypsine	39
13	Profil électrophorétique d'une PAGE-NATIVE des fractions éluées issues de la chromatographie de perméation des protéines sériques bovines	42
14	Electrophorégramme en PAGE-SDS des protéines sériques bovines après traitement enzymatique par la trypsine	44
15	Electrophorégramme en PAGE-SDS des caséines bovines après traitement enzymatique par la trypsine	45



Sommaire

Sommaire

Pages

Résumé

Introduction générale	01
------------------------------------	-----------

1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Généralités sur le lait	02
1.1.1. Caractéristiques organoleptiques	02
1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques	02
1.1.3. Composition biochimiques	03
1.2. Caractéristiques des protéines du lait	06
1.2.1. Caséines.....	06
1.2.2. Protéines sériques	08
1.3. Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien	13
1.3.1. Les Protéines sériques à effet antibactérien.....	13
1.3.1.1. La lactoferrine	13
1.3.1.2. La lactoperoxydase	15
1.3.1.3. Les immunoglobulines	18
1.3.1.4. Le lysozyme	21
1.3.1.5. Autres protéines sériques à effet antibactérien	26
1.3.2. Les peptides du lait à effet antibactérien.....	27
1.3.2.1. Les peptides issus des protéines sériques.....	28
1.3.2.2. Les peptides issus des caséines	29

Conclusion	33
-------------------------	-----------

2. Stage pratique

2.1. Matériel et méthodes	34
2.1.1. Matériel	34
2.1.2. Méthodes	35
2.1.2.1. Détermination de la qualité physico-chimique du lait de vache	35
2.1.2.1.1. Détermination de la teneur en protéines	35
2.1.2.1.2. Détermination de la teneur en lactose	35
2.1.2.1.3. Détermination de la teneur en vitamine C	37
2.1.2.2. Isolement des protéines du lait de vache	37



Introduction

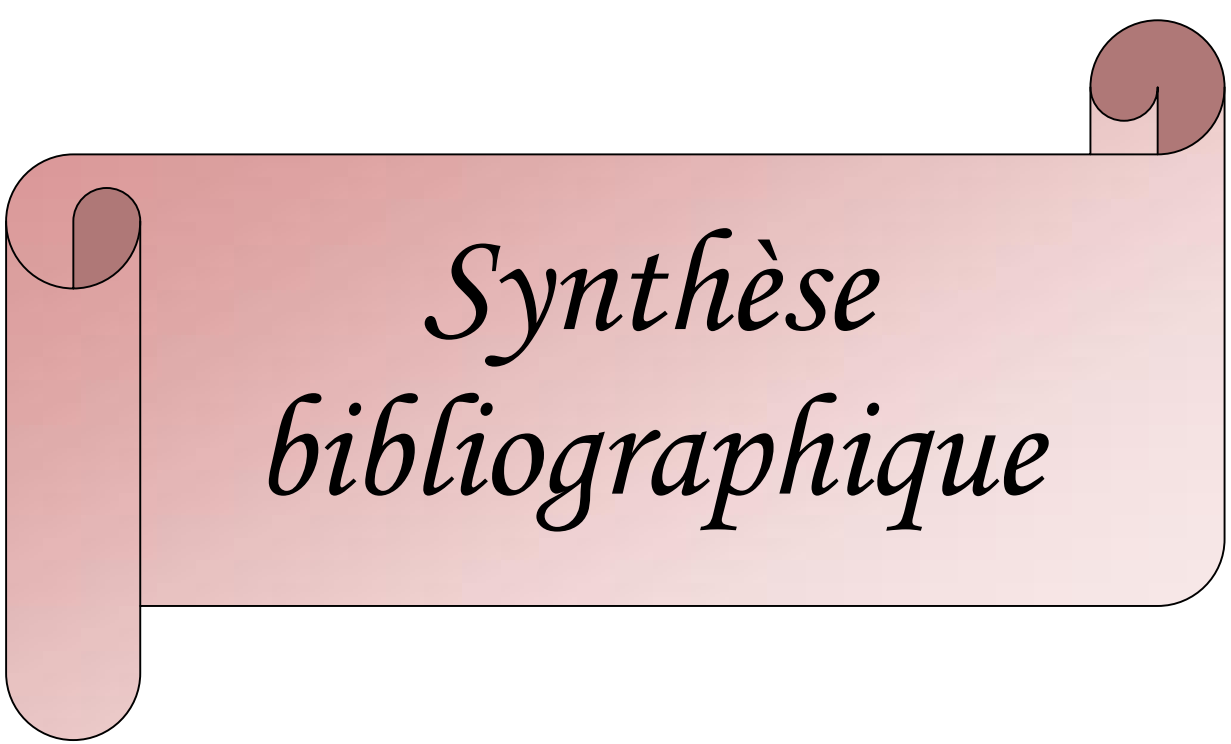
Introduction générale

Le lait est un aliment hautement nutritif, il contient des quantités équilibrées en différents nutriments : protéines, glucides, lipides, vitamines et minéraux. La fraction protéique du lait de différentes espèces animales est composée de deux grands groupes majeurs de protéines : les protéines sériques qui représentent environ 20% des protéines totales du lait de vache, tandis que les caséines représentent la plus grande part.

Le lait gagne plus en plus d'intérêt pour la nutrition humaine en raison de ses nombreux avantages liés à la santé ; il démontre une activité antibactérienne envers une large gamme de bactéries Gram-positives et Gram négatives, stimule le système immunitaire, régule la flore gastro-intestinale et prévient les maladies inflammatoires et auto-immunes. L'activité antibactérienne du lait est attribuée à quelques protéines tels que : lactoferrine, lysozyme, immunoglobuline et lactoperoxydase, ainsi qu'aux peptides bioactifs qui sont libérés des différentes protéines laitières soit après digestion gastro-intestinale du lait, soit après fermentation du lait ou par hydrolyse avec des enzymes protéolytiques.

La présente étude vise pour objectif l'étude bibliographique des différentes protéines sériques à effet antibactérien dans différentes espèces laitières en élucidant leurs caractéristiques ainsi que leurs modes d'action.

La deuxième partie du travail consiste en un stage pratique dans lequel certains paramètres physico-chimiques du lait ont été déterminés, ainsi que des essais de purification et de caractérisation des protéines sériques ont été effectués.



*Synthèse
bibliographique*

1. Synthèse des données bibliographiques

1.1. Généralités sur le lait

Le lait est défini comme étant le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum (Congrès international de la répression des fraudes alimentaires, Genève, 1908).

1.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait est un liquide opaque blanc, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en β -carotène et en matière grasse. Sa saveur est douce et son odeur est faible. Le lait camelin est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois salé (ABDEL-RAHIM, 1987)

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait bovin est légèrement acide, son pH varie de 6,65 à 6,71. Son point de congélation peut varier de -0,530 à -0,570°C (PARK *et al*, 2007). Le point d'ébullition du lait est de 100,5°C (GHAOUES, 2011). Les fluctuations qui existent dans les valeurs des constantes physico-chimiques rapportées par différents auteurs sont liées aux teneurs variables des différents composants de ce lait (MEHAIA *et al*, 1995). Elles mêmes dépendantes des facteurs : la période de lactation, la traite, l'allaitement ou la nature de l'alimentation des animaux (OUADGHIRI, 2009).

Tableau I : Propriétés physico-chimiques du lait de quelques espèces animales (PARK *et al*, 2007).

Espèce Propriétés	Lait bovin	Lait ovin	Lait caprin	Lait camelin
Densité	1,0231–1,0398	1,0347–1,0384	1,029–1,039	0,99-1,034 ^(a)
Viscosité (Cp)	2,0	2,86–3,93	2,12	2,2 ^(a)
Acidité (°D)	15–18	22–25	14–23	15 ^(a)
Point de congélation (-°C)	0,530–0,570	0,570	0,540–0,573	0,53-0,61 ^(a)
pH	6,65–6,71	6,51–6,85	6,50–6,80	6,6 ^(a)

^(a) : SIBOUKEUR (2007).

1.1.3. Composition biochimique

1.1.3.1. Eau

Le lait est un mélange complexe qui contient 90% d'eau (LEBRUN et LEQUET, 1985)

1.1.3.2. Protéines

Les protéines du lait représentent 95% de la matière azotée totale (caséines et protéines sériques), les 5% restant sont constitués des acides aminés libres, de peptides et d'azote non protéique qui est constitué de la créatinine, de l'acide urique et particulièrement de l'urée (0,3 à 0,4g/l) (COURTET LEYMARIOS, 2010). Elle sont constituées des acides aminés essentiels en quantité suffisante pour soutenir les multiples rôles des protéines dans l'organisme (BOS *et al*, 2000 ; PHILLIPS *et al*, 2009)

Les protéines du lait de vache sont séparées en caséines qui précipitent à leurs pH isoélectrique (4,6 à 20°C) qui représentent environ 80% des protéines totales et les protéines sériques qui constituent 20% des protéines totales de ce lait. Alors que dans le lait de femme, les protéines sériques représentent plus de 70% (ALAIS, 1975).

1.1.3.3. Glucides

Le lactose constitue le sucre principal dans le lait. C'est un disaccharide composé de glucose et de galactose. Sa teneur s'élève en moyenne à 50g/l. Sa faible contribution à l'apport énergétique du lait (30%), ne fait pas de ce dernier un aliment équilibré en termes de répartition calorique. (WATTIAUX, 1996).

1.1.3.4. Matière grasse

La matière grasse du lait est une fraction quantifiée couramment par le taux butyreux (TB) qui correspond à l'ensemble des substances lipidiques, mais la matière grasse inclut aussi entre 0,5 et 1% de produits non lipidiques. Le taux butyreux ne prend en compte que les lipides stricts, à savoir les esters d'acide gras. Il varie beaucoup en fonction des données zootechniques telles que l'espèce et la race (LEBRUN et LEQUET, 1985).

Les lipides (fraction saponifiable) constituent donc l'essentiel de la matière grasse (98%). De tous les composants du lait de vache, les lipides sont ceux qui, quantitativement et qualitativement, varient le plus. Les taux moyens précisés dans la littérature sont de 35 g/l (COURTET LEYMARIOS, 2010). Le lait est une source d'acides gras essentiels ; le lait maternel est riche en acides gras polyinsaturés n-6 et n-3 essentiels à la croissance et au développement tels que les acides arachidonique (20:4 n-6) et docosahexaénoïque (22:6 n-3),

ainsi que leurs précurseurs métaboliques respectifs, les acides linoléique (18 :2 n-6) et alpha-linolénique (18 :3 n-3) (SANGIOVANNI *et al*, 2009).

1.1.3.5. Minéraux

Les minéraux (ou matières salines) sont présents dans le lait à une concentration de 7g/litre environ (tableau III). Les plus représentés en quantité sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore. Les minéraux sont présents dans le lait soit en solution dans la fraction soluble soit liés à la caséine au sein des micelles (COURTET LEYMARIOS, 2010).

1.1.3.6. Vitamines

Le lait est une source non négligeable de ces substances. Des vitamines hydrosolubles (vitamine de groupe B, vitamine C) qui se trouvent dans la phase aqueuse (lait écrémé, lactosérum) et des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, K) qui sont associées à la matière grasse (VEISSEYRE, 1979) (Tableau III). Le lait camelin est riche en vitamine C (25 à 60 mg/l) par rapport au lait bovin qui ne contient que 8mg/l (CHIBBAH, 2011).

Tableau II : Composition du lait bovin, ovin, caprin et humain en nutriments de base (PARK *et al*, 2007)

Espèce animale Nutriments	Bovin	Ovin	Caprin	Humain
Glucides : lactose (g/l)	47	49	41	69
Lipides (g/l)	36	79	38	40
Protides (g/l) :	32	62	34	12
-caséines	26	42	24	4
-protéines solubles (globuline, albumine)	6	10	6	7
-substances azotées non protéiques	2	8	4	5
Extrait sec non gras (g/l)	90	120	89	89
Constituants divers (vitamines, enzymes, gaz dessous)	Traces			

Tableau III : Tableau récapitulatif des concentrations en vitamines et en sels minéraux du lait de vache (COURTET LEYMARIOS, 2010).

Nutriment		Concentration
Vitamines (mg/l)	B1 (thiamine)	0,42
	B2 (riboflavine)	1,72
	B6 (pyridoxine)	0,48
	B12 (cobalamine)	0,0045
	Acide nicotinique (niacine)	0,92
	Acide folique	0,053
	Acide pantothénique	3,6
	Biotine	0,036
	C (acide ascorbique)	8
	A	0,37
	β-carotène	0,21
	D (cholécalférol)	0,0008
	E (tocophérol)	1,1
	K	0,03
Sels minéraux (g/l)	Calcium	1,25
	Phosphore	1,00
	Magnésium	0,12
	Sodium	0,50
	Potassium	1,25
	Chlore	1,00

1.2. Caractéristiques des protéines du lait

Les protéines du lait forment un ensemble assez complexe constitué des caséines représentant 80% et les protéines sériques représentant 20% des protéines totales du lait bovin (ALAIS, 1975).

1.2.1. Caractéristiques structurales des caséines

Les caséines sont les protéines qui constituent la majeure partie des composés azotés du lait représentant près de 80 % des protéines totales, elles précipitent à $\text{pH} = 4,6$ qui constitue leur pHi . Ce sont des protéines phosphorylées associées à des constituants minéraux particulièrement le calcium et le magnésium (ALAIS, 1975). On distingue quatre types de caséines dans le lait, les caséines αS1 , αS2 , β , et κ , ces protéines sont codées par des gènes différents portés sur le même chromosome (RIBADEAU-DUMAS et BRIGNON, 1993). Les caséines ont tendance à s'associer en particules sphériques ou micelles fortement hydratées et minéralisées, l'assemblage de cette structure micellaire est assuré par des ponts phospho-calciques (HAMBRAEUS, 1982).

1.2.1.1. Organisation en micelles des caséines du lait

La micelle permet par un regroupement adéquat de maintenir en solution les caséines qui sont des protéines non globulaires ainsi de fixer des quantités importantes de phosphate de calcium et magnésium à l'état colloïdal (Tableau IV).

L'organisation des caséines selon le modèle de SHMIDT (1980) (Figure 1) qui est considéré comme un modèle de structure des caséines les plus admis, repose sur une association des caséines en submicelles qui sont maintenues par des ponts phospho-calciques. Dans cette organisation, la caséine- κ étant amphiphile est présente d'une façon prononcée à la surface de la micelle, ce qui maintient la micelle en solution (GINGER *et al*, 1999). La micelle de caséine est une particule sphérique d'un diamètre moyen de 180 nm (MC MAHON et BROWN, 1984), qui peut aller de 30 à 600 nm. Ces différences dépendent de la saison, du stade de lactation ou encore du traitement subi par le lait mais également de la technique de mesure utilisée (SCHER, 1988).

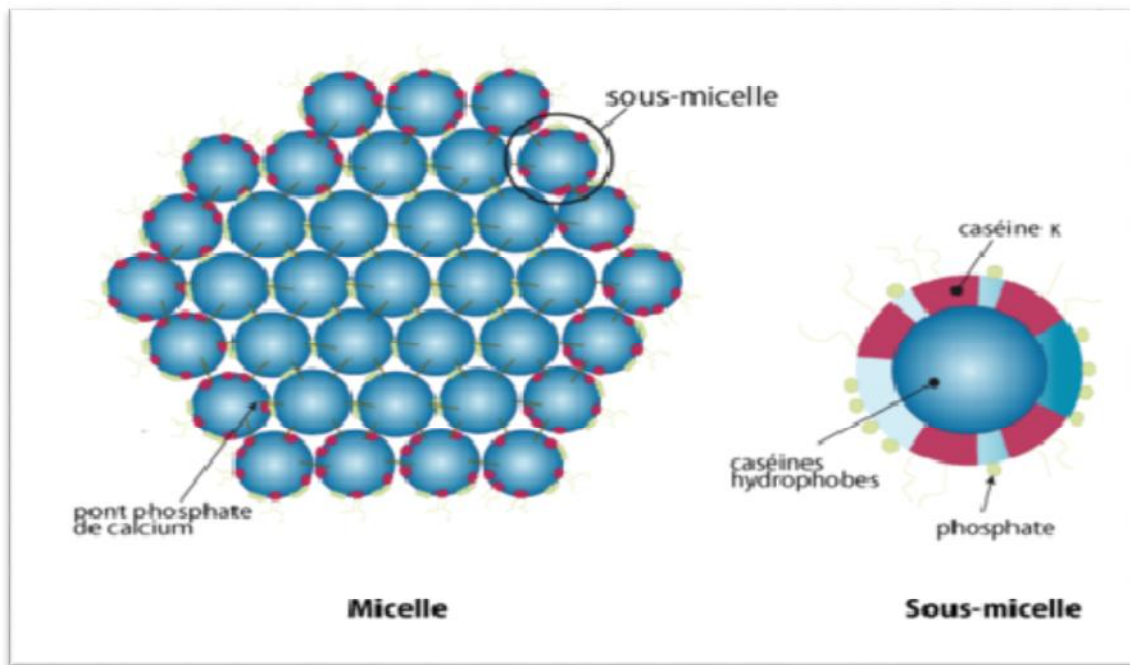


Figure 01 : Représentation de la structure micellaire des caséines bovines selon le modèle de SCHMIDT (1980)

1.2.1.2. Caséine α S1

Cette protéine est la plus abondante, elle occupe 36% des caséines totales dans le lait de vache, soit un taux allant de 10 à 13g/L. La caséine α S1 du lait de vache est constituée de 199 résidus d'acides aminés et une masse moléculaire de 23,6 kDa (Tableau IV). (PAYENS, 1982).

1.2.1.3. Caséine α S2

La caséine α S2 représente 10% sur l'ensemble des caséines, soit une concentration de 4 à 5g/L. Elle est composée de 207 résidus d'acides aminés. Sa masse moléculaire est de 25,25 kDa (Tableau IV). La caséine α S2 est la plus hydrophile des caséines et la plus sensible à l'action des ions calcium. Elle précipite en présence d'une teneur en calcium voisine de 6 mM à une température supérieure à 20°C (RIBADEAU-DUMAS, 1981).

1.2.1.4. Caséine β

La caséine β représente 34 % des caséines totales, sa teneur dans le lait bovin est de 9 à 11g/L. C'est une molécule qui est constituée de 209 résidus d'acides aminés. Sa masse moléculaire est de 24 kDa (Tableau IV). Près de 70% de la molécule se trouve sous la forme pelote statistique. La caséine β présente un comportement variable vis-à-vis des protéases selon qu'elle est isolée ou intégrée dans une micelle. La caséine (PAYENS, 1982).

1.2.1.5. Caséine κ

La caséine κ représente 13 % des caséines totales, sa concentration dans le lait de vache est de 3 à 4g/L. cette protéine est constituée de 169 résidus d'acides aminés. Sa masse moléculaire est de 19 kDa (Tableau IV). La CN- κ est une glycoprotéine, elle renferme 5% de saccharides. Elle est moins sensible au calcium car elle précipite à une concentration supérieure à 30 Mm (RIBADEAU-DUMAS, 1981).

Tableau IV : Tableau récapitulatif de quelques paramètres physico-chimiques des principales caséines bovines (SIBOUKEUR, 2007).

Caséines	CN- α 1	CN- α 2	CN- β	CN- κ
Proportions dans les caséines totales (%)	36	10	34	13
Résidus d'acides aminés (unité)	199	207	209	169
Masse moléculaire (Da)	23600	25250	24000	19000
Point isoélectrique	4,26	4,78	4,49	3,97
Résidus cystéine	0	2	0	2
Groupements phosphoryls	8	10	5	1
Concentration limite de Ca^{++} (mM) (solubilité).	2 ^(a)	1 ^(a)	9 ^(a)	400 ^(a)

^(a) : PAYENS (1982)

1.2.2. Caractéristiques structurales des protéines sériques

Les protéines sériques du lait sont définies comme étant un groupe de protéines demeurant soluble dans le sérum après précipitation des caséines à pH 4,6 à 20°C. Les protéines sériques représentent 20% des protéines totales du lait et occupent 17% de la matière azotée (ALAIS, 1975). Elles ont une structure globulaire et sont caractérisées par leur grande thermolabilité (GIAINI, 2006).

Elles sont composées de deux fractions majeures la β -lactoglobuline (β -Lg) et l' α -lactalbumine (α -La) qui représentent respectivement 54% et 21% de la masse totale des protéines du lactosérum (HUSSAIN, 2012), à cela s'ajoutent les immunoglobulines (Igs), la sérum albumine (BSA), la lactoferrine (LF), la lactoperoxydase (LP), le lysozyme (LZ) (Tableau V), et d'autres composants mineurs tel la transferrine, la nebuline et la fetuine (Tableau VI).

1.2.2.1. La β -lactoglobuline (β -Lg)

La β -lactoglobuline appartient à la famille des lipocalines, elle est la principale protéine du lactosérum bovin (50% des protéines du lactosérum) (CHEANG et ZYDNEY, 2003). Cette protéine se présente sous forme dimérique dans les conditions physiologiques du lait bovin, chaque monomère est constitué de 162 résidus d'acides aminés, sa masse moléculaire est estimée à 18,277 kDa (MADUREIRA *et al*, 2007) (Tableau V).

La β -Lg présente un haut degré de structuration où on observe un empilement des feuillets β et présence d'une structure très compacte de type β - α - β , bloquée par deux ponts disulfure, le cœur de la protéine présente huit brins de feuillets antiparallèles (Figure 02) qui s'enroulent pour former un cœur hydrophobe appelé la cavité hydrophobe ou le calice (BROWNLOW *et al*. 1997).

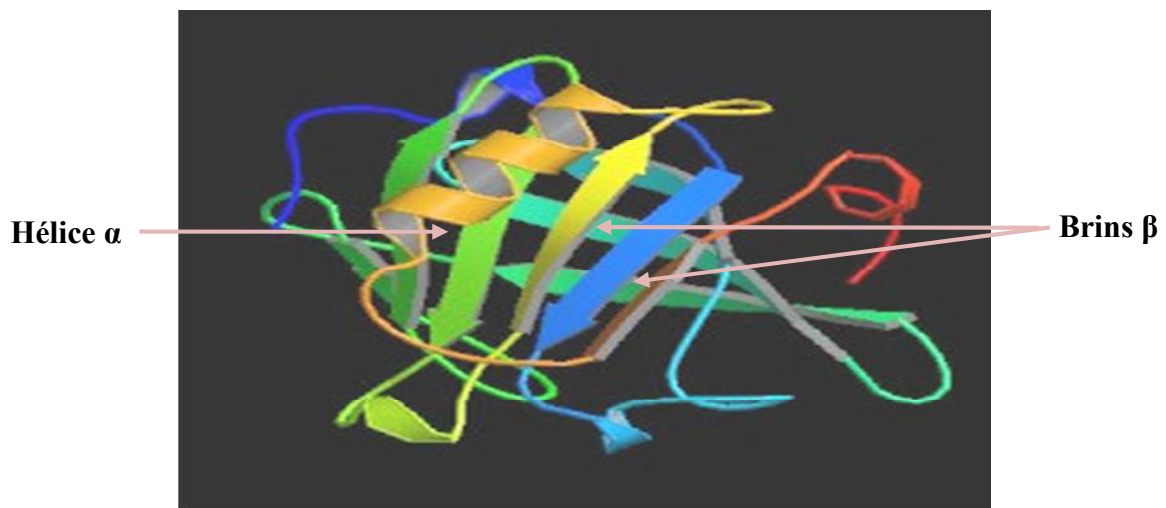


Figure 02 : Structure tridimensionnelle de la β -lactoglobuline bovine obtenue par diffraction aux rayons X à pH 6,5 (BROWNLOW *et al*, 1997).

1.2.2.2. La α -lactalbumine (α -La)

L' α -lactalbumine est une petite protéine globulaire compacte de 123 acides aminés. Sa masse moléculaire est de 14,175 kDa (Tableau V). L' α -La est une métalloprotéine, elle présente une structure stabilisée par 4 ponts disulfures et un ion de calcium au cœur de la molécule (Figure 03), ce qui stabilise la structure de cette protéine et lui confère une meilleure résistance aux traitements thermiques comparativement à la β -lactoglobuline (RIBADEAU-DUMAS, 1981).

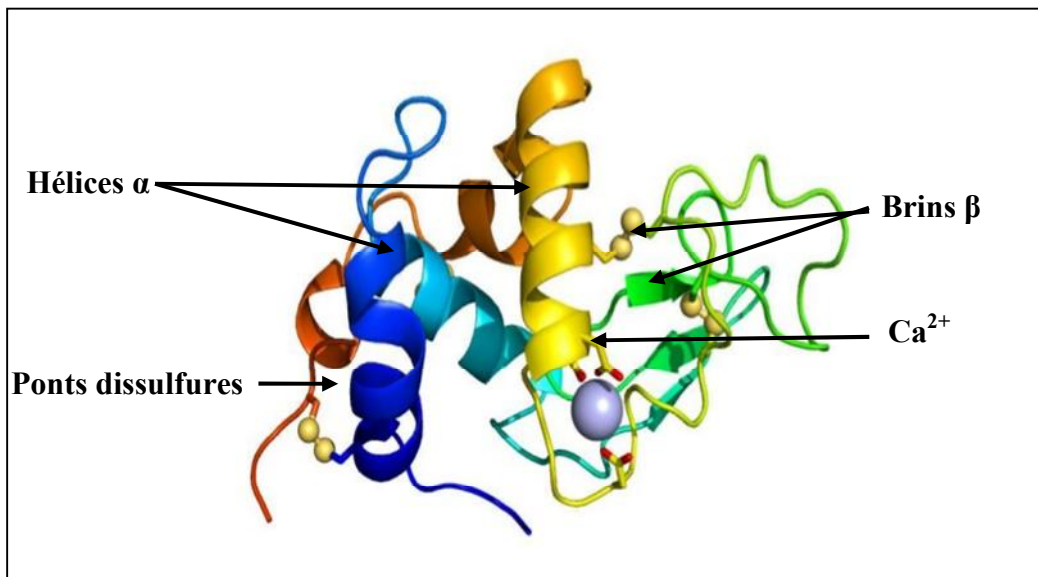


Figure 03 : Structure tridimensionnelle de l' α -lactalbumine humaine en présence d'ion Ca²⁺ (CHRYSINA *et al.* 2000).

1.2.2.3. L'albumine sérique bovine (BSA)

L'albumine sérique bovine représente 7% des protéines du lactosérum bovin. Sa concentration est de 0,4 g/l. Elle est constituée de 582 acides aminés, sa masse moléculaire est de 66,267 kDa et son pHi est 5,1 (Tableau V).

La BSA bovine présente 76% d'homologie dans sa séquence en acides aminés avec l'albumine sérique humaine. La structure de la BSA est ouverte, elle est constituée de 67% d'hélices, ce qui explique la grande aptitude de cette protéine à la gélification (CAYOT et LORIENT, 1998).

1.2.2.4. Autres protéines sériques

Les séroprotéines du lait sont constituées d'autres protéines : Les immunoglobulines (Igs), la lactoferrine (LF), la lactoperoxydase (LP) et le lysozyme (LZ), ces dernières jouent

un rôle antibactérien dans le lait. Leur caractéristiques ainsi que leurs mode d'action est détaillé plus loin .

1.2.2.5. Protéines sériques mineures

Des études ont montré qu'il existe dans le lactosérum du lait plusieurs protéines mineures et des peptides dont les caractéristiques ne sont pas encore élucidées (SMOLENSKI *et al.* 2007) (Tableau V).

Tableau V : Caractéristiques physico-chimiques des protéines de lactosérum du lait bovin (MADUREIRA, 2007).

Protéines	Concentration (g/L)	Masse moléculaire (kDa)	Nombre d'acides aminés	pHi
β-Lactoglobuline	1,3	18,277	162	5,3
α-Lactalbumine	1,2	14,175	123	4,8
Sérum albumine	0,4	66,267	582	5,1
Immunoglobulines	0,5	75- 95	664	5,5-8,3
Lactoferrine	0,1	80	700	7,9
Lactoperoxydase	0,03	70	612	9,5
Glycomacropeptide	1,2	6,7	64	4*
Lysozyme	$0,7 \cdot 10^{-1}$ ^(a)	14 ^(a)	129 ^(a)	10,5-11 ^(a)

(a) : CHETHOUNA (2011)

* : peut varier selon son degré de glycosylation

Tableau VI : Protéines mineures identifiées dans le lactosérum bovin (SMOLENSKI *et al.* 2007).

Nom de la protéine	Fonction
Actin, cytoplasmic I-(P-actin)	Structurale
Albumin precursor	Transport
Apolipoprotein B	Transport
p-2 2-microglobulin precursor (lactollin)	Défense et immunité
Casein kinase 1, alpha 1	Signalisation
Chitinase-like protein 1 (CLP-1)	Inconnue
Diacylglycerol kinase kappa	Signalisation
Eukaryotic translation initiation factor 4	Signalisation
Fetuin	Enzymatique
Zinc finger protein 668	Protéine de liaison
Keratin 9	Structurale
Keratin complex 2, basic, gene 6a	Structurale
Keratin, type I cytoskeletal 10	Structurale
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Enzymatique
Nebulin	Structurale
Nucleobindin 1	Défense et immunité
Polymeric-immunoglobulin receptor precursor	Défense et immunité
Serine (or Cysteine) proteinase inhibitor, clade A	Enzymatique
Transferrine	Transport

1.3. Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Bien que de nombreux composants du lait puissent contribuer à l'activité antibactérienne du lait, les séroprotéines et les peptides qui y dérivent jouent le rôle principal.

1.3.1. Les protéines sériques à effet antibactérien

L'activité antibactérienne du lait est principalement attribuée à quelques protéines du lactosérum : la lactoferrine (LF), le lysozyme (LZ), les immunoglobulines (Ig) et la lactoperoxydase (LP), leur contenu peut varier en grande partie entre les espèces et les races (BALDI *et al*, 2005) et selon la période de lactation ou la nature de l'alimentation des §animaux (OUADGHIRI, 2009).

1.3.1.1. La lactoferrine

La lactoferrine (LF) (anciennement connue sous le nom Lactotransferrine), c'est une glycoprotéine d'un poids moléculaire de 80 kDa (Tableau V), elle appartient à la famille des transferrines (ADLEROVA, 2008). C'est une protéine majeure du lait (0,10 g/L) qui se présente dans les granules des neutrophiles et dans les sécrétions exocrines du corps telles les larmes, la salive et le mucus cervical. Elle est abondante dans le colostrum (MORADIAN, 2014).

La lactoferrine fixe avec une forte affinité deux ions ferriques, simultanément avec deux ions carbonates (AISEN et LISTOWSKY, 1980). Le fer est fixé à l'interface des domaines N1 et N2 dans le lobe Nt, et les domaines C1 et C2 dans le lobe Ct (Figure 4). La lactoferrine ne libère le fer qu'à des pH très acides (MAZURIER et SPIK, 1980).

Dans le lait, la LF joue un rôle bactériostatique en privant les microorganismes du fer nécessaire à leur croissance (LÖNNERDAL, 2004), c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* (MORADIAN, 2014). Néanmoins *E. Coli* a développé un mécanisme qui lui permet de s'adapter à l'action de la LF par la production des sidérophores qui sont sécrétées par les bactéries dans leur environnement et capables de chélater avec une très haute affinité le fer ferrique Fe^{3+} ; les complexes sidérophore- Fe^{3+} sont ensuite récupérés par la bactérie grâce à des transporteurs membranaires spécifiques (VAULONT et SCHALK, 2015).

La LF pourrait jouer le rôle d'un donneur de fer qui favoriserait la croissance de certaines bactéries non exigeantes comme *lactobacillus sporogenes* (ADLEROVA, 2008). Il a été révélé que la LF exerce une action bactéricide sur *Streptococcus mutans* et *Vibrio cholerae* (GIFFORD *et al*, 2005).

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

L'action antibactérienne de la LF se traduit par la perturbation de la perméabilité membranaire des bactéries, car elle se lie au lipide A chez les bactéries à Gram négatif (MADUREIRA, 2007) comme elle se fixe par sa région N-terminale sur certains récepteurs membranaires spécifiques des bactéries à Gram positif (MORADIAN, 2014).

L'activité antibactérienne de la LF dépend de sa concentration dans le milieu et du degré de la saturation de la molécule en fer (MADUREIRA, 2007). Le pouvoir de la LF à maintenir sa liaison au fer même à des faibles pH est important surtout au niveau des sites d'infection et d'inflammation où le pH peut baisser au dessous de 4,5, elle est également capable de lier le fer libéré par les transferrines afin d'empêcher son usage ultérieur dans la prolifération bactérienne (ADLEROVA, 2008).

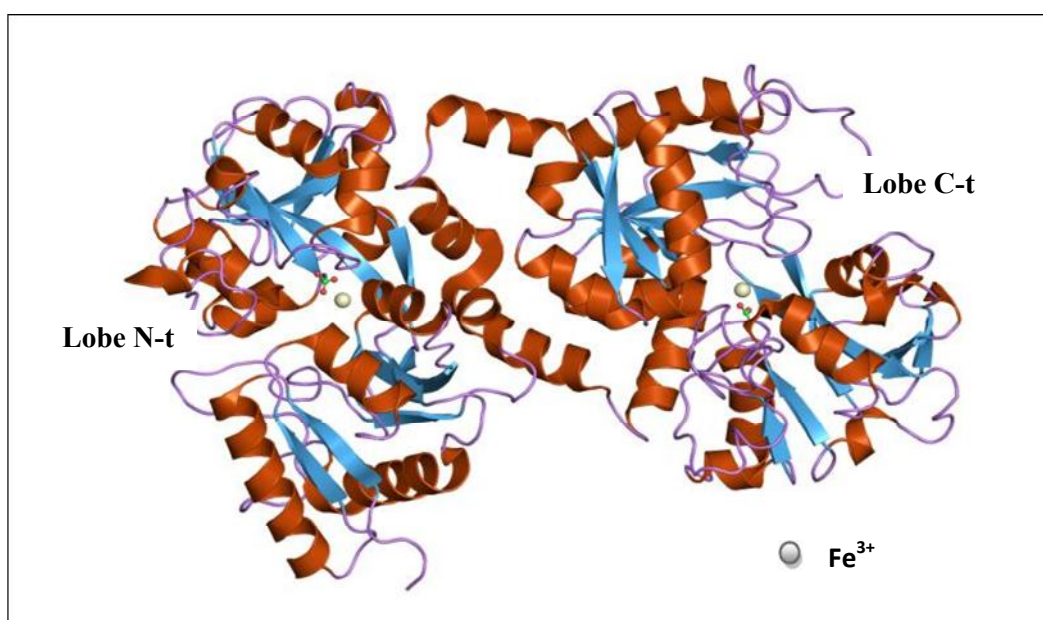


Figure 04: La structure tridimensionnelle d'une lactoferrine saturée en fer. La structure montre l'organisation bilobée de la molécule avec en rouge, les hélices α , et en bleu, les feuillets β (PIERCE *et al*, 2009).

Les données sur les acides aminés et les séquences d'ADN complémentaires montrent une homologie d'une grande partie de la séquence primaire de plusieurs lactoferrines animales (MAGNUSON *et al*, 1990). Les séquences N-terminales de la lactoferrine porcine, humaine, bovine, équine et murine sont homologues (NORRIS *et al*, 1986). Les lactoferrines d'origine murine, bovine et porcine présentent respectivement 70 %, 69 % et 70,7 % d'homologie avec la lactoferrine humaine (ISABELLE, 2000). La séquence primaire de la LF cameline présente une homologie de 74,9% avec la LF bovine (KAPPELER *et al*, 1998).

La cartographie des peptides suggère une homologie structurale entre la lactoferrine porcine et humaine (NORRIS *et al*, 1986). Les conformations des lactoferrines humaine et

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

bovine sont similaires, bien que les lobes Nt et Ct de la protéine bovine sont plus serrés (la différence des angles des deux lobes est de $5,3^\circ$ et $3,7^\circ$, respectivement par rapport aux deux lobes de la LF humaine). On note également une substitution d'un acide aminé au niveau du site de fixation du fer (MOORE *et al*, 1997).

La LF est plus abondante le lait de chamelle, sa concentration est 30 à 100 fois plus supérieure que dans le lait de vache (tableau V). celui du lait d'ânesse est plus élevé que celui de lait des ruminants, mais plus faible que celui de lait de chamelle, de jument et de la femme (BRUMINI *et al*, 2016). Le lait de la chienne contient uniquement des traces de lactoferrine et de transferrine (BROCK, 1980).

La LF cameline révèle une activité antibactérienne plus importante que son homologue humaine (KROL *et al*, 2012). Il a été observé que les taux de la lactoferrine dans le lait de vache et de truie sont insuffisants pour développer une action antibactérienne *in vitro* (BROCK, 1980).

Tableau VII : Caractéristiques physico-chimiques de la lactoferrine bovine et cameline (KAPPELER *et al*, 1998).

Espèce	Chameau	Vache
Paramètre		
concentration (mg/ml)	2- 6	0,02-0,2
Nombre de résidus d'acides aminés	689	689
Masse moléculaire (kDa)	80,16-80,73	84
pHi	8,14	8,18

1.3.1.2. La lactoperoxydase

La lactoperoxydase (LP) (EC : 1.11.1.7) est une oxydoréductase de 70 qui appartient à la famille des hème peroxydases, elle catalyse l'oxydation des thiocyanates endogènes (SCN) en hypothiocyanates (OSCN⁻) ayant une activité bactérienne (UGUZ et OZDEMIR, 2005).

La lactoperoxydase est présente dans une variété de sécrétions biologiques telles que le lait, la salive, les larmes, les sécrétions intestinales, le mucus cervical et la thyroïde. Sa quantité dans le lactosérum est inférieure à 1% (MADUREIRA *et al*, 2007).

La chaîne polypeptidique de la lactoperoxydase est constituée de 612 résidus d'acides aminés, sa masse molaire est estimée à 78 kDa (Tableau V). La structure cristalline à rayons

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

X de la LP de différentes espèces a révélé une protéine globulaire à chaîne unique contenant un groupement hème dans son centre catalytique, sa conformation est stabilisée par un ion calcium. La cavité du groupement hème est divisée asymétriquement en deux régions : La cavité hème distale et la cavité hème proximale (RAJAONARY, 2014 ; SHARMA *et al*, 2013).

SHARMA *et al* (2013) ont analysé les séquences de lactoperoxydase provenant du lait de différentes espèces : humaine, bovine, de bufflonne, caprine, ovine et cameline, ils ont constaté une homologie de séquence importante entre la LP humaine et celles des laits bovin, bufflonne, caprin, ovin et camelin, les taux sont estimés respectivement à 85%, 85%, 84%, 84 et 85%.

La lactoperoxydase joue un rôle important dans la défense naturelle chez les mammifères (MADUREIRA *et al*, 2007). Le système LPS ou « lactoperoxydase enzyme system » c'est un système enzymatique composé de l'enzyme lactoperoxydase et de ses 2 substrats : le peroxyde d'hydrogène et l'anion thiocyanate (PERRAUDIN, 1991).

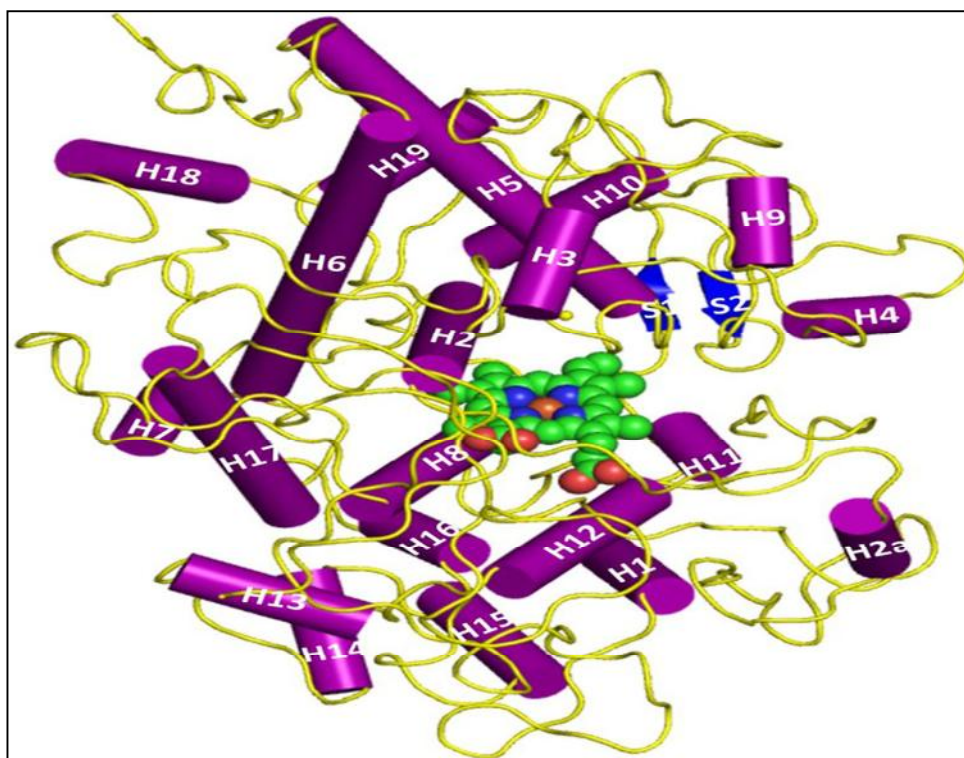


Figure 05 : Structure moléculaire de la lactoperoxydase, les hélices α sont représentés en violet et les brins β en bleu, le groupement hème en vert (SHARMA *et al*, 2003)

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

L'anion thiocyanate (SCN^-) qui est nécessaire pour l'expression de l'activité antibactérienne de la LP est ubiquiste des tissus et des sécrétions chez les mammifères, sa concentration dans le lait de vache est de 0,1 à 15 ppm. Cette concentration varie selon la saison, le régime alimentaire et l'état de santé du pis, car en cas d'infection, le taux de SCN^- augmente (PERRAUDIN, 1991 ; MADUREIRA *et al*, 2007).

Le peroxyde d'hydrogène du lait est naturellement produit, sous l'action des oxydases, par les leucocytes polymorphonucléaires ou par le métabolisme de certains microorganismes catalase négative dans des conditions d'aérobie, c'est le cas des bactéries lactiques (PERRAUDIN, 1991).

L'oxydation des SCN^- , en présence de peroxyde d'hydrogène, produit des oxacides ayant des propriétés bactéricides, le premier produit de l'oxydation est l'ion hypothiocyanate (OSCN^-) puis différents acides se succèdent, dont l'action inhibitrice varie en fonction des espèces bactériennes (SEIFU *et al*, 2003). Lors de la formation du complexe LPO- SCN^- , il est observé que l'ion SCN^- se lie par son atome soufre dans la cavité de l'hème distale, à proximité de l'atome de fer du groupement hème (SHARMA *et al*, 2013).

Des bactéries, telles que *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Acinetobacter spp.*, *Neisseria spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles au LPS (EDGE, 2005).

L' OSCN^- réagit principalement avec les groupements thiols (-SH) et avec les formes réduites des nucléotides de la nicotinamide (NADH et NADHP) qui sont oxydés en NAD^+ et NADP^+ . Les groupements -SH des résidus cystéine des protéines sont oxydés en sulfényl thiocyanates (-S- SCN) et en acides sulféniques (-S-OH) (PERRAUDIN, 1991). Ces produits ont une action bactéricide par inhibition de la glycolyse ainsi que des réactions nicotinamide dépendantes (MADUREIRA *et al*, 2007).

Le système lactoperoxydase est actif à des concentrations aussi faibles que 0,5 $\mu\text{g/l}$ (PERRAUDIN, 1991). SEIFU *et al* (2003) ont signalé que le système peroxydase a la capacité de contrôler le développement des pathogènes alimentaires dans le lait caprin, ils ont constatés que le LPS exerce un effet bactéricide contre *Listeria monocytogenes*, *Brucella melitensis* et *E. coli* et bactériostatique contre *Staphylococcus aureus*.

Tableau VIII : Effet du LPS sur les bactéries les plus réponsées dans lait (EDGE, 2005)

Bactérie	Effet du LPS	Type du lait
<i>E. coli</i> y compris <i>E. coli</i> E157 : H7	Bactéricide	Lait bovin cru
	Réduit le taux de la colonisation gastro-intestinale par les coliformes	Lait bovin cru Lait camelin cru Lait caprin cru
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bactéricide et bactériostatique selon la concentration	Lait cru
<i>Campylobacter jejuni</i> (différentes souches)	Bactéricide	Lait bovin
<i>Staphylococcus aureus</i> (plusieurs souches)	Bactéricide et bactériostatique	Lait bovin Lait caprin Lait camelin
<i>Listeria monocytogenes</i> (plusieurs souches)	Bactéricide et bactériostatique	Lait bovin cru Lait camelin cru Lait UHT
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Bactéricide	Lait bovin
<i>Brucella melitensis</i>	Bactéricide	Lait caprin

1.3.1.3. Les immunoglobulines

Les immunoglobulines (Igs) sont des protéines constituées de quatre chaînes polypeptidiques, deux d'entre elles sont des chaînes légères identiques (L) d'environ 25 kDa chacune, les deux autres sont des chaînes lourdes identiques (H) d'une masse moléculaire comprise entre 50-55 kDa.

La structure des immunoglobulines est maintenue par des ponts-disulfures inter-chaînes ainsi que par des liaisons non-covalentes (POLJAK *et al*, 1976).

La molécule d'Ig est divisée en deux domaines actifs : le domaine variable et la région constante. Le fragment de liaison à l'antigène (Fab) est responsable de l'interaction avec

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

l'antigène cible ou l'épitope, le fragment cristallisable (Fc) est un effecteur de la réponse immunitaire (Figure 6).

Les Igs constituent 10 à 15 % des protéines sériques totales du lait bovin (BAYFORD, 2010). Elles sont divisées en cinq classes : les IgM, IgA, IgG, IgE, et IgD. Les immunoglobulines des classes G, A et M sont les plus abondantes dans les sécrétions mammaires (MADUREIRA, 2007). Les immunoglobulines trouvées dans le colostrum et dans le lait sont les mêmes que celles trouvées dans le sang et dans les muqueuses (BAYFORD, 2010).

Des études ont démontré que le lait cru issu des vaches non immunisées contient des anticorps spécifiques dirigés contre *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* et *Shigella flexneri* (BAYFORD, 2010).

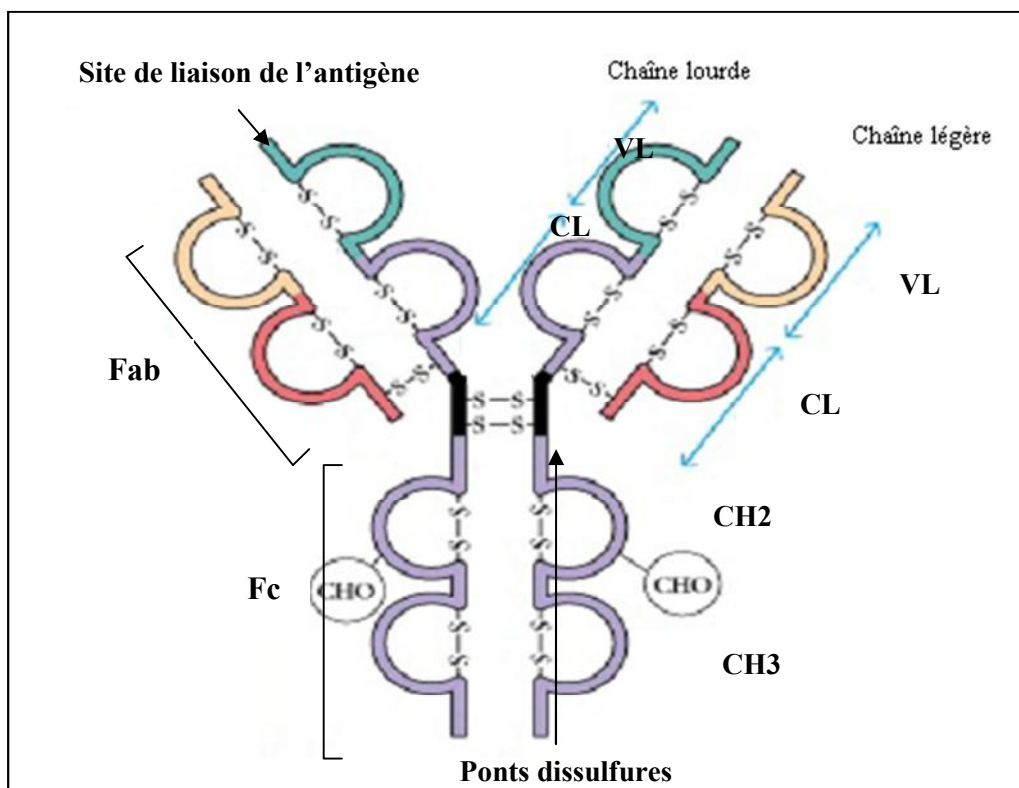


Figure 06 : Schéma d'une molécule d'immunoglobuline. C : parties constantes, V : parties variables, H : Lourde, L : Léger, Fc : fragment cristallisable, Fab : Fragment liant l'anticorps (GOLDSBY *et al*, 2000).

Au niveau de l'intestin, les IgA sécrétoires se lient aux bactéries et aux toxines empêchant leur liaison aux cellules intestinales et donc leur transport à travers la muqueuse ce qui écarte le risque de développer une réponse immunitaire systémique (HURLEY et THEIL, 2011). Il a été observé que les IgA sécrétoires issues du lait humain empêchent l'adhésion des pneumococci et de *Haemophilus influenzae* aux cellules intestinales (VAN DE

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

PERRE, 2003). La teneur en Igs du colostrum et du lait dépend fortement de l'espèce animale. Les espèces animales peuvent être divisées en trois classes : les espèces chez lesquelles les Igs sont principalement transférés au fœtus via le placenta (l'homme et les lapins), les espèces chez lesquelles la progéniture est née agammaglobulinémique et la transmission des Igs se fait via les sécrétions mammaires (les ongulés tels que les cochons, les vaches, les chèvres et les chevaux) et les espèces chez lesquelles le transfert des Igs se fait via le placenta et les sécrétions mammaires (telles que les chiens et les souris) (HURLEY et THEIL, 2011).

La plus grande concentration en Igs est contenue dans le lait camelin suivi du lait équin et humain (Tableau VII). La teneur en IgA dans le lait humain est très élevée par rapport à celle des IgG qui est estimée à 2%. Cependant des concentrations très importantes en IgG (75%) sont enregistrées dans les autres espèces animales (WOOF et MISTECKY, 2005 ; HURLEY et THEIL, 2011). Les IgG sont subdivisés en sous classes dont le nombre et la nature diffèrent selon les espèces animales. Dans le lait camelin, trois sous classes (IgG₁, IgG₂ et IgG₃) sont enregistrées (DESMYTER *et al*, 2001), alors que le nombre de sous classes est de quatre (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) dans le lait de femme (STEPHAN *et al*, 2002) et seulement deux sous classes (IgG₁ et IgG₂) dans le lait de jument et de vache (BRUMINI *et al*, 2016).

Des particularités structurales sont notées au niveau des Igs isolées du lait de chamelle, les deux sous classes IgG₂ et IgG₃ présentent une structure unique dépourvue des chaînes légères avec une partie très étendue qui porte le CDR (Complementary Determining Region) (DALEY *et al*, 2005). La chaîne lourde des IgG camelines est dépourvue du domaine CH1 (HAMERS CASTERMAN *et al*, 1993).

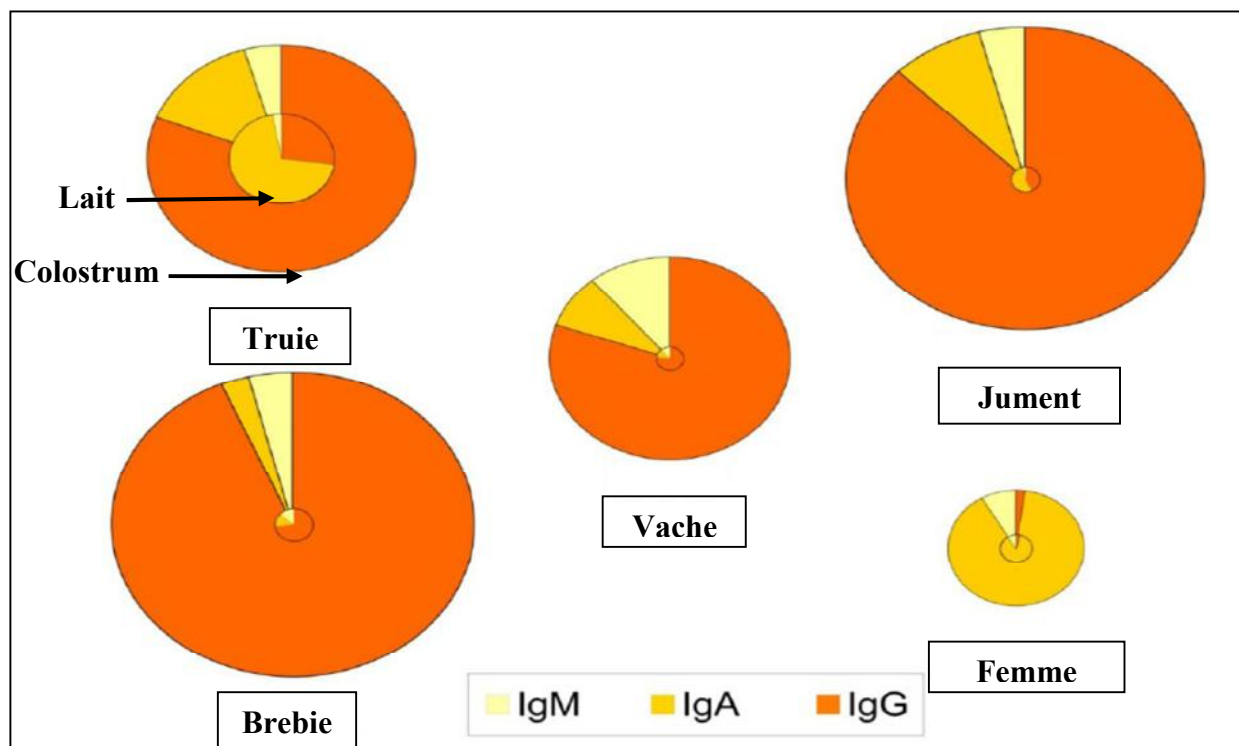


Figure 07 : Distribution relative des IgA, IgM et IgG dans le colostrum et dans le lait de cinq différentes espèces. La taille relative des cercles représente la variation de la concentration des immunoglobulines totales retrouvée chez les différentes espèces et chez la même espèce entre le lait et le colostrum (HURLEY et THEIL, 2011).

1.3.1.4. Le lysozyme

Le lysozyme (LZ) (N-acetylmuramide glycanhydrolase ou E.C.3.2.1.17) c'est une enzyme bactériolytique présente naturellement dans le lait des mammifères où elle représente un facteur antimicrobien puissant (BENKERROUM, 2008).

Le lysozyme contient une chaîne polypeptidique de 129 acides aminés. Sa masse moléculaire est d'environ 14 kDa. Dans le milieu physiologique, le lysozyme est chargé positivement, son pHi varie entre 10,5 et 11. Sa structure montre une prédominance des hélices α caractérisant la majorité des peptides antibactériens (BROGDEN, 2005).

Dans le lait de vache, La teneur en lysozyme est estimée à 70 mg/l (Tableau V). Le LZ contribue à la protection du lait contre les bactéries susceptibles de contaminer le pis de la vache et retarder ainsi sa détérioration. Cette activité antibactérienne du lysozyme est exploitée dans la conservation des aliments (BENKERROUM, 2008).

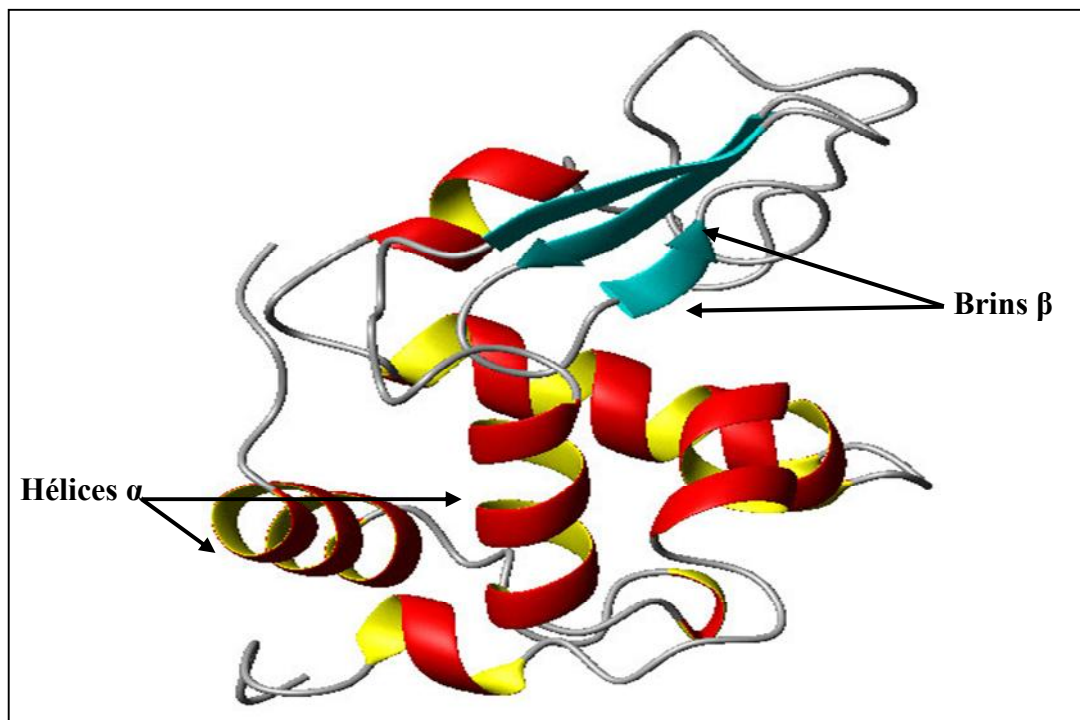


Figure 08 : Structure tridimensionnelle du lysozyme du lait bovin montrant la prédominance des hélices α (BROGDEN, 2005).

Connu également sous le nom N-acetylmuramidase ou muramidase, le lysozyme catalyse la destruction des polymères de peptidoglycanes de la paroi des cellules bactériennes. L'enzyme agit au niveau des liaisons (1-4) qui lient l'acide N-acetylmuramique (NAM) et les résidus N-acetyl-glucosamines (NAG) provoquant ainsi la lyse cellulaire des bactéries (BENKERROUM, 2008) et aboutissant à la formation des fragments cellulaires responsables de l'activation des cellules immunitaires spécifiques (BRUMINI *et al*, 2016).

L'activité antibactérienne du lysozyme est essentiellement dirigée contre les bactéries à Gram positif puisque les peptidoglycanes de la paroi est accessible à l'enzyme (MEGA *et al*, 2006). Par ailleurs, des études récentes ont montré la résistance de certaines bactéries de ce groupe à l'action du lysozyme, c'est le cas de *Lactococcus lactis* (BENKERROUM, 2008) ainsi que la sensibilité de certaines bactéries à Gram négatif, c'est le cas de *Escherichia coli* et *Pseudomonas fragi* (MAGA, 2006 ; CHETHOUNA, 2011).

Divers mécanismes de résistance des bactéries à Gram positif ont été proposés tels que la production d'une protéine inhibitrice spécifique au lysozyme ou la O-acétylation du peptidoglycane comme c'est le cas chez les staphylocoques (VEIGA *et al*, 2006).

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Tous les lysozymes du lait appartiennent au type c (Chicken type lysozyme), toutefois ils diffèrent au niveau de la structure et des propriétés physico-chimiques (Tableau X) (BENKERROUM, 2008).

La concentration du lysozyme soluble dans le lait varie considérablement d'une espèce à une autre et chez la même espèce en fonction de divers facteurs tels que la race, le stade de lactation, la parturition, l'alimentation, la santé du pis et la saison (Blanc, 1982). Les laits humains, équin et canin contiennent des taux élevés en LZ, allant de 200 à 1330 mg/L correspondant à 2% à 7% des protéines totales. Tandis que les laits bovins, ovins et caprins contiennent des taux qui sont 3000 à 6000 fois plus faibles (BENKERROUM, 2008).

El-HATEMI *et al* (2007) ont signalé l'absence du LZ dans le lait camelin. En revanche, EL-AGAMY *et al* (1996) ont confirmé sa présence et ont pu le purifier du lait de chamelle et le caractériser. Cette contradiction pourra être expliquée par la faible présence de cette protéine dans le lait camelin qui est au dessous de la limite de détection des méthodes analytiques utilisées pour sa quantification, ou par la diminution de sa concentration sous certaines conditions ou dans certaines périodes de l'année (Blanc, 1982).

Les concentrations inhibitrices du lysozyme varient considérablement en fonction du microorganisme cible et des paramètres écologiques dans le milieu réactionnel, elles peuvent être aussi faibles que 10 µg/ml (MASSCHALCK *et al*, 2001). Il a été noté que l'activité du lysozyme pourrait être influencée par les autres protéines antimicrobiennes du lait (lactoperoxydase, lactoferrine, immunoglobulines, N-acétyl-glucosaminase...) (BENKERROUM, 2008).

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Tableau X : Principales propriétés physico-chimiques du LZ du lait de différentes espèces de mammifères (BENKERROUM, 2008).

Type de lait	Cl.	PM (kDa)	pHi	Nombre D'AA	Résidus Du CC	Stabilité aux TT à pH neutre (%d'AR)	Références
Camelin	-	14.4	ND	ND	ND	75° C/30 min (56 %) 75° C/30 min (74 %)	EL AGAMY <i>et al.</i> (1996)
Bovin	c	14.4	10,2	129	Glu ₃₅ -Asp ₅₃	75° C/15 min (25%)	EL AGAMY (2000)
Ovin	C	16.2	ND	147	Glu ₅₃ -Asp ₂₁	ND	MARONI et CUCCURI (2001)
Humain	c	15	11	130	-	ND	PARRY <i>et al.</i> (1960)
Caprin	c	14.4	-	129	Glu ₃₅ -Asp ₅₃	ND	JOLLES <i>et al.</i> (1990)
De bufflonne	c	16.0	ND	NA	ND	75° C/30 min (81.7%) Pasteurisation (100%) 100° C/5min (70%)	EL AGAMY (2000)
Equin	c	14.7	ND	129	Glu ₃₅ -Asp ₅₃	82° C/2 min (101%)	JAUREGUI-ADELL (1974); SARWAR <i>et al.</i> (2001)
Canin	c	14.5	8,63	129	Glu ₃₅ -Asp ₅₃	ND	GROBLER <i>et al.</i> (1994)
LZ du Blanc d'oeuf.	C	14.3	11	129	Glu ₃₅ -Asp ₅₃	ND	MATAGNE et DOBSON (1998)

ND : Non disponible. Cl : Classe. AA : Acides aminés. CC : Centre catalytique. TT : Traitement thermique. %d'AR : pourcentage d'activité résiduelle.

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Tableau IX : Propriétés antibactériennes des quelques protéines sériques du lait et mécanismes de leur action (MADUREIRA, 2007).

Protéine	Protection contre	Mécanisme de protection
Immunoglobulines	- <i>Helicobacter pylori</i> - <i>E.coli</i> enteropathogène -Streptocoques cariogènes <i>E. coli</i> J5	Agglutination Bactériolyse Action bactériostatique Oponisation
Lactoferrine	<i>E. coli</i> enterotoxinogène (ETEC) <i>E. coli</i> enterohémorragique (EHEC) Shigella flexneri-induced Enterite inflammatoire <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Vibrio cholerae</i>	Liaison au fer Déstabilisation de la membrane bactérienne Action synergique avec les antibiotiques, les anticorps et le lysozyme Modulation de la fonction des mononucléaires
Lactoperoxydase	Bactéries à Gram positif Bactéries à Gram négatif	Oxydation des groupements-SH de la membrane cellulaire Action bactériostatique Bactériolyse
Glycomacropéptide	La plaque dentaire Caries dentaires <i>E. coli</i> enterotoxinogène	Inhibition de l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales Inhibition de la liaison des toxines à leurs récepteurs

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Tableau XI : Concentration des protéines sériques antibactériennes dans le lait de quelques espèces animales

Espèce Protéine	Femme	Anesse	Jument	Vache	Chèvre	Chamelle	Références
Immunoglobulines (g.L ⁻¹)	0,96-1,3	1,30	1,63	0,5-1	-	1,5-19,6	BRUMINI <i>et al</i> , 2016
Lactoferrine (g.L ⁻¹)	1,5-2	0,005-0,05	0,1-2	0,02-0,5	0,02-0,2	0,02-7,28	
Lysozyme (g.L ⁻¹)	0,1-0,89	0,67-4	0,5- 1,33	(70- 600)10 ⁻⁶	250 . 10 ⁻⁶	(60- 1350)10 ⁻⁶	
Lactoperoxydase (mg.L ⁻¹)	0,77	0,11	-	30-100	-	-	SEIFU <i>et al</i> , 2003
Immunoglobuline G (mg.L ⁻¹)	40-54	390		100-800	100-400	2000	KROL <i>et al</i> , 2012

1.3.1.5. Autres protéines sériques à effet antibactérien

En plus des principales protéines sériques responsables de l'activité antibactérienne du lait (les immunoglobulines, la lactoperoxydase, la lactoferrine et le lysozyme), la bibliographie a cité d'autres protéines qui se trouvent dans le lactosérum et qui révèlent des activités antibactériennes importantes (PP3, PGRP, WAP).

1.3.1.5.1. Composant -3 des protéoses-peptones (PP3)

Le composant-3 des protéoses peptones est une fraction complexe de glycoprotéines isolée dans la fraction des protéoses peptones qui est isolée du lait après un traitement thermique à 95 °C pendant 30 min suivi d'une acidification à pH 4,6 (PAQUET *et al*, 1988). Le PP3 ou la lactophorine c'est la protéine majeure de la fraction des PPT, sa masse molaire est estimée à 28KDa (GIRARDET, 1992).

Le PP3 révèle une activité inhibitrice de la croissance des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, cette action est dûe principalement à un peptide de 23 acides aminés libéré de la partie C-terminale de la protéine appelé lactophoricine (CAMPAGNA *et al*, 2004).

D'autres activités sont assignées au PP3, telle que le transport des minéraux tels que le calcium qui contribueraient à diminuer l'incidence des caries dentaires, cette action est mise en exergue par des études *in vitro* et *in vivo* chez des rats de laboratoires (GRENBY *et al*,

2001). Ainsi le PP3 protège l'émail dentaire en inhibant la croissance de *Streptococcus mutans* responsable de l'acidification de la plaque dentaire (ANDREWS *et al*, 2006). L'action antibactérienne du PP3 se manifeste soit par liaison avec le calcium sur la plaque dentaire pour induire un effet tampon contre les acides des bactéries cariogéniques ou par réduction de la formation du biofilm en empêchant l'adhérence des cellules microbiennes.

1.3.1.5.2. La protéine de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP)

La protéine de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP) a été identifiée dans le lait de chamelle, mais pas dans le lait de vache (MAL et PATHAK, 2010). Sa concentration est de 120 mg/l (KAPPELER *et al*, 2004).

La PGRP est constituée de 172 résidus acides aminés et présente un poids moléculaire de 19 110 Da (KAPPELER, 1998). La PGRP du lait de chamelle a été purifiée et cristallisée. Elle possède deux sites fonctionnels, l'un est impliqué dans la fixation du peptidoglycane et sur l'autre site se fixent d'autres molécules (SHARMA *et al*, 2008).

La PGRP possède une activité antimicrobienne importante en inhibant la synthèse du peptidoglycane, ceci en se liant à ses précurseurs ou en limitant l'accès des enzymes catalyseurs de la biosynthèse de ce polymère à leur substrat (LU *et al*, 2006). A côté de son effet antibactérien, il a été noté que cette protéine possède la capacité de contrôler les métastases du cancer (MAL et PATHAK, 2010).

1.3.1.5.3. Protéine acide du lactosérum

Whey Acidic Protein (WAP) ou protéine acide du lactosérum c'est une protéine constituée de 117 acides aminés et d'un poids moléculaire de 12 564 Da (KAPPELER *et al*, 1998). La WAP constitue la protéine majeure dans le lait des rongeurs et dans le lait de chamelle (SIMPSON *et al*, 2000), elle a été également détectée dans le lait canin (SEKI, 2012). La WAP possède une activité inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* (JCM2413), son action est maximale à pH 6,6 (IWAMORI *et al*, 2010).

1.3.2. Les peptides du lait à effet antibactérien

En plus des protéines antibactériennes naturellement présentes dans le lait, il existe des peptides antibactériens spécifiques faisant partie de la séquence peptidique des protéines du lait qui sont libérés soit par digestion gastro-intestinale du lait, soit par fermentation du lait ou par hydrolyse avec des enzymes protéolytiques. Ces peptides ont une activité antibactérienne contre plusieurs genres bactériens (HAQUE et CHAND, 2008).

1.3.2.1. Les peptides issus des Protéines sériques

1.3.2.1.1. Les peptides issus de la lactoferrine

1.3.2.1.1.1. Les peptides cationiques

Les peptides antibactériens sont relativement courts (moins de 100 acides aminés), les peptides cationiques sont chargés positivement et ils sont amphiphiles. Les bactéries à Gram négatif sont susceptibles à l'action de ces peptides, ces peptides agissent en s'associant à certains facteurs qui facilitent leur transport à travers la membrane externe de la bactérie, ils causent la mort cellulaire par un mécanisme « multihits » qui implique une action sur plus d'une cible ionique (FARNAUD et EVANS, 2003).

1.3.2.1.1.2. La lactofericcine

Les fragments de la lactofericcine représentent les premiers peptides à effet antimicrobien dérivés des protéines sériques qui ont été découverts (HAQUE et CHAND, 2007). La lactofericcine est dérivée de la lactoferrine (région N-terminale) via le clivage enzymatique par la pepsine (Tableau XII).

C'est un peptide de 25 acides aminés avec 8 résidus basiques, ce qui lui confère un caractère cationique (SILVA et MALCATA, 2003 ; NAGPAL *et al*, 2010).

La lactofericcine est résistante à la chaleur, elle exerce son activité antibactérienne sur une large gamme de pH avec une concentration minimale inhibitrice moyenne faible, estimée à 0,5 mg/ml (SZWAJKOWSKA *et al*, 2011). La lactofericcine a démontré une activité bactériostatique et bactéricide plus élevée que la lactoferrine (HARQUE et CHAND, 2008). Son activité antibactériennes contre *E. coli* enterotoxigénique et *Listeria monocytogenes* a été rapportée (MEISEL et BOCKELMANN, 1999).

Il est bien établi que la liaison du peptide à la surface des bactéries à Gram négatif entraîne la libération du lipopolysaccharide, ce qui cause des dommages et des changements morphologiques au niveau de la paroi cellulaire (SZWAJKOWSKA *et al*, 2011).

1.3.2.1.1.3. La lactoferrampine

La lactoferrampine est identifiée comme le fragment (268-284) du domaine N1 de la lactoferrine bovine. Ce peptide révèle une action inhibitrice sur la croissance de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (MADUREIRA *et al*, 2007 ; JABHARI *et al*, 2012).

1.3.2.1.2. Les peptides issus de la β -lactoglobuline et de l' α -lactalbumine

La digestion protéolytique de la β -lactoglobuline bovine a permis la libération de 4 fragments peptidiques f(15–20), f(25–40), f(78–83), et f(92–100) qui présentent une activité bactéricide contre les bactéries à Gram positif (HERNANDEZ-LEDESMA *et al*, 2008) (Tableau XII). Leur charge, leur hydrophobicité et leur caractère anionique/cationique jouent un rôle important dans cette activité (HERNANDEZ-LEDESMA *et al*, 2008 ; NAGPAL *et al*, 2010).

PELLEGRINI *et al* (1999) ont montré que la digestion de l' α -lactalbumine avec la trypsine et la chymotrypsine a généré des peptides bactéricides. Ces peptides sont très actifs contre les bactéries à Gram positif et faiblement actifs contre les bactéries à Gram négatif. Ces peptides issus de l'hydrolyse de l' α -La sont chargés négativement, ce qui explique leur faible activité sur les bactéries à Gram négatif dont la membrane externe contient majoritairement des polysaccharides chargés négativement (NAGPAL *et al*, 2010).

1.3.2.2. Les peptides issus de la caséine

1.3.2.2.1. Les peptides issus de la κ caséine

1.3.2.2.1.1. Le Glycomacropéptide

Le Glycomacropéptide (GMP) est un peptide qui représente environ 20% des protéines du lactosérum (RAJAONARY, 2014). C'est un fragment de la partie C-terminale de la κ caséine (f 106–169) qui est libéré dans le lactosérum lors de la fabrication du fromage, suite à l'action de la trypsine ou de la chymosine qui clive la liaison peptidique Phe105-Met106 (FARIAS *et al*, 2010).

La masse moléculaire moyenne du GMP est d'environ 7500 Da, cette masse peut atteindre 9631 Da pour les peptides qui sont hautement glycosylés (GMPg) (FARIAS *et al*, 2010). Les GMP isolés de la kappa caséine bovine sont O-glycosylés et sont estimés à 50% des peptides totaux (ROBITAILLE *et al*, 2012).

Le GMP possède la capacité de se lier aux toxines du choléra et aux entérotoxines d'*E. coli*, de réduire l'adhésion des bactéries et des virus de même que leur colonisation, d'inhiber la production des sécrétions gastriques et de réguler la pression sanguine (RAJAONARY, 2014).

Le GMP empêche l'adhésion des bactéries cariogéniques comme *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* et *Streptococcus sobrinus* sur la cavité orale et contrôle la composition bactérienne de la plaque dentaire (JABBARI *et al*, 2012).

Il a été démontré que le GMP identifié dans le lait humain empêche l'adhésion de certaines bactéries à leurs cellules cibles telles que *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae* (LIEPKE *et al*, 2001). Une activité antibactérienne importante attribuée particulièrement à l'acide sialique qui constitue la partie glucidique des glycomacropéptides glycosylés a été révélée sur *Streptococcus mutans* (FARIAS *et al*, 2010 ; DASHPER *et al*, 2013).

Le traitement du GMP par la trypsine libère des peptides bioactifs qui exercent un effet bactéricide contre *E. coli*. Ce peptide correspond au fragment (106–124) de la région N-terminale de la κ -caséine (ROBITAILLE *et al*, 2012).

1.3.2.2.1.2. La kappacine

La kappacine est un peptide issu du GMP qui a une activité antibactérienne contre diverses espèces à Gram positif et à Gram négatif (Tableau XIII). La kappacine est un isoforme spécifique du GMP non glycosylé phosphorylé libéré du variant A de la caséine kappa (ROBITAILLE *et al*, 2012).

La kappacine inhibe l'infection du tractus gastro-intestinal chez le nouveau né, par la perturbation des canaux transmembranaires chez la bactérie, ce qui aboutit à une augmentation de la sensibilité de la bactérie à l'acidité gastrique (JABBARI *et al*, 2012).

1.3.2.2.2. Peptides issus de la caséine α S1

1.3.2.2.2.1. L'isracidine

L'isracidine est un peptide obtenu suite à l'hydrolyse de la caséine α S1 par la pepsine ou la chymosine (Tableau XIII). C'est un peptide qui correspond au fragment (1-23) de la partie N-terminale de la caséine α S1. Sa masse moléculaire est de 2770 Da (NAGPAL *et al*, 2010).

L'isracidine inhibe *in vitro* la prolifération des lactobacilli et d'autres bactéries à Gram positif. *In vivo*, il exerce un puissant effet protecteur contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes* (HARQUE et CHAND, 2008).

1.3.2.2.2.2. La caseicidine

La caseicidine est obtenue par digestion de la caséine α S1 par la chymosine (Tableau XIII) à pH neutre. Ce peptide présente une activité antibactérienne contre les genres : *Staphylococcus* et *Sarcina*, ainsi que les espèces *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* (LAHOV et REGELSON, 1996).

1.3.2.2.3. Les peptides issus de la caséine α S2

1.3.2.2.3.1. La casocidine

La casocidine est un peptide isolé à partir de la caséine- α S2 du lait bovin (ZUCHT *et al*, 1995), il correspond au fragment (165-203), sa masse molaire est estimée à 4870 Da. Son action inhibitrice a été démontrée sur *Escherichia coli* et de *Staphylococcus carnosus* (NAGPAL *et al*, 2010).

1.3.2.2.3.2. Autres peptides

LOPEZ-EXPOSITO et RECIO (2006) ont démontré la présence de quatre peptides antibactériens cationiques dérivés de la caséine α S2 ovine, ils correspondent aux fragments : f (165-170), f (165-181), f (184-208) et f (203-208); les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action de ces peptides que les bactéries à Gram négatif.

1.3.2.2.4. Les peptides issus de la caséine β

Un peptide correspondant au fragment f (64-77) a été isolé de la caséine- β lapine, il possède un caractère anionique, son activité a été révélée sur bactéries à Gram positif (LOPEZ-EXPOSITO et RECIO, 2006). Le peptide f (184-210) libéré de la β -caséine humaine a montré un large spectre d'inhibition contre les bactéries à Gram-positif et à Gram négatif.

Tableau XII : Peptides antibactériens issus des protéines sériques du lait (THOMAS *et al*, 1999)

Peptide antibactérien	Source protéique	Enzyme	Action contre les bactéries
β -lactoglobuline f(15-20)	β -lactoglobuline	Trypsine	Gram positif
β -lactoglobuline f(25-40)	β -lactoglobuline	Trypsine	Gram positif
Lactoferricine f(17-41)	Lactoferrine	Pepsine	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , virus, et champignons
β -lactoglobuline f(78-83)	β -lactoglobuline	Trypsine	Gram positif
β -lactoglobuline f(92-100)	β -lactoglobuline	Trypsine	Gram positif

Les protéines sériques et peptides du lait à effet antibactérien

Tableau XIII : Peptides antibactériens issus des caséines générés sous l'action des protéases digestives (LAHOV et REGELSON, 1999 ; ZUCHT *et al*, 1995).

Peptide antibactérien	Source protéique	Enzyme	Action contre les bactéries
Casecidine	Caséine α S1bovine	Chymosine	Gram positif
Isracidine f(1-23)	Caséine α S1bovine	Chymosine	Gram positif, négatif
Casocidine f(181-207)	Caséine α S2 bovine	Chymosine	Gram positif, négatif
Casocidine f(175-207)	Caséine α S2bovine	Chymosine	Gram positif (principalement)
Casocidine f(165-170)	Caséine α S2bovine	Pepsine	Gram positif (principalement)
Casocidine f(165-181)	Caséine α S2bovine	Pepsine	Gram positif et négatif
Kappacine f(106-169)	Caséine κ bovine	Pepsine	Gram positif (principalement)
Kappacine f(42-49)	Caséine κ bovine	Chymosine	Gram positif et négatif

Conclusion

A côté de sa haute valeur nutritionnelle, le lait possède une fonction protectrice naturelle, il peut augmenter la résistance aux infections et inhiber l'action des microorganismes pathogènes. Son activité antibactérienne est principalement attribuée à quelques protéines sériques mineures : la lactoferrine, la lactoperoxydase, le lysozyme et les immunoglobulines, chacune de ces protéines possède un mode d'action spécifique. La séquestration du fer disponible dans le milieu est la principale action par laquelle la lactoferrine exerce son action antibactérienne contre les bactéries dépendantes du fer, mais elle intervient également par la perturbation de la membrane externe étendant ainsi son action sur les bactéries à Gram négatif. Le système lactoperoxydase, mis en place par la lactoperoxydase, est un système enzymatique qui permet la catalyse d'un nombre de réactions dont les produits inhibent des réactions cellulaires essentielles aboutissant à une bactéricidie. Le lysozyme provoque une lyse de la cellule bactérienne notamment celles à Gram positif et ceci suite à la perturbation de leur paroi. Les immunoglobulines jouent un rôle protecteur au niveau de l'intestin, principalement, par la fixation et la neutralisation des bactéries et en empêchant leur adhésion intestinale. La composition du lait en ces différentes protéines sériques est déterminée par des facteurs génotypiques, environnementaux et physiologiques.

Les peptides dérivés de ces protéines ainsi qu'à partir des caséines, soit par digestion gastro-intestinale, soit par fermentation ou par hydrolyse protéolytique, possèdent également des propriétés antibactériennes vis-à-vis de différentes espèces bactériennes.

La mise en évidence des propriétés antibactériennes des protéines du lactosérum et leurs peptides permettra de développer de nouveaux produits à haute valeur ajoutée après une simple hydrolyse de sous-produits du lactosérum. Une connaissance approfondie des mécanismes d'inhibition adoptés par ces peptides antibactériens permettra la fabrication de médicaments puissants. Ce domaine d'études promet de déployer de nombreuses variétés de produits alimentaires, pharmaceutiques ayant un impact important sur la santé humaine.



Stage pratique

2. Stage pratique

La partie expérimentale a été réalisée au niveau de laboratoire de Biochimie de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomique de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel

2.1.1.1. Matières premières

Nous avons utilisé différents échantillons de lait : lait de vache cru, lait reconstitué, lait de vache pasteurisé, et lait UHT.

2.1.1.2. Produits chimiques

-Solvants : acide acétique ; glycérol ; méthanol ; acide chlorhydrique.
-Sels : azide de sodium, carbonate de sodium, sulfate de cuivre.
-Colorants et réactifs spécifiques : acide ascorbique ; acrylamide ; bisacrylamide ; bleu de bromophénol ; bleu de coomassie R250 ; Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ; 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) ; glycine ; lactose ; persulfate d'ammonium; 2-mercaptoéthanol ; réactif de folin ciocalteu ; trishydroxylaminomethane (Tris) ; TEMED.

2.1.1.3. Autres produits

- SEPHACRYL S100.
-Sérum albumine bovine (BSA) ;
-Kit pour étalonnage des gels d'électrophorèse en PAGE-SDS ;
-Bleu de dextrane.

2.1.1.4. Appareillage

-Unité d'électrophorèse sur mini-cuves vertical (HOEFFER SE 260, USA), comprenant : couleur de gel ; cuves d'électrophorèse; générateur de courant; plaque en verre et en hydroxy d'alumine ; espaceurs de 1mm d'épaisseur.
-Unité de chromatographie basse pression (BUCHI, Switzerland) constitué de détecteur UV, pompe péristaltique, enregistreur graphique, collecteur de fractions et colonne de séparation (20×1cm) ;
-Balance de précision (0.01mg) (OHAUS, USA) et une balance analytique à affichage digital (0.01g) ;
-Spectrophotomètre UV-visible (SHIMADZU, Japon) ;
-pH mètre ;

- Lyophilisateur à plateaux et à ballons ;
- Centrifugeuse réfrigérée (SIGMA, USA) ;
- Agitateurs variés (de tube, à barreaux magnétiques) ;
- Bain-marie (MEMMERT, Allemagne).

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Détermination de la qualité physicochimique du lait de vache

L'analyse biochimique du lait a porté sur la mesure de certains paramètres (dosage des protéines, dosage de lactose et de la vitamine C). Les dosages sont effectués en trois essais.

2.1.2.1.1. Détermination de la teneur en protéine totales

Le taux des protéines dans le lait est dosé par la méthode de Lowry *et al* (1951). Le principe repose sur le développement d'une coloration bleue foncée suite à l'addition à la solution protéique d'un sel de cuivre en milieu alcalin, puis du réactif de Folin-Ciocalteu. La coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungstomolybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine. Les espèces réduites absorbent la lumière à 750nm.

Le dosage des protéines est réalisé par l'emploi d'un spectrophotomètre UV visible. La concentration en protéines de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage établie en employant de l'albumine sérique bovine comme protéine étalon (figure 9).

2.1.2.1.2. Détermination de la teneur en lactose

Le lactose est un disaccharide qui comprend le glucose et galactose. Sa détermination se fait par une méthode qui repose sur la réduction de l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. Son dosage est réalisé par spectrophotométrie ($\lambda=530\text{nm}$).

La concentration en lactose de l'échantillon analysé est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage (figure 10) établie en employant le lactose comme référence.

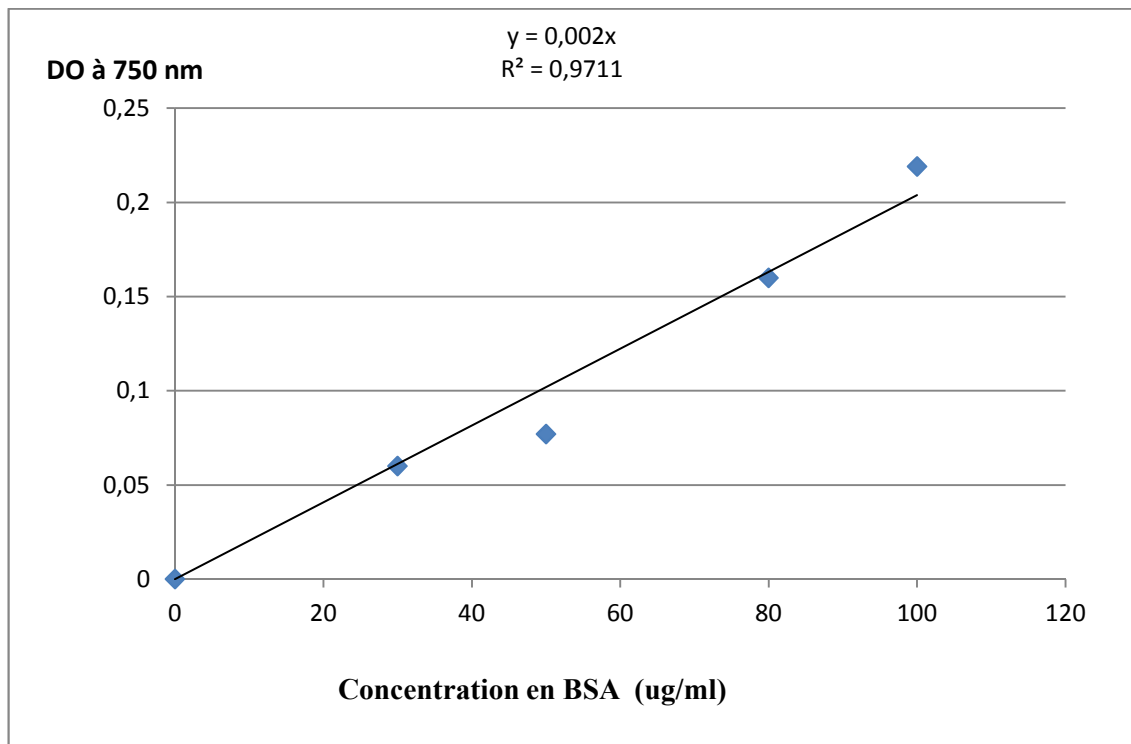


Figure 09 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de Lowry *et al* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisé comme protéine étalon

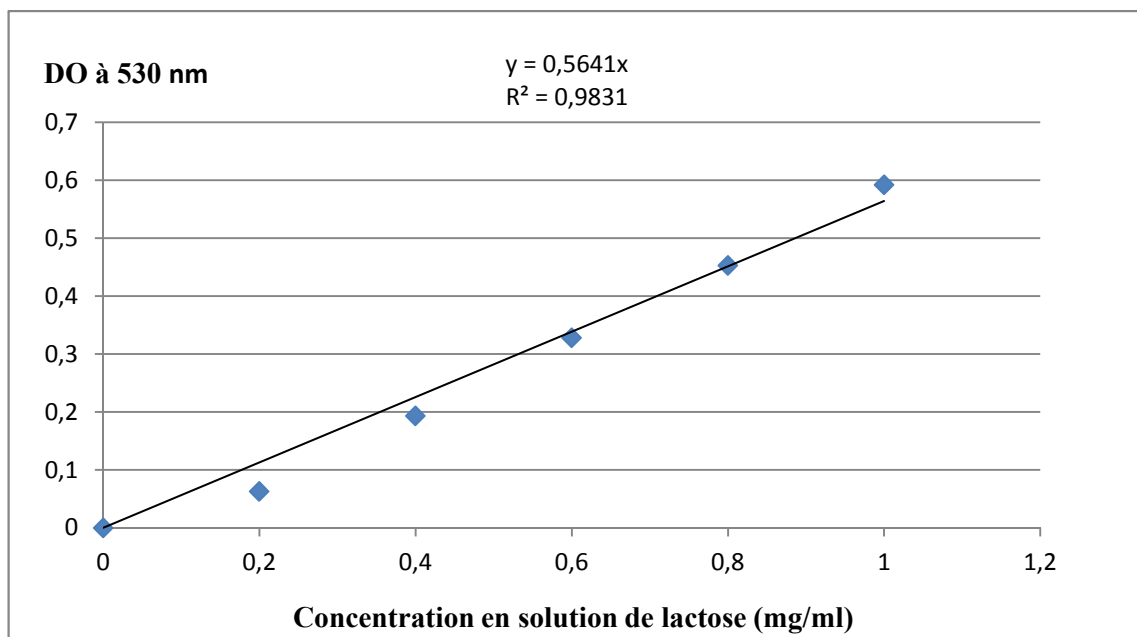


Figure 10 : Courbe étalon du dosage de lactose réalisé avec une solution de lactose comme référence.

2.1.2.1.3. Détermination de la teneur en vitamine C

La vitamine C est l'isomère L de l'acide ascorbique, c'est une gamma-lactone de l'acide L-cétogulonique comportant une fonction éné-diol sur les carbones 2 et 3, Cette fonction est très oxydable.

Le dosage chimique utilisé repose sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2,6 dichlorophénol-indophénol, le DCPIP est coloré en bleu sous sa forme oxydé et incolore sous sa forme réduite. La solution de DCPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue.

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

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

ou : C_1 : Concentration en acide ascorbique de la solution étalon

C_2 : Concentration en vitamine C dans la solution inconnue

V_1 : Chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon

V_2 : Chute de burette mesurée dans le cas du lait

2.1.2.2. Isolement des protéines du lait de vache

2.1.2.2.1. Préparation des échantillons

2.1.2.2.1.1. L'écémage du lait

L'écémage est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 20 minutes à 4°C. La crème qui apparaît en surface est écartée, alors que le lait écémé est filtré.

2.1.2.2.1.2. Acidification

La séparation des caséines et des protéines sériques est obtenue par acidification du lait à pH 4,6 avec une solution HCl, 4N ; le pH 4,6 correspond au pH des caséines qui vont précipitées. Le lait est centrifugé à 4000xg /20 min, le culot obtenu est constitué des caséines alors que le surnageant c'est les protéines sériques. Cette opération est répétée deux fois afin d'assurer une meilleure qualité des séparations. Les fractions obtenues sont neutralisées à pH 6,6.

2.1.2.2.1.3. Dialyse

Cette étape permet de débarrasser les échantillons des molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 8000 Da (lactose, sels minéraux et azote non protéique).

Les différentes fractions obtenues (protéines totales, protéines sériques et caséines) sont dialysées contre l'eau distillée pendant 48H. Elles sont ensuite congelées et lyophilisées.

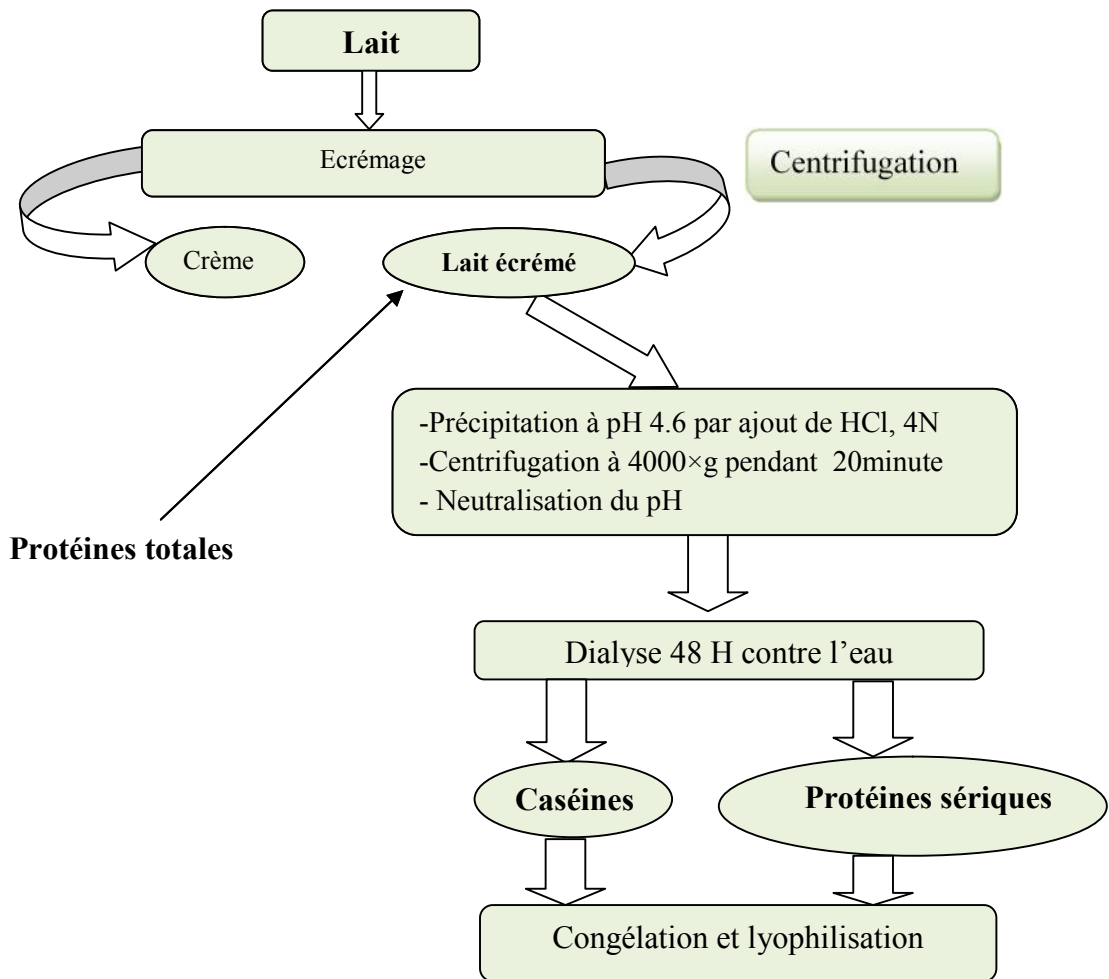


Figure 11 : Etapes suivies pour l'isolement des caséines et des protéines sériques du lait.

2.1.2.2.2. Isolement et caractérisation des protéines du lait

2.1.2.2.2.1. Méthodes chromatographiques

2.1.2.2.2.1.1. Principe de la chromatographie de filtration sur gel

La chromatographie de perméation sur gel permet de séparer et de purifier les divers constituants d'un mélange selon l'importance relative de leurs masses moléculaires à travers une phase stationnaire appropriée qui permet d'éluer les entités protéiques dans l'ordre décroissant de leurs poids moléculaires.

Les protéines sériques bovines sont fractionnées selon la masse moléculaire en utilisant une phase stationnaire constituée de séphacryl S100 qui est un gel préparé par réticulation

covalente d'un allyle de dextrane avec du N, N' méthylène bisacrylamide. Ce gel, ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2.5.10^5$ Da.

La phase mobile utilisée est une solution tampon composée de Tris-HCl 0.02 M ; pH 8.4, additionnée d'un antimicrobien qui est l'azide de sodium.

2.1.2.2.2.1.1. Préparation de la colonne

Le gel de sephacryl S100 prêt à l'emploi, est mis en contact du tampon de départ (Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4) pendant 30 minutes. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (20×1cm) en une seule fois. Après stabilisation par l'éluant, à un débit de 0.46ml/min le volume mort de la colonne ($V_0 = 8$ ml) est déterminé par injection de bleu de dextrane à la concentration de 1mg/ml.

2.1.2.2.2.1.2. Préparation des échantillons

Les protéines sériques lyophilisées (50 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon Tris-HCl (0.02 M ; pH 8.4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à débit constant de 0.46 ml/min. Des fractions de 2 ml sont recueillies et contrôlées par électrophorèse.

2.1.2.2.2.2. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle des particules chargées sous un champ électrique. Les protéines, qui sont des macromolécules amphotères, peuvent se déplacer dans un champ électrique en fonction de leur charge nette, de leur taille et des conditions du milieu. Ce déplacement différentiel est mis à profit en électrophorèse pour pouvoir les séparer et les identifier, car les niveaux de migration atteints constituent une caractéristique intrinsèque de chaque entité protéique.

2.1.2.2.2.2.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

2.1.2.2.2.2.1.1. Principe

Les gels sont préparés en mélangeant les solutions d'acrylamides et de bisacrylamide avec une solution tampon, puis on a dégazé l'ensemble et on lui a rajouté le persulfate d'ammonium et le TEMED qui sont des agents initiateurs et accélérateur de la réaction de polymérisation.

Le mélange est immédiatement coulé entre deux plaques qui sont séparées par des espaceurs et à la fin un peigne est introduit pour permettre la formation des puits après la polymérisation du gel.

Les échantillons à analyser sont dissous à raison de 1mg/ml dans un tampon approprié puis on ajoute un indicateur coloré qui est le bleu de bromophénol qui permet de déterminer le front de migration des protéines et de repérer la fin de l'électrophorèse .

Les deux plaques renfermant le gel sont montées sur l'unité de l'électrophorèse, et les cuves inférieure et supérieure sont remplies de tampon d'électrode, puis les échantillons préparés sont déposés à raison de 20 µl dans chaque puits. En fin l'unité est mise sous tension, courant et voltage constant : 20mA, 250V.

2.1.2.2.2.2. Conditions générales

La séparation électrophorétique est réalisée sur le gel de polyacrylamide (PAGE), qui est le produit d'une polymérisation du monomère acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH}_2$) et du comonomère N, N'-méthylène -bis acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CO} - \text{NH} - \text{CH}_2 = \text{NH} - \text{CO} - \text{CH} = \text{CH}_2$) et ce, en présence du persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ et du N, N, N', N'-tétraméthyléthylène-diamine (TEMED) comme catalyseurs de la réaction.

La taille des pores, donc la structure du gel, dépend de la concentration en monomère et en comonomère. Elle est définie le plus souvent par les indices T et C:

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

a = acrylamide (g) ; b= N, N, N', N'-tétraméthylène-bis-acrylamide (g)

v= volume de tampon (ml).

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

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native) est une méthode particulièrement résolutive pour les protéines sériques du lait. Celles-ci migrent dans ce cas selon leur charge nette et leur poids moléculaire. Le gel utilisé est un gel présentant respectivement des pourcentages en T et C égales à 12 et 2,7%.

Le tampon de gel est composé de Tris 9.14g dissous dans 100ml d'eau distillé et ajusté à un pH de 8,9 par le HCl 4N. Le tampon d'électrodes contient 1,2 g de Tris, 5.76 g de glycine, qui sont dissous dans 200ml d'eau distillée. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillon composé de 100 µl de tampon du gel, 700 µl d'eau distillée, glycérol 50% et de bleu de bromophénol pour suivre l'avancement de la migration.

2.1.2.2.2.3. Electrophorèse en milieu dissociant et dénaturant, en présence du SDS et du 2-β Mercaptoéthanol (PAGE –SDS)

Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) de formule $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3\text{ Na}^+$, est un détergent anionique utilisé pour dissocier les complexes protéiques. Associé à un agent réducteur, le 2-β Mercaptoéthanol, chargé de rompre les ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines et se fixe en excès sur ses dernières, leur conférant ainsi une forte charge négative.

Les protéines ainsi chargées vont se déplacer sous un champ électrique uniquement selon leur poids moléculaire, car l'effet discriminant de la charge se retrouve ainsi éliminé.

La PAGE-SDS, utilise un système bi-phasique comprenant deux types de gel superposés : un gel de concentration (T=4%; C= 2.7 %) en tampon Tris-HCl pH6.8, faiblement réticulé, qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend plutôt à concentrer les échantillons et un gel de séparation (T=17% ; C= 207 %) en tampon Tris-HCl, pH 8.8, à travers lequel les protéines migrent selon leur poids moléculaire. Le gel est calibré des protéines étalons de poids moléculaires connus.

A la fin de l'électrophorèse et après démoulage du gel, les protéines sont fixées dans une solution TCA pendant 45 minutes, puis colorés dans une solution contenant le bleu de coomassie R250, TCA, le méthanol et de l'eau distillée pendant 2 heures. En fin décolorées dans un mélange d'acide acétique, eau distillée et méthanol.

2.1.2.3. Etude de la sensibilité des protéines du lait à l'hydrolyse par la trypsine

La trypsine est une endopeptidase d'origine pancréatique. Elle est active à un pH optimal de 7,7 et à une température proche de celle du corps humain, soit entre 37 et 40°C (FRITCHE, 2003) et son poids moléculaire est de 24 kDa.

La trypsine agit sur les liaisons peptidiques dont le groupement carboxylique provient de la lysine ou de l'arginine.

La solution protéique (protéines sériques ou caséines) à la concentration de 0,8% est additionnée à l'enzyme solubilisé dans du HCl 10^{-3} N à la concentration initiale de 1 mg/ml dans un rapport enzyme/substrat (E/S) de 2%. Les deux mélanges (protéines sériques et caséines) ainsi que leur simulation enzymatique (solution protéique sans enzyme) sont incubés à 40°C.

Des prélèvements sont effectués à des temps différents : T0, T1, T2, T3 et T4 correspondant à 0mn, 15mn, 30mn, 60mn et 120mn, respectivement. Les prélèvements sont additionnés du tampon d'échantillon (SDS (10%, 2-mercaptoéthanol, eau distillé et tris) pour

le contrôle en PAGE SDS de la cinétique enzymatique. L'arrêt de la réaction enzymatique se fait par chauffage à 100°C/ 5mn afin d'inactiver l'enzyme.

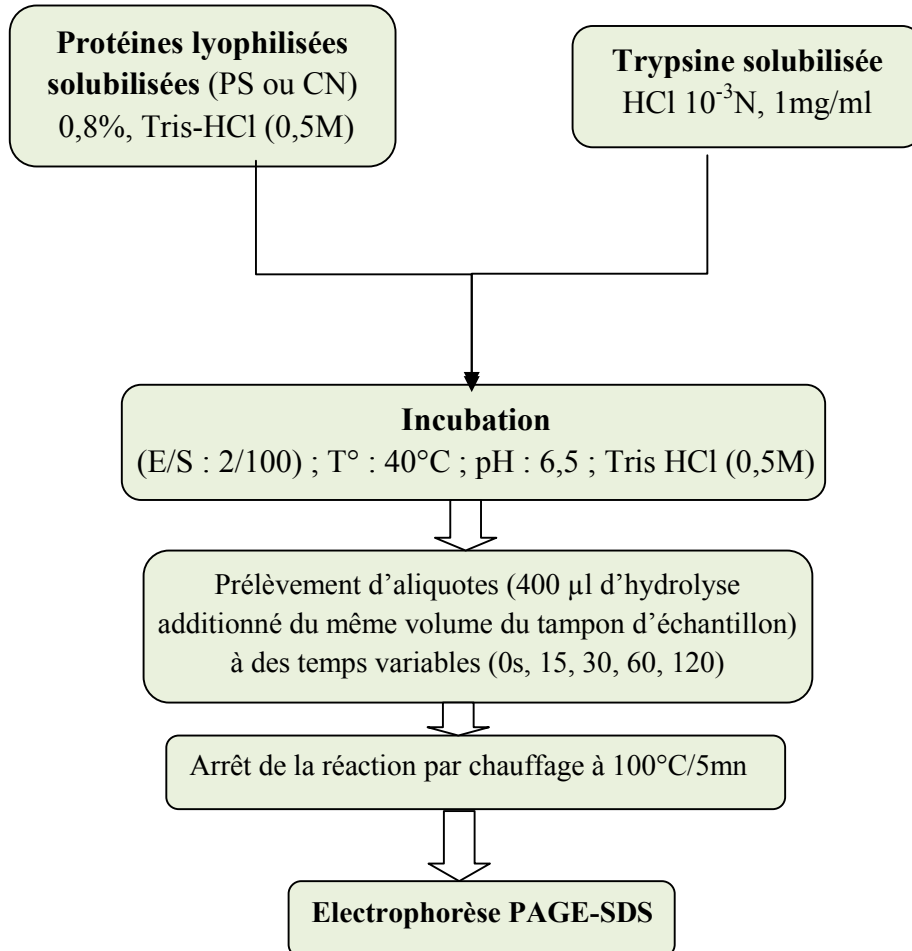


Figure 12 : Etapes suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines (protéines sériques et caséines) par la trypsine

2.2. Résultats et discussion

2.2.1. Qualité physico-chimique du lait de vache

Le tableau IX regroupe les moyennes et les écarts types des dosages effectués sur les échantillons de lait, les résultats relatifs aux caractéristiques biochimiques (Protéines totales, lactose et vitamine C) sont mesurés sur les trois différents échantillons du lait.

Tableau XIV : Résultats d'analyse biochimique des échantillons de lait

Paramètres	Lait de vache	Lait reconstitué	Lait stérilisé UHT
Protéines totales (g/l)	34,25±3,18	30,25±1,06	31,00±0,70
Lactose (g/l)	45,65±0,12	49,64±1,02	39,89±0,49
Vitamine C (mg/l)	18,37±0,13	18,11±1,83	17,34±0,77

2.2.1.1. Teneur en protéines totales

Les résultats figurant dans le tableau VIII indiquent des différences entre les teneurs en protéines totales des trois échantillons du lait à savoir 34,25 g/l ± 3,18 pour le lait de vache, 30,25 g/l ± 1,06 pour le lait reconstitué et 31 g/l ± 0,70 pour le lait stérilisé UHT. De même ces teneurs sont plus élevées par rapport à celle du lait humain (10 g/l) (TACKOEN, 2012).

Le taux des protéines totales mesuré dans le lait de vache se rapproche de celui rapporté par BOUDJENAH HAROUN (2012) et BRUMINI *et al* (2016) à savoir 34 g/l. Cependant des valeurs plus faibles ont été rapportées par la bibliographie : 32g/l (CHETHOUNA, 2011 ; HAUG *et al*, 2007 ; PARK *et al*, 2006 ; SIBOUKEUR, 2007) ; 29 g/l (SENOUSSI, 2011).

Ces variations dans les teneurs en protéines totales sont dues à la race, la saison (FROC *et al*, 1988) mais d'autres facteurs comme l'âge, le stade de lactation, l'alimentation ont des effets importants sur la composition du lait (GHAOUES, 2011).

Les différences constatées entre les teneurs en protéines totales des trois échantillons du lait ; lait de vache, lait reconstitué et lait stérilisé UHT seraient dues aux différents traitements technologiques appliqués (pasteurisation, stérilisation).

Selon GHAOUES (2011), le lait stérilisé UHT est un lait traité par la chaleur, Ceci pourrait expliquer en grande partie la teneur faible en protéines du lait stérilisé UHT 31g/l par rapport au lait de vache cru 34,25 g/l qui seraient dénaturés par la chaleur.

La teneur en protéines du lait reconstitué (30,25 g/l) est plus faible que celle du lait UHT et celle du lait de vache. Ce résultat pourrait être attribué aux différents traitements

appliqués à ce lait, ainsi qu'à la qualité de la poudre utilisée pour la reconstitution (KRIOU et KASRIA, 2015).

2.2.1.2. Teneur en lactose

Les trois échantillons du lait analysés présentent des différentes teneurs en lactose : 48,93 g/l pour le lait de vache, 49,64 g/l pour le lait reconstitué et 39,89 g/l pour le lait stérilisé UHT.

Le lait stérilisé UHT présente une teneur faible en lactose par rapport au lait de vache et au lait reconstitué, ceci pourrait être une conséquence du traitement UHT appliqué à ce lait où le taux du lactose diminue suite à son implication dans la réaction de Maillard. La teneur en lactose du lait de vache mesurée dans la présente étude est relativement proche des valeurs rapportées par BRUMINI *et al* (2016) (48 g/l) et PARK *et al* (2006) (47 g/l), alors qu'elle est inférieure à celle rapportée par HAUG *et al* (2007) à savoir 53 g/l. Cependant, des valeurs plus faibles ont été notées dans certaines études : 44,13 g/l par CHETHOUNA (2011) et SIBOUKEUR (2007) ; 42,70 g/l par SENOUSSE (2011) et 38,18 g/l par BOUDJENAH HAROUN (2012). Ces fluctuations observées dans le lait de vache pourraient être dues aux facteurs alimentaires et environnementaux (climatique) (LEYOU et BOUGUETAIB, 2014) mais aussi à l'âge et au stade de lactation (GHAOUES, 2010).

La teneur faible en lactose enregistrée pour le lait cru comparativement aux laits pasteurisés et le lait stérilisé pourrait être expliquée par l'action des micro-organismes qui dégradent le lactose et qui est plus importante dans le lait cru (CHETHOUNA, 2011).

2.2.1.3. Teneur en vitamine C

La teneur en vitamine C mesurée dans le lait de vache cru est élevée par rapport au lait pasteurisé et au lait stérilisé UHT (18,37 mg/l \pm 0,13 ; 18,11 mg/l \pm 1,83 et 17,34 mg/l \pm 0,77 respectivement). Les résultats obtenus dans la présente étude sur le lait cru se concordent avec ceux rapportés par BOUDJENAH HAROUN (2012) (18 mg/l). Cette valeur est, toutefois, inférieure à celle notée par SENOUSSE (2011) (20,26 mg/l) et par CHETHOUNA (2011) (20 mg/l). Ces variations seraient dues à l'âge, la saison, le stade de lactation et l'alimentation (GHAOUES, 2011).

Les teneurs faibles en vitamine C enregistrées dans les laits traités (UHT et pasteurisé) seraient dues principalement au chauffage appliqué.

2.2.2. Essais de séparation et de purification des protéines du lait

2.2.2.1. Essai de purification des protéines sériques

Nous avons essayé de fractionner les protéines sériques bovines en une seule étape par chromatographie de perméation sur sephacryl S 100, les fractions éluées correspondent aux pics des absorbance à 280nm à des temps croissants (I, II, III, IV, V) (figure 13).

Le contrôle de la pureté des fractions obtenues est effectué par PAGE-SDS. Le profil électrophorétique en figure (13) contient le témoin négatif (TN) des protéines sériques bovines et les cinq fractions issues de la chromatographie de perméation ; pistes : I, II, III, IV, V.

On note que la piste II contient toutes les bandes correspondantes aux protéines sériques, on déduit que la fraction II renferme la presque totalité des protéines sériques.

En revanche, la piste III contient une bande de faible intensité correspondant à une partie de la β -lactoglobuline.

Ce résultat est attribué au débit choisi lors de la séparation, un débit plus faible aurait permis une meilleure séparation des protéines sériques.

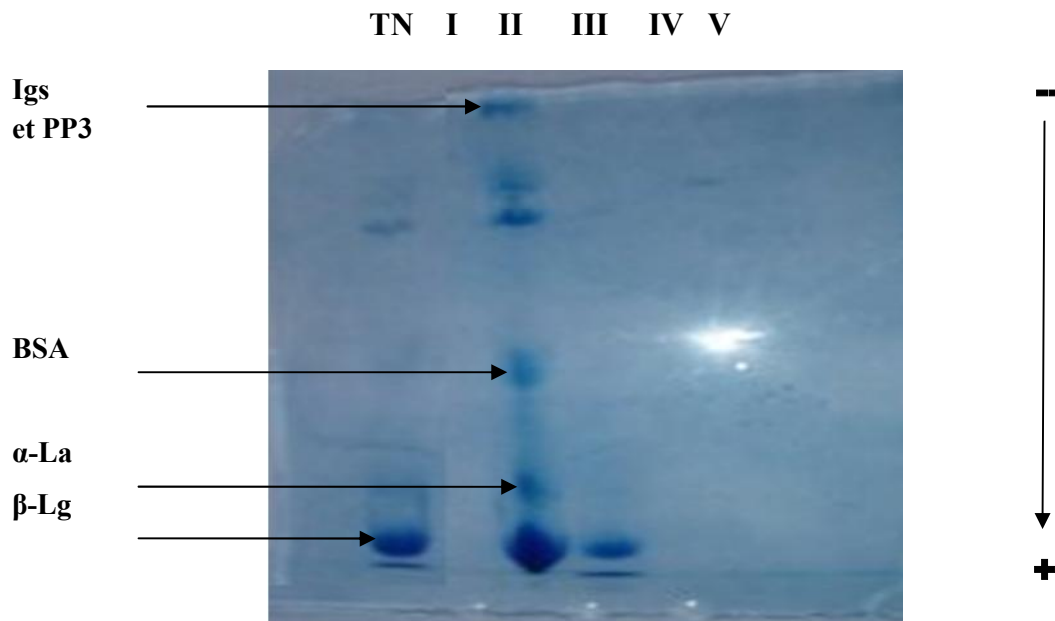


Figure 13 : Profil électrophorétique en PAGE- native des fractions éluées I, II, III, IV et V issues de la chromatographie de perméation des protéines sériques bovines sur Sephacryl S100, tampon Tris-HCL 0,02 M ; pH 8,4 ; T =12% ; C = 2,7%

2.2.3. Sensibilité des protéines du lait à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine.

2.2.3.1. Sensibilité des protéines sériques à l'hydrolyse enzymatique

L'électrophorèse en PAGE-SDS dans les conditions dénaturantes et dissociantes a été réalisée pour une étude qualitative des différents hydrolysats tryptiques des protéines sériques bovines, un témoin négatif est utilisé pour permettre une comparaison avec les composants des hydrolysats formés.

Le profil électrophorétique en figure (14) contient les protéines sériques natives (témoin négatif) ainsi que les échantillons prélevés dans les temps T0, T1, T2, T3 et T4 correspondant à 0mn, 15mn, 30mn, 60mn et 120mn.

La trypsine est une endopeptidase d'origine pancréatique participant à la digestion des protéines. Elle est active à un pH optimal de 7,7 et à une température proche de celle du corps humain, soit entre 37 et 40°C (FRITCHE, 2003). La trypsine agit sur les liaisons peptidiques dont le groupement carboxylique provient de la lysine ou de l'arginine.

Il faut noter que la faible intensité de l'une des bandes des échantillons s'explique par sa faible teneur, suite à son hydrolyse par la trypsine. En effet, on remarque que la bande correspondant au témoin négatif est d'une intensité maximale, c'est le cas des bandes correspondant à la simulation (protéines sériques non traitées par la trypsine et non incubées) et à celles correspondant au T0 où l'enzyme n'a pas encore débuté son action d'hydrolyse.

On note une diminution de l'intensité de quelques bandes à partir de T1 allant jusqu'à T4 où l'hydrolyse est maximale. Ces bandes correspondent aux protéines sensibles à l'action de la trypsine : l'albumine sérique bovine et les immunoglobulines.

Une faible diminution dans le temps de l'intensité des bandes correspondant à l' α -La montre que cette dernière a subi une action d'hydrolyse par la trypsine mais qui reste faible. La trypsine ne peut attaquer que quelques sites qui lui sont accessibles à la surface de l' α -La et qui sont donc plus ou moins accessibles selon que la protéine est désaminée ou native (SI AHMED, 2015).

On note toutefois, la persistance de la bande correspondant à la β -lactoglobuline et l'absence des peptides traduisant la forte résistance de la β -La à l'action de la trypsine. Au fait l' α -La et la β -Lg sont connues pour leur forte résistance à la digestion enzymatique (SALAH, 2008).

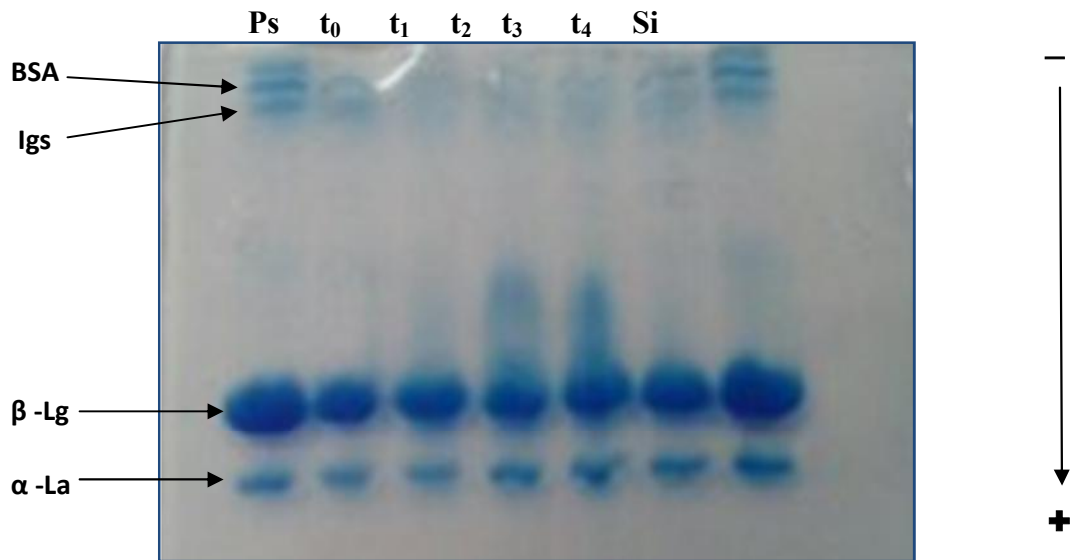


Figure 14 : Electrophorègramme en PAGE-SDS des protéines sériques bovines après traitement enzymatique par la trypsine (t_0 à 0min, t_1 après 15min, t_2 après 30min, t_3 après 60min et t_4 après 60min) Ps :protéines sériques ; Si : simulation

2.2.3.2. Sensibilité des caséines à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine

L'électrophorèse en PAGE-SDS a été menée pour une étude qualitative des différents hydrolysats tryptiques. Le profil électrophorétique obtenu en figure (15) contient les échantillons t_0 , t_1 , t_2 , t_3 et t_4 de caséines qui ont subis un traitement enzymatique par la trypsine à des temps respectives de 0mn, 15mn, 30mn, 60mn et 120mn ainsi que la simulation.

Les pistes correspondantes à la simulation et à t_0 contiennent des bandes correspondantes aux caséines bovines indiquant leur présence.

On note une disparition subite des bandes à t_1 (15mn) qui persiste jusqu'à t_4 . Cette disparition est due à l'hydrolyse totale des caséines par la trypsine qui génère des peptides de faibles poids moléculaire non retenus par le gel.

L'hydrolyse de toutes les bandes à t_1 suggère la forte activité de cette enzyme sur les caséines.

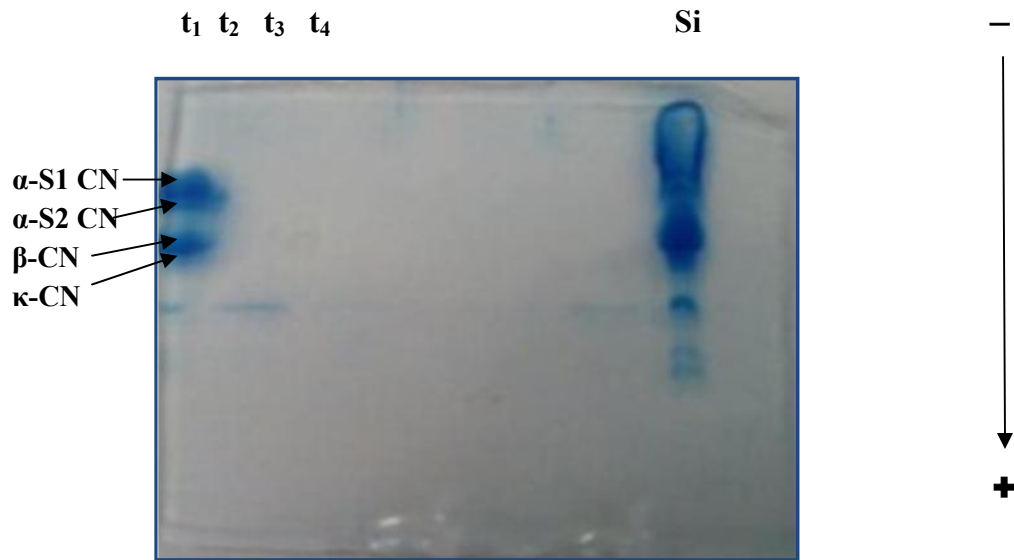


Figure 15 : Electrophorègramme en PAGE-SDS des caséines bovines après traitement enzymatique par la trypsine (T0 à 0s, T1 après 15mn, T2 après 30mn, T3 après 60mn et T4 après 120mn) Si : simulation

Toutes les caséines sont sensibles à l'action de la trypsine, ceci est dû principalement à la structure des caséines en pelote statistique qui rend les sites de coupures de la trypsine accessibles. Par contre, les protéines sériques, notamment la β -Lg et l' α -La, sont résistantes à son action en raison de la structure globulaire de ces dernières qui ne permet à la trypsine d'accéder qu'aux quelques situés si à la surface de ces protéines.

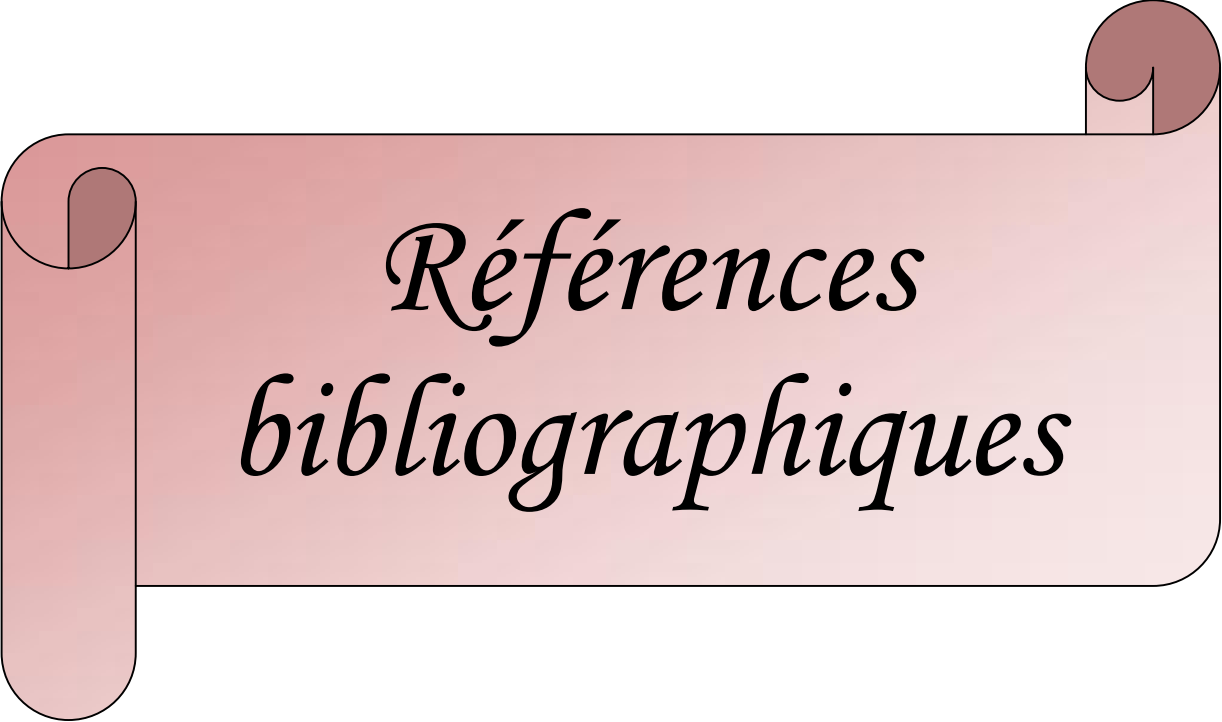
Conclusion

Le lait est un produit de composition complexe qui permet de couvrir les besoins énergétiques et nutritionnels du corps. Le lait de vache est caractérisé par sa teneur importante en lactose ($45,65 \text{ g/l} \pm 0,12$), en protéines ($34,25 \text{ g/l} \pm 3,18$) et en vitamine C ($18,37 \text{ mg/l} \pm 0,13$).

Divers traitements technologiques tel que la pasteurisation, stérilisation UHT, reconstitution sont utilisés afin de conserver le lait et le rendre disponible dans le temps et dans l'espace, ces traitements semblent affecter légèrement la composition du lait notamment en protéine, lactose et vitamine C. Le lait stérilisé UHT présente des teneurs en protéines, lactose et vitamine C inférieurs à celles du lait de vache cru. Cependant le lait reconstitué présente une teneur en vitamine C comparable à celle de lait de vache, une teneur en protéines inférieure et une teneur en lactose supérieure à celle enregistrée dans le lait de vache cru.

Le contrôle électrophorétique par PAGE-native des fractions obtenues lors des essais de séparation des séroprotéines par chromatographie de perméation sur gel de sephacryl S 100 a aboutit à des résultats non satisfaisants, dans ce cas des essais d'optimisation des conditions de la chromatographie d'autres méthodes de purification sont nécessaires.

L'étude de la sensibilité des protéines laitières à l'action de la trypsine a montré que les caséines sont plus sensibles que les protéines sériques, ceci est le résultat des différences structurales qui existent entre ces deux groupes de protéines



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- ABDEL-RAHIM A. G. (1987).** The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelus dromedarius*) and goat (*Capra hircus*) milk. *World Review of Animal Production*, 23, 9-11.
- ADLEROVA L., BARTOSKOVA A. et FALDYNA M. (2008).** Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53 (9), 457-468.
- AISEN P. et LISTOWSKY I. (1980).** Iron transport and storage proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 357- 393.
- ALAIS C. (1975).** Sciences du lait. Principes des techniques laitières. Edition Sepaic, Paris.
- ANDREWS A. T., WILLIAMS R. J., BROWNSSELL V. L. et ISGROVE F. H. (2006).** β -CN-5P and β -CN-4P component of bovine milk proteose peptone : large preparation and influence on the growth of cariogenic microorganisms. *Food Chemistry*, 96, 234-241.
- BALDI A., POLITIS I., PECORINI C., FUSI E., CHRONOPOULOU R. et DELL'ORTO V. (2005).** Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal eco system. *Journal of Dairy Research*, 72, 66-72.
- BARLOWSKA J., KROL J., LITWINCZUK Z. et SZWAJKOWSKA M. (2011).** Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 191-302.
- BAYFORD C. (2010).** Whey protein: a functional food. BSc (Hons) Nutritional Therapy.
- BEN KERROUM N. (2008).** Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4856-4867.
- BLANC B. (1982).** Les protéines du lait à activité enzymatique et hormonale. Le Lait, INRA Editions, 62, 350-395.
- BOS C., GAUDICHON C. et Tome D. (2000).** Nutritional and physiological criteria in the assessment of milk protein quality for humans. *Journal of American Collage of Nutrition*. 19,191-205.
- BROCK J. H. (1980).** Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. *Archives of Disease in Childhood*, 55, 417-421.
- BROGDEN K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250.
- BROWNLOW S., MORAIS J. H., COOPER R., FLOWER D. R., YEWDALL S. J., POLIKARPOV I., NORT A.C. et SAWYER L. (1997).** Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - Still an enigmatic lipocalin, *Structure*, 5(4), 481-495.

- BRUMINI D., CRISCIONE A., BORDONARO S., VEGARUD G. E. et MARLETTA D. (2016).** Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk. *Dairy Science & Technology*, 96, 1–14.
- CAMPAGNA S. MATHOT A. G., FLEURY Y., GUILLARD G. M. et GUILLARD G. L. (2004).** Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose-peptone. *Journal of Dairy Science*, 87, 1621-1626.
- CAYOT P. et LORIENT D. (1998).** Structure et technofonctions des protéines du lait. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris.
- CHEANG B. et ZYDNEY A. L. (2003).** Separation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin using membrane ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 83 (2), 201-209.
- CHETHOUNA F. (2011).** Etude des caractéristiques physico-chimiques, biochimiques et la qualité microbiologique du lait camelin pasteurisé, en comparaison avec le lait camelin cru. Mémoire de Magister. Université Kasdi merbah, Ouergla, Algérie.
- CHIBBAH A. (2011).** Extraction et caractérisation électrophorétique des protéines membranaires du globule gras du lait de chamelle. Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammemri-Tizi Ouzou, Algérie.
- COURTET LEYMARIOS F. (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et des ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour le doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'alfort paris, France.
- DALEY L. P., GAGLIARDO L. F., DUFFY M.S., SMITH M. C. et APPELTON J. A. (2005).** Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations in heavy chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12 (3), 380-386.
- DASHPER S.G., LIU S., WALSH K.A., ADAMS G.G, STANTON D.P., WARD B.R., SHEN P., O'BRIEN-SIMPSON N.M. et REYNOLDS E.C. (2013).** *Streptococcus mutans* biofilm disruption by k-casein glycopeptid. *Journal of diary*, 2054, 1-7.
- DESMYTER A., DECANNIERE K., MUYLDERMANS S. et WYNS L. (2001).** Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (28), 26285–26290.
- EDGE J. (2005).** Benefits and Potential Risks of the Lactoperoxidase System of Raw Milk Preservation : Report of an FAO/WHO Technical Meeting, FAO Headquarters, Rome.
- EL-AGAMY E. I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C. P. et ASSAF R. (1996).** Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, 6, 129-145.
- EL-AGEMY E.I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68: 277-232.

- EL-HATEMI H., GIRADET J., GUILLARD J. L., YAHYAOUI M. H. et ATTIA H. (2007).** Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, 70, 267-271.
- FARIAS M.E., MARTINEZ M.J. et PILOSOFF A.M.R. (2010).** Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, 79–88.
- FARNAUD S. et EVANS R. W. (2003).** Lactoferrin a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, 395-405.
- FRITCHE R. (2003).** Role for technology for dairy allergy. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 89-91.
- FROC J., GILBERT J., DALIPHAR T., et DURAND P. (1988).** Composition et qualité technologique des laits de vaches Normandes et Pie-Noires. INRA Productions animales, 1 (3), 171-177.
- GAIANI C. (2006).** Etude des mécanismes de réhydratation des poudres laitières : influence de la structure et de la composition des poudres. Thèse de doctorat à l'institut national polytechnique de LORRAINE. France.
- GHAOUES S. (2011).** Evaluation de la qualité physico-chimique et organoleptique de cinq marques de laits reconstitués partiellement écrémés commercialisés dans l'est de l'Algérie. Mémoire de Magister. Université MENTOURI, Constantine, Algérie.
- GIFFORD J. L., HUMTER H. N. et VOGEL H. J. (2005).** Lactoferrin: a lactoferrin derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2588-2598.
- GINGER M. R. et GRIGOR M. R. (1999).** Comparative aspects of milk caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*, 124, 133-145.
- GIRARDET G. M. (1992).** Le composant PP3 des protéose peptones du lait bovin : obtention, origine, étude de sa partie glycanique, rôle dans la lipolyse Thèse de doctorat: Université de Nancy I. France.
- GOLDSBY R. A., KINDT T. J. et OSBORNE B. A. (2000).** Kuby Immunology. 4ème Ed, W H Freeman et Co, New York.
- GRENBY T.H., ANDREWS A.T., MISTRY M. et WILLIAMS R. J. H. (2001).** Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations *in vitro*. *Journal of Dentistry*, 29, 83-92.
- HAMBRAEUS L. (1982).** Nutritional aspects of milk proteins. *Journal of Food and Nutrition*, 39, 1-13.
- HAMERS CASTERMAN C., ATARHOUCHE T., MUYEDERMANS S., ROBINSON G., HAMERS C., BAJYANA SONGA E., BENDAHMANN N. et HAMERS R. (1993).** Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-448.
- HAQUE L. et CHAND R. (2008).** Antihypertensive and antimicrobial bioactive peptides from milk proteins. *European Food Research and Technology*, 227(1), 7-15.

- HAUG A., HOSTMARK A. T. et HARSTADI O. M. (2007).** Bovine milk in human nutrition. *Lipids in Health and Disease*, 2, 1-16.
- HERNANDEZ-LEDESMA B., RECIO I. et AMIGO L. (2008).** β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35, 257–265.
- HURLEY W. L. et THEIL K. T. (2011).** Perspectives of immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, 3, 442-474.
- HUSSAIN R. (2012).** Caractérisation multi-niveau de protéines laitières : influence de l'environnement ionique et de la température. Thèse de doctorat à l'université de LORRAINE.
- ISABELLE D. D. (2000).** Rôle de la lactoferrine dans la maturation des cellules T. Université des sciences et technologie de Lille, Lille, France.
- IWAMORI T., NUKUMI N., ITOH K., KANO K., NAITO K., KUROHMAROU M., YAMANOUCHI K. et TOJO H. (2010).** Biostatic activity of whey acidic protein. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(5), 621–625.
- JABHARI S., HASANI R., KAFILZADEH F. et JANFESHAN S. (2012).** Antimicrobial Peptides from Milk Proteins: *A Prospectus*. *Annals of Biological Research*, 3 (11), 5313-5318.
- KAPPELER S., ACKERMAN M., FARAH Z. et PUHAN Z. (1998).** Sequence analysis of camel lactoferrine. *International Dairy Journal*, 9, 481-486.
- KAPPELER S., HENBERGER C., FARAH Z. et PUHAN Z. (2004).** Expression of the
- KONUSPAYEVA G., LOISEAU G. et FAYE B. (2004).** La plus value « santé » du lait de chamelle cru et fermenté : l'expérience de Kazakhstan, Rencontre Recherche Ruminants, 11, 47-50.
- KRIOU H. et KASRIA O. (2015).** Influence de la température de stockage sur la qualité du lait de vache (Lait entier, partiellement écrémé et écrémé) pasteurisé conditionné et le lait reconstitué conditionné. Mémoire de Master. Université Djilali bounaama, Khemis miliana, Algérie.
- KROL J., Brodziak A., Litwińczuk Z. et Barłowska J. (2012).** Selected Factors Determining the Content of Lactoferrin, Lysozyme and Immunoglobulins G in Bovine Milk. *A search of antibacterial agents*, 108-124.
- KUMAR M., ARORA S., MOROTTA F., JAIN S. et YADAV H. (2010).** Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Function*, 2, 18-27.

- LAHOV E. et REGELSON W. (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chemistry and Toxicity*, 34 (1), 131-145.
- LEBRUN D. et LEQUET A. (1985).** Relations entre les régimes alimentaires et la structure du gésier des termites. *Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France*, 7(3), 126-139.
- LEYOU B. F. et BOUGUETAIB H. (2014).** Evaluation de la qualité de lait de vache à partir de la qualité physico- chimique de l'eau d'abreuvement. Projet de fin d'étude d'ingénieur. Université Abu Baker Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- LIEPKE C., ZUCHT H. D., FORSSMANN et STANDKER L. (2001).** Purification of Novel Peptide Antibiotics from Human Milk. *Journal of Chromatography B*, 752, 369-377.
- LÛNNERDAL B. (2004).** Human milk proteins : Key components for the biological activity in human milk. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 554, 11-25.
- LOPEZ-EXPOSITO R. et RECIO B. (2006).** Antibacterial Activity of Peptides and Folding Variants from Milk Proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1294-1305.
- MADUREIRA R., PEREIRA C.I., GOMES A., PINTALO M.E. et MALCATA F.X. (2007).** Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.
- MAGA E.A., CULLOR J.S., SMITH W., ANDERSON G.B. et MURRAY J.D. (2006).** Human Lysozyme Expressed in the Mammary Gland of Transgenic Dairy Goats Can Inhibit the Growth of Bacteria That Cause Mastitis and the Cold-Spoilage of Milk. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 384-392.
- MAGNUSON J. S., HENRY J. F., YIP T. et WILLIAM HUTCHENS T. (1990).** Structural homology of human, bovine, and porcine milk lactoferrins, evidence of shared antigenic determinants. *Pediatric Research*, 28(2), 178-181.
- MAL G. et PATHAK K.M.L. (2010).** Camel milk and milk products. Milk & milk products.
- MANGIN S. A. P. R. (2002).** Transfert d'immunité colostrale chez le veau. Thèse de doctorat. Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, France.
- MASSCHALCK B. VAN HOUTT R., VAN HAVER E. G. R. et MICHIELS C. W (2001).** Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 339-344.
- MAZURIER J. et SPIK G. (1980).** Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochim Biophys Acta*, 629, 399-408.
- MC MAHON D. J. et BROWN R. J. (1984).** Composition, structure, and integrity of casein micelles : a review, *Journal of Dairy Science*, 67, 499-512.

- MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDEL-RAHMAN K.M. et EL-MOUGY S.A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 52, 115-122.
- MESEL H. et BOCKELMANN W. (1999).** Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Anonie van Leeuwenhoek*, 76, 207-215.
- MOORE S.A., ANDERSON B.F., GROOM C.R., HARIDAS M. et BAKER E.N. (1997).** Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 274, 222-236.
- MORADIAN F. (2014).** Lactoferrin, Isolation, Purification and Antimicrobial Effects. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3, 203-206.
- MUSAYEVA K., ŽELVYTE S. et STAKEVICIUS R. (2015).** Analysis of factors influencing immunoglobulin G in concentration in milk of dairy cows. *Veterinarija ir Zootechnica*, 72 (94), 25-29.
- NAGPAL R., BEHARE P., RANA R., KUMAR A., NEELIMA, SHARMA R., SINGH RAJPUT Y. et MANN B. (2013).** Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk. *Dairy Science and Technology*, 93, 21–43.
- NORRIS G. E., ANDERSON B. F., BAKER E. N., BAKER H. M., GARTNER A. L., WARD J. et RUMBALL S. V. (1986).** Preliminary crystallographic studies on bovine lactoferrin. *Journal of Molecular Biology* 191,143-145
- OUADGHIRI M. (2009).** Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «
- PAQUET D., NEJJAR Y. et LINDEN G. (1988).** Study of hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *Journal of Dairy Science*, 71, 1464-1471.
- PARK Y.W., JUAREZ M., RAMOS M. et HAENLEIN G.F.W. (2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88–113.
- PAYENS T. A. (1982).** Les propriétés physico-chimiques des caséines alpha s1, beta et kappa. *Le Lait*, INRA Editions, 62, 306-320.
- PELLEGRINI A., THOMAS U. et BRAMAZ N. (1999).** Isolation and identification of three bactericidal domains in alpha lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1426, 439-448.
- PERRAUDIN J.P. (1991).** Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxydase. *Connaissances récemment acquises et technologies d'obtention du lait*, 71, 191-211.
- PHILLIPS S. M., TANG G. E. et MOORE D. R. (2009).** The role of milk and soy based protein in support of muscle protein synthesis and protein accretion in young and elderly person. *Journal of American Collage Nutrition*, 28(4), 343-354.
- POLJAK R. J. (1975).** The three dimensional, function and genetic controle of immunoglobulins. *Nature*, 256, 373-376.

- QIAN Z. Y., JOLLES P., MIGLIORE-SAMOUR D. et FIAT A. M. (1995).** Isolation and characterization of sheep lactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1243, 25-32.
- RAJAONARY M. (2014).** Étude des effets d'un extrait de peptides du lait sur la réponse immune chez la souris saine. Mémoire de fin d'étude à l'université de LAVAL, Québec, CANADA.
- RIBADEAU-DUMAS B. (1981).** Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières, *Colloque INRA-CNIEL Revue Laitière Française*, 400, 17-32.
- RIBADEAU-DUMAS B. et BRIGNON G. (1993).** Les protéines du lait des différentes espèces. Allergies alimentaires. Ed Doin, Paris, 27-39.
- ROBITAILLE G., LAPOINTE C., LECLERC D. et BRITTEN M. (2012).** Effect of pepsin-treated bovine and goat caseinomacropeptide on *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* in acidic conditions. *Journal of Dairy Science*, 9(5), 1-8.
- SALAH S. (2008).** Etude de l'hydrolyse enzymatique par la trypsine et chymosine des protéines de lactosérum bovin combinée aux rayonnements des micro-ondes. Mémoire de Magister. Université d'Oran Es-sénia, Oran, Algérie.
- SANGIOVANNI J. P. et MEHTA S. (2009).** Variation in lipid-associated genes as they relate to risk of advanced age-related macular degeneration. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 99, 105- 163.
- SCHER J. (1988).** Contribution à l'étude de l'influence de la composition du lait et de la taille des micelles sur la coagulation enzymatique : approche statistique et phénoménologique, Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine. France.
- SEIFU E., BUYS E. M., DONKIN E. F. et PETZER I. M. (2003).** Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control*, 15, 447–452.
- SEKI M., MATSURA R., IWAMORI T., NUKUMI N., YAMANOUCHI K., KANO K., NAITO K. et TOJO H. (2012).** Identification of whey acidic protein (WAY) in dogs. *Experemental Animals*. 61(1), 67–70.
- SENOUSSI C. (2011).** Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien : essais de séparation et de caractérisation de la fraction protéoses péptones. Mémoire de Magister. Université Mouloud mammeri, Tizi Ouzou, Algérie.
- SHARMA P., SINGH N., SINHA M., SHARMA S., PERBANDT M, BETZEL C., KAUR P., SRINIVASAN A., TEJ P et SINGH H. (2008).**Crystal structure of the peptidoglycan recognition protein at 1,8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 378 (4), 423-432.
- SHARMA S., SINGH A. K., KAUSHIK S., SINHA M., SINGH R. P., SHARMA P., SIROHI H., KAUR P et SINGH T. P. (2013).** Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 4(3), 108-128.

- SI AHMED ZENNIA S. (2015).** Isolement et séparation des protéines sériques du lait de chamelle : mise en évidence de phénomène de désamidation de l' α -Lactalbumine ; conséquences sur la stabilité structurale. Thèse de doctorat. Université Mouloud mammeri, Tizi ousou, Algérie.
- SIBOUKEUR O. (2007).** Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse de Doctorat. Institut national agronomique El harrach, Alger, Algérie.
- SILVA S.V. et MALCATA F.X. (2003).** Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1–15.
- SIMPSON T., RINGANATHAN S., FISHER J. A. JENSSENS P. A., CHAN D. C. et NICOLAS K. R. (2000).** A gene for a novel member of the whey acidic protein family, *Journal of Biological Chemistry*, 30 (275), 23074-23075.
- SMITHERS G.W. (2008).** Protéines à activités biologiques : lactoferrine et lactoperoxydase.
- SMOLENSKI G., HAINS S., KWAN F.Y.S., BOND J., FARR V.D., STEPHAN R., STELWAGEN K. et WHEELER T.T. (2007).** Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 207-215.
- SMVS' Dairy Year Book*, 97-103.
- SZWAJKOWSKA M., WOLANCIUK A., BARLOWSKA J., KROH J. et LITWINCZUK Z. (2011).** Bovine milk proteins as the source of bioactive peptides influencing the consumers' immune system. *Animal Science Papers and Reports*, 29, 269-280.
- TACKOEN M. (2012).** Le lait maternelle : Composition nutritionnelle et propriétés fonctionnelles. *Revue Médicale de Bruxelles*, 33, 17-309.
- UGUZ M. T. et OZDEMIR H. (2005).** Purification of bovine milk lactoperoxydase and investigation of antibacterial properties of thiocyanates mediated. *Applied Biochemistry and microbiology*, 41 (4), 349-353.
- VAN DE PERRE P. (2003).** Transfer of antibody via mother's milk. *Vaccine*, 21(24), 3374-3380.
- VAULONT S. et SCHALK I. (2015).** Rôles des sidérophores bactériens et de mammifères dans les interactions hôtes-pathogènes. *Medical Sciences*, 31, 756–763.
- VEIGA P., PIQUET S., MAISONS A., FURLAN S., COURTIN P., CHAPOTCHARTIER M. P. et KULAKAUSKAS S. (2006).** Identification of an essential gene responsible for d-Aspin incorporation in the *Lactococcus lactis* peptidoglycan crossbridge. *Molecular Microbiology*, 62, 1713-1724.
- VEISSEYRE R. (1975).** Technologie du lait. La maison rustique, Paris.
- WATTIAUX. (1996).** Milk secretion in the udder of a dairy cow. *Diary essentials*, 77-80.
- WOOF G. M. et MESTECKY J. (2005).** Mucosal immunoglobulins. *Immunological Reviews*, 206, 64–82.

ZUCHT H. D., RAIDA M. et ADERMANN K. (1995). Casocidin-I: a casein-alpha s2 derived peptide exhibits antibacterial activity. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 372, 185-188.