

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE



## Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

### *Thème*

*Etude comparative des activités  
coagulantes et protéolytiques des  
extraits issus des caillettes de  
dromadaires non sevrés et adultes*

Présenté par :

**SALAH Soraya**

**YETTOU Sassia**

Soutenu le : **12/09/2018**

**Présidente : Mme Dermeche S**

**Maitre assistante A(UMMTO)**

**Examineur : Mme Ghezali Senoussi C**

**Maitre assistante A(UMMTO)**

**Examineur : Mme SebbaneAlmi D**

**Maitre assistante A(UMMTO)**

**Encadreur : Mme TamacheIsselnane S Maitre assistante A(UMMTO)**

## Remerciements

*Avant tout, louange à Dieu le tout puissant qui nous a éclairé le chemin de la réussite et nous a donné le courage, la volonté, la santé et la force pour réaliser ce présent travail.*

*Nous remercions particulièrement M<sup>me</sup> ISSELNANE-TAMACHE Souad, notre merveilleuse promotrice, pour avoir proposé et dirigé ce travail, pour ses conseils avisés, son aide précieuse, sa disponibilité et surtout sa patience avec nous.*

*Nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance à M<sup>me</sup> Samia DERMECHE de nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nous sommes reconnaissants à M<sup>me</sup> ALMI-SEBBANE Dalila d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner notre travail.*

*Nous sommes reconnaissants à M<sup>me</sup> SENOUSSI-GHEZALI Chahra d'avoir accepté d'évaluer et d'examiner notre travail.*

*Nous remercions également le personnel du laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou pour leurs aides, leurs conseils et le soutien qu'ils nous ont accordé durant l'élaboration de l'expérimentation de ce travail.*

*Nos grands remerciements sont adressés à nos familles et nos amis, qui sans leurs encouragements et soutien inconditionnel, ce travail n'aurait pas progressé.*

*Que tous ceux et celles qui ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurés de notre sincère reconnaissance et profonde gratitude,*

MERCI

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chères parents AREZKI et HASSINA*

*A mes sœurs : LYDIA et CELINA*

*A mon frère CHABANE*

*A mes deux familles : SALAHI et BEN-ZIANE*

*A mes meilleures amies : AMEL, DJAZIA, KENZA,  
OUIZA, SABRINA, YASMINE, ZINEB, SASSIA,  
THINHINANE, SONIA et WARDA*

*A la personne qui m'a aidé sans aucune hésitation*

*A toute personne qui a prié pour moi avec sincérité.*

*SALAHIS*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chères mère et grand père LILA et SALEM*

*A mes sœurs : MELISSA et SADIA*

*A mes deux familles : YETTOU et MOUICI*

*A mes meilleures amis (es) : WALID, DJIDJI, TINA,  
MASSISSILYA, NASSIMA, ZOZO, SOUAD,  
SOUSSOU, SONIA, TINHINANE, LINA et  
TAMAZOUZI*

*A toute personne qui a prié pour moi avec sincérité.*

*YETTOU S*

## Sommaire

<b>Liste des tableaux</b>	
<b>AP</b>	Activité protéolytique
<b>BSA</b>	Sérum albumine bovine
<b>CBR</b>	Chymosine bovine recombinante
<b>CMP</b>	Caséinomacropeptide
<b>DO</b>	Densité optique
<b>ECD</b>	Extraits issus des caillettes de dromadaires
<b>ECD NS</b>	Extraits issus des caillettes de dromadaires non sevrés
<b>ECD A</b>	Extraits issus des caillettes de dromadaires adultes
<b>FAO</b>	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>k-CN</b>	Caséine kappa
<b>LABAB</b>	Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies
<b>MM</b>	Masse moléculaire
<b>2-ME</b>	2-mercaptoéthanol
<b>P/V</b>	Poid / Volume
<b>PAGE</b>	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>PP</b>	Pepsine porcine
<b>pHi</b>	pH isoélectrique
<b>PM</b>	Poids moléculaire
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficient de corrélation
<b>SDS</b>	Sodium Dodécylsulfate
<b>TCA</b>	Acide trichloracétique
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'- tétramethyl- éthylène diamine
<b>Tris</b>	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
<b>UP</b>	Unité présure
<b>V/V</b>	Volume / Volume

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<b>Tableau I</b>	Composition globale du lait de chamelle par rapport au lait de vache.	<b>07</b>
<b>Tableau II</b>	Caractéristiques physico-chimiques de la κcaséine bovine et de la caséine κcameline.	<b>08</b>
<b>Tableau III</b>	Principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine bovine.	<b>14</b>
<b>Tableau IV</b>	Caillettes de dromadaires utilisées.	<b>23</b>
<b>Tableau V</b>	Rendement d'extraction et concentration en protéines pour les deux ECD non sevré et adulte	<b>36</b>
<b>Tableau VI</b>	Activité coagulante (UP) des deux ECD.	<b>36</b>
<b>Tableau VII</b>	Rapport AC/AP pour les extraits coagulants.	<b>44</b>

### Liste des figures

<i>Figures</i>	<i>Titre</i>	<i>Pages</i>
<b>Figure 01</b>	Anatomie de l'estomac d'un ruminant (a) et d'un camélidé (b).	<b>06</b>
<b>Figure 02</b>	Comparaison des sites d'hydrolyse par la chymosine au niveau des caséines- $\kappa$ cameline et bovine	<b>08</b>
<b>Figure 03</b>	Structure par rayon X de la pepsine porcine, diagramme en ruban.	<b>15</b>
<b>Figure 04</b>	Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante (a) et cameline recombinante (b).	<b>16</b>
<b>Figure 05</b>	Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus Asp du site actif avec la molécule d'eau qui leur est liée.	<b>17</b>
<b>Figure 06</b>	Mécanisme catalytique des protéases aspartiques	<b>19</b>
<b>Figure 07</b>	Phases de coagulation enzymatique du lait.	<b>21</b>
<b>Figure 08</b>	Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977) pour le bovin, et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaires.	<b>26</b>
<b>Figure 09</b>	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et <i>al</i> (1951).	<b>27</b>
<b>Figure 10</b>	Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN et <i>al</i> (1977).	<b>29</b>
<b>Figure 11</b>	Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait bovin (SCHAMET et <i>al</i> , 1992) et du lait camelin (WONGOHO et <i>al</i> , 1998).	<b>31</b>
<b>Figure 12</b>	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et <i>al</i> (1951).	<b>32</b>
<b>Figure 13</b>	Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS établie en utilisant un standard protéique.	<b>35</b>
<b>Figure 14</b>	Influence de la température sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.	<b>38</b>
<b>Figure 15</b>	Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.	<b>40</b>
<b>Figure 16</b>	Influence de la concentration en CaCl <sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.	<b>41</b>
<b>Figure 17</b>	Le taux de peptides issus de la protéolyse des caséines bovines et camelines par les ECD NS, ECD A, PP et CBR.	<b>43</b>
<b>Figure 18</b>	Profil électrophorétique en PAGE-SDS avec $\beta$ -ME des extraits de caillettes de dromadaires.	<b>46</b>

### Liste des annexes

<i>Annexes</i>	<i>Titre</i>
<b>Annexe 01</b>	Répartition et effectifs camelins Afrique et Asie (Milliers de têtes).
<b>Annexe 02</b>	Evolution des effectifs camelins en Algérie.
<b>Annexe 03</b>	Les espèces laitières dans le monde.
<b>Annexe 04</b>	La part du lait de chamelle dans le monde.
<b>Annexe 05</b>	Les sacs glandulaires.
<b>Annexe 06</b>	Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> (1951).
<b>Annexe 07</b>	Mesure de l'activité protéolytique.
<b>Annexe 08</b>	Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).

## Résumé :

Le dromadaire (*Camelusdromedarius*) est un animal particulièrement adapté aux rudes conditions agro-climatiques des régions arides et semi-arides. Son lait possède de faible aptitude à la transformation en produits dérivés, notamment en fromage. Dans ce cadre, des travaux concluants ont montré que l'extrait issu de caillettes de dromadaires adultes (ECD A) est le plus indiqués pour avoir une activité coagulante satisfaisante. Notre travail a consisté à caractériser d'avantage cet extrait en le comparant à ceux issus de dromadaires non sevrés (ECD NS). L'ECD NS se caractérise par une activité coagulante (12,5 UP) légèrement supérieure à celle de l'extrait de caillette de dromadaire adulte (ECD A) (9,09 UP), tandis que ce dernier possède une activité protéolytique plus faible envers les caséines bovines et camelines. L'activité coagulante maximale des deux extraits était obtenue à des températures de 60°C, un pH de 5,5 et une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,05 M. L'électrophorèse en PAGE-SDS a montré que l'ECD A renfermait une bande principale ayant une MM de 41,51 kDa qui correspondrait à la pepsine. Cette dernière est faiblement apparue dans l'ECD NS.

**Mots clés :** dromadaire, caillettes, extraits coagulants, activité coagulante, activité protéolytique, électrophorèse.

## Abstract


The camel (*Camelusdromedarius*) is an animal particularly adapted to the harsh agro-climatic conditions of the arid and semi-arid regions. Its milk has low aptitude for processing into derived products, especially cheese. In this context, conclusive work has shown that the crude enzymatic extract derived from adult camel abomasum (ECD A 13 months) is most indicated to have a satisfactory milk clotting activity. Our work has been to further characterize this extract by comparing it with those from unweaned dromedaries (ECD NS 8-year-old). The ECD NS is characterized by slightly higher milk clotting activity (12.5 UP) than adult camel extract (ECD A) (9.09 UP), while the latter has lower proteolytic activity towards bovine and camelin caseins. The maximum milk clotting activity of both extracts was obtained at temperatures of 60 °C, at pH of 5.5 and at CaCl<sub>2</sub> concentration of 0.05M. SDS-PAGE showed that ECD A contained a main band with a MM of 41.51 kDa which may correspond to pepsin. This band has weakly appeared in the ECD NS.

**Key words:** dromedary, abomasum, crude enzymatic extracts, milk clotting activity, proteolytic activity, electrophoresis.

## Table des matières

<b>Introduction générale</b>	<b>01</b>
<b>Partie 01 :Synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Généralités</b>	<b>03</b>
1.1. L'effectif camelin	<b>03</b>
1.2. Production laitière	<b>03</b>
1.3. Anatomie et physiologie de l'estomac du dromadaire	<b>04</b>
<b>2. La caséine <math>\kappa</math></b>	<b>06</b>
<b>3. Les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie</b>	<b>09</b>
3.1. Différentes sources d'enzymes coagulantes	<b>09</b>
3.1.1. Les enzymes coagulantes microbiennes	<b>09</b>
3.1.2. La chymosine recombinante	<b>10</b>
3.1.3. Les enzymes coagulantes végétales	<b>10</b>
3.1.4. Les enzymes coagulantes d'origine animale	<b>11</b>
3.1.4.1. Les facteurs influençant la production d'enzymes	<b>12</b>
3.1.4.2. La chymosine	<b>12</b>
3.1.4.3. La pepsine	<b>12</b>
3.2. Etude des structures d'enzymes coagulantes d'origine animale	<b>13</b>
3.2.1. Structure primaire	<b>13</b>
3.2.2. Structure secondaire et tertiaire	<b>15</b>
3.3. Site actif et mécanisme catalytique des enzymes coagulantes d'origine animale	<b>16</b>
3.3.1. Le site actif	<b>16</b>
3.3.2. Mécanisme catalytique	<b>18</b>
3.4. La coagulation	<b>19</b>
3.4.1. La coagulation enzymatique	<b>19</b>
3.4.2. La coagulation acide	<b>21</b>
3.5. Aptitude du lait camelin à la coagulation	<b>22</b>
<b>Partie 02 : Partie expérimentale</b>	
<b>1. Matériel et méthodes</b>	
1.1. Matériel	<b>23</b>
1.1.1. Matériel biologique	<b>23</b>
1.1.2. Appareillage	<b>24</b>
1.1.3. Le petit matériel	<b>24</b>

1.1.4. Produits chimiques et réactifs	24
1.2. Méthodes	24
1.2.1. Extraction des enzymes coagulantes	24
1.2.2. Calcul du rendement d'extraction	25
1.2.3. Caractérisation des extraits coagulants	27
1.2.3.1. Dosage des protéines totales	27
1.2.3.2. Mesure de l'activité coagulante	28
1.2.3.2.1. Détermination de la température optimale	28
1.2.3.2.2. Détermination du pH optimal	28
1.2.3.2.3. Détermination de la concentration optimale de CaCl <sub>2</sub>	30
1.2.3.3. Mesure de l'activité protéolytique	30
1.2.4. Méthodes électrophorétiques	32
1.2.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)	32
1.2.4.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (en PAGE SDS)	33
1.2.4.3. Détermination des poids moléculaires des protéines	34
<b>2. Résultats et discussion</b>	
2.1. Rendement d'extraction des enzymes coagulantes	36
2.2. Caractérisation des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés (NS) et adultes (A)	36
2.2.1. Mesure de l'activité coagulante	36
2.2.1.1. Les facteurs affectant l'activité coagulante de l'ECD NS et de l'ECD A	37
2.2.2. Mesure de l'activité protéolytique	42
2.1.3. Le rapport activité protéolytique/ activité coagulante (AC/AP)	44
2.3. Analyse électrophorétique en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS) des extraits coagulants bruts	45
<b>Conclusion générale</b>	<b>48</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	



*Introduction  
générale*

## **Introduction générale**

De tous les animaux domestiques, le dromadaire se caractérise par ses particularités morphologiques et physiologiques en relation avec son pouvoir d'adaptation aux climats désertiques. Considéré comme un réservoir de ressources variées, il occupe une place cruciale dans la vie économique et sociale des régions sahariennes et représente un modèle biologique fabuleux pour différentes disciplines.

Le lait du dromadaire présente d'excellentes propriétés à l'avantage des populations humaines. Sa transformation en fromage est une méthode de conservation très largement utilisée dans le monde, aux plans artisanal et industriel.

La présure extraite industriellement des caillettes provenant de veaux non sevrés est l'enzyme de coagulation du lait traditionnellement utilisée en industrie fromagère. De même, l'utilisation de cette enzyme dans la coagulation du lait camelin ne donne pas des résultats satisfaisants, en raison de la composition particulière de ce lait, notamment sa faible teneur en  $\kappa$  caséines, aboutissant à un produit final non satisfaisant malgré l'emploi de concentrations élevées d'enzyme.

Cette situation a suscité de nombreux travaux de recherche pour l'obtention d'enzymes de remplacement de la présure de veau à partir d'autres sources. Par conséquent, plusieurs préparations enzymatiques d'origine animale, microbienne et végétale ont été utilisées mais sans succès.


Ces dernières années, des recherches menées par SIBOUKEUR *et al* (2005), BOUDJNAH-HAROUN *et al* (2011) et BOUDJNAH-HAROUN *et al* (2017) ont montré que les extraits issus de caillettes provenant de dromadaires possèdent un bon rapport activité coagulante/activité protéolytique (AC/AP) sur le lait camelin.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à faire une étude comparative du pouvoir coagulant et protéolytique des extraits issus de caillettes de dromadaires non sevrés et adultes.

Dans notre travail, nous avons traité, dans une première partie, des généralités sur le dromadaire, le lait, les caséines et les études faites sur les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie, particulièrement les enzymes d'origine animale.

La deuxième partie, expérimentale, porte sur les méthodes et les démarches suivies pour l'extraction et la caractérisation des extraits. Une technique électrophorétique en conditions dissociantes et dénaturantes a été mise en place afin de faire une étude comparative.

La dernière partie est consacrée à la discussion des résultats obtenus.



*Partie 01*  
*Synthèse*  
*bibliographique*

## **1. Généralités**

Le dromadaire du grecque « dromados », qui veut dire course, est une espèce de mammifère herbivore domestique appartenant à la famille des camélidés, du genre *camelus* au sein duquel existent deux espèces : *Camelusbactrianus*, donné à l'espèce de chameau à deux bosses et *Camelusdromedarius* la deuxième espèce à une seule bosse (FAYE, 2014) qui représente presque 90% de ce genre (WILSON, 1998 cité par KADIM *et al*, 2008).

Face aux changements climatiques, le dromadaire semble pouvoir s'adapter non seulement aux contraintes météorologiques (aridification du milieu), mais aussi à l'évolution des différents systèmes d'élevage et il représente ainsi un modèle animal très intéressant (FAYE *et al*, 2012 ; BABELHADJ *et al*, 2017). Il est originaire de l'Amérique du Nord où le genre *camelus* était aperçue il y a environ 40 millions d'années (BURGER, 2016). Il vit essentiellement dans les zones désertiques de l'Afrique du Nord et de l'Est, dans la péninsule arabique et en Asie du Sud-ouest et constitue une source importante de viande, de lait, de laine, de transport et de sport pour des millions de personnes (FITAK *et al*, 2016).

### **1.1. L'effectif camelin**

D'après FAYE (2014), il est difficile de déterminer avec précision le nombre de chameaux dans le monde, d'abord parce que c'est principalement un animal de nomades qui se déplacent fréquemment, et aussi parce que les chameaux ne sont généralement pas soumis à la vaccination obligatoire. Donc, un recensement exhaustif des chameaux est assez difficile.

Selon les statistiques de la FAO (2013) rapportées par KASSA (2016), il y a environ 20 millions de chameaux, dont 16 millions en Afrique et 5 millions en Asie. De cette population estimée du monde, environ 18 millions sont des (*Camelusdromedarius*) qui représentent les deux tiers de la population mondiale de chameaux. Environ 11 millions de cette espèce se trouve dans le nord-est de l'Afrique (Somalie, Soudan, Ethiopie et Kenya).

Actuellement, le dromadaire compte près de 28 millions de têtes dans le monde (FAO, 2018). Le cheptel camelin algérien a atteint 354 465 têtes en 2017 (SENOUSSI *et al*, 2017).

### **1.2. Production laitière**

A l'échelle mondiale, le lait de chamelle ne représente que 0,37% du lait produit soit 2,9 millions de tonnes (annexe 03) mais probablement sous-estimé (5-6 millions de tonnes), cette proportion n'était que de 0,18% en 1961 selon la FAO (FAYE et KONUSPAYEYA, 2017).

La Somalie est de loin le plus grand producteur du lait camelin dans le monde, suivie par le Kenya et le Mali (FAO, 2018).

Au niveau national, la production laitière des chameilles varie d'une région à l'autre, en fonction de la race, de l'individu, de l'alimentation, etc. La production de lait varie de 0,5 à 10 kg par jour. Le lait produit n'est utilisé que pour l'allaitement des chameçons et l'autoconsommation (CHEHMA, 2003).

### **1.3. Anatomie et physiologie de l'estomac du dromadaire**

Le dromadaire est l'animal domestique le mieux adapté aux conditions de vie dans les régions arides, et à la rareté de l'eau et du pâturage qui les caractérisent. Il se distingue des autres ruminants par la variété de son régime alimentaire : il peut indifféremment se nourrir de plantes herbacées, d'arbustes, de pousses d'arbres et même de cactées et de noyaux de dattes. Pendant la saison sèche, il ne dispose le plus souvent que de plantes desséchées ou épineuses, pauvres en protéines mais très riches en fibres et en cellulose (PEYRE et FABREGUES, 1989).

Plusieurs travaux (VALLENAS *et al*, 1971 ; YAGIL, 1985 ; JOUANY et KAYOULI, 1989 ; RAJI, 2011) ont montré que chez le dromadaire les particularités de la physiologie de la digestion au niveau des estomacs découlent de différences anatomiques et histologiques notables par rapport aux ruminants classiques.

Les ruminants ont la particularité de posséder quatre compartiments digestifs: le rumen (ou panse), le réseau (ou réticulum), le feuillet (ou omasum) et la caillette (ou abomasum) (Figure 01a) laquelle est l'équivalent de l'estomac d'un monogastrique (JOUANY, 2000). La forme et les connections entre les réservoirs gastriques des camélidés sont différentes (LONGO-HAMMOUDA et MOUATS, 2008).

D'après LECHNER-DOLL *et al* (1995) ; OUAJD et KAMEL (2009) ; BELLO *et al* (2014) ; GEBREYOHANES et ASSEN (2017), le dromadaire est un pseudo-ruminant possédant un estomac comprenant trois compartiments principaux : le sac du rumen, le réticulum et un troisième compartiment avec une forme intestinale comprenant la caillette (abomasum) qui n'est pas clairement séparée extérieurement de ce compartiment. Ces réservoirs gastriques sont nommés respectivement C1, C2 et C3 (Figure 01b).

#### **1.3.1. Le compartiment C1**

Il occupe plus de la moitié de l'abdomen. C'est un vaste réservoir incurvé sur lui-même (LONGO-HAMMOUDA et MOUATS, 2008). Il est partagé par un pilier central (VON

ENGELHARDT, 2006) en une partie caudale volumineuse et une autre crânienne petite qui reçoit les aliments ingérés par l'animal (JOUANY, 2000).

### **1.3.2. Le compartiment C2**

JOUANY (2000) indique que comme pour le réticulum du ruminant, C2 a un petit volume et il est étroitement associé à C1. Le compartiment 2 est tapissé sur sa plus grande partie d'une muqueuse pluristratifiée de type œsophagien (KAYOULI *et al*, 1995), riche en nodules de cellules sécrétrices de mucus (PRUD'HOM *et al*, 1993).

Sur la partie ventrale de C1 et C2 existe des sacs glandulaires distincts (ou cellules aquifères) (HOLLER *et al*, 1989) (annexe 05) qui ont un rôle similaire à celui des glandes salivaires en sécrétant un liquide complémentaire à la salive (LONGO-HAMMOUDA et MOUATS, 2008).

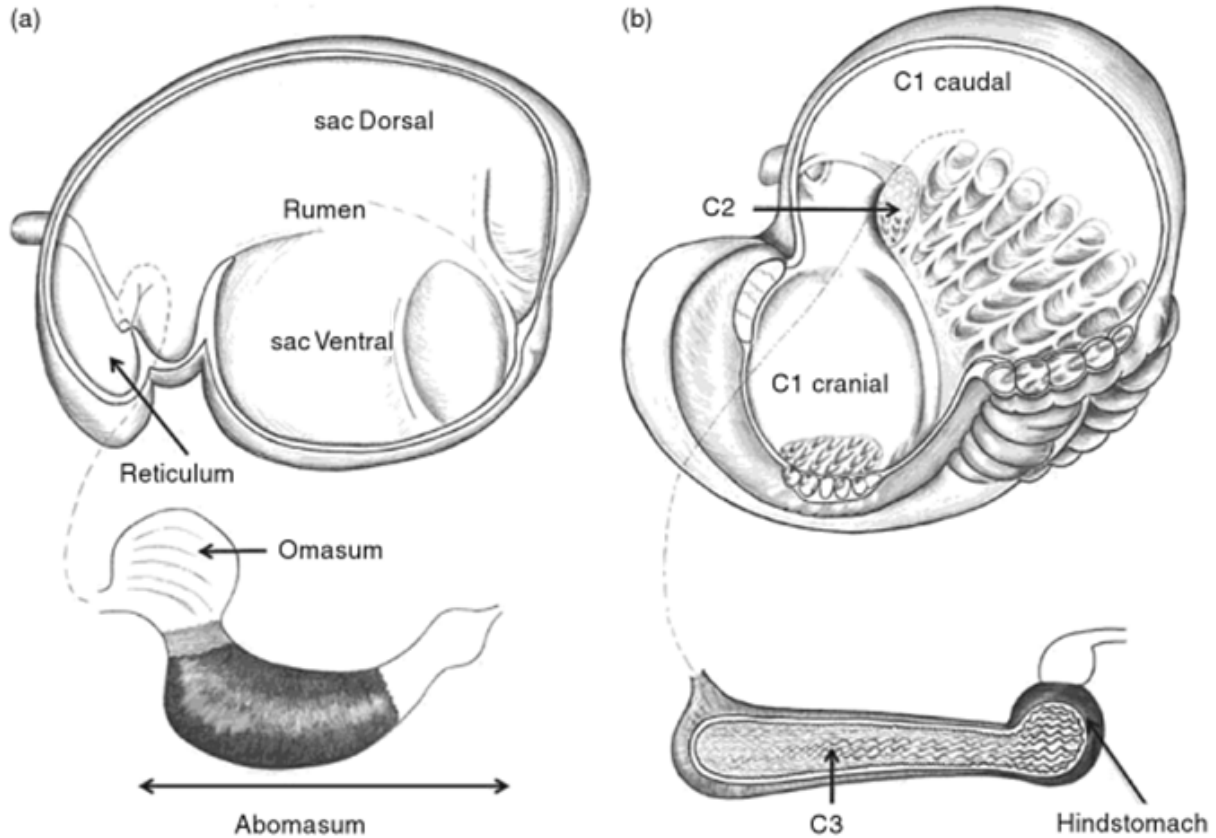
### **1.3.3. Le compartiment C3**

Il comprend trois parties : deux parties antérieures proximales et tubulaires, tapissées d'une muqueuse glandulaire (JOUANY, 2000) dédiée à la fermentation (VON ENGELHARDT, 2006) et une partie terminale considérée comme l'équivalent de la caillette des ruminants, mais plus petite (LONGO-HAMMOUDA et MOUATS, 2008). Elle présente 1/5 de la longueur de l'omasum (YAGIL, 1985) et tapissé d'une muqueuse beaucoup plus épaisse que les deux premières parties.

Comparé à la caillette des autres ruminants, qui comporte trois régions : cardiaque, fundique et pylorique (BANKS, 1993 ; DELLMAN et EURELL, 1998 cités par IBRAHIM AHMED *et al*, 2014), celle du dromadaire est divisée en quatre parties : cardiaque, pseudo-cardiaque, fundique et pylorique (WANG *et al*, 2000 ; ABDEL-MAGIED et TAHA, 2003).

La région fundique est caractérisée par la présence de glandes productrices d'enzymes et d'acide chlorhydrique comme les glandes à pepsines (JOUANY, 2000 ; TITAOUINE, 2006 ; VON ENGELHARDT, 2006).

Le pH du contenu de la caillette avoisine 6,35, tandis que celui des deux parties internes de C3 est de 3,6 (LONGO-HAMMOUDA et MOUATS, 2008).



**Figure 01 : Anatomie de l'estomac d'un ruminant (a) et d'un camélidé (b)**

**(AL JASSIM et HOGAN, 2013).**

## **2. La caséine $\kappa$ ( $\kappa$ -CN)**

Les laits sécrétés par les différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants : eau, protéines, lactose, matières grasses et minérales (CEPIL, 1987). Cependant, les proportions respectives de ces composantes varient largement d'une espèce à une autre. Ainsi, le lait camelin possède des caractéristiques qui le différencient fortement des laits de ruminants (HAZEBROUCK, 2016).

Selon *ABBAS et al* (2013), le lait de chamelle est généralement blanc opaque, a une légère odeur sucrée et un goût peu salé. Son pH se situe autour de  $6,51 \pm 0,04$  et son acidité est de l'ordre de  $17^\circ \pm 0,01$  Dornic. Sa densité est autour de  $1,03 \pm 0,01$  (DEBOUZ *et al*, 2014). Ces intervalles de variation peuvent être dus à la nature de l'élevage, l'alimentation, le stade de lactation ainsi qu'aux procédés d'analyses.

Ce lait contient des teneurs assez élevées en facteurs antibactériens (lactoferrine, lactoperoxydase et lysozyme) qui lui permettent de se conserver quelques jours à une température ambiante de 25-30°C (HAZEBROUCK, 2016). Il paraît plus pauvre en matière sèche totale, en matière protéique et surtout en caséines que le lait de vache (Tableau I).

Espèce	Matière sèche %	Graisse %	Protéines %	Lactose %	Références
cameline	12	3,5	3,1	4,4	(AL HAJ et AL KANHAL, 2010 ; FOX <i>et al</i> , 2015 cité par BERHE <i>et al</i> , 2017)
bovine	12,7	3,7	3,4	4,8	

**Tableau I : Composition globale du lait de chamelle par rapport au lait de vache.**

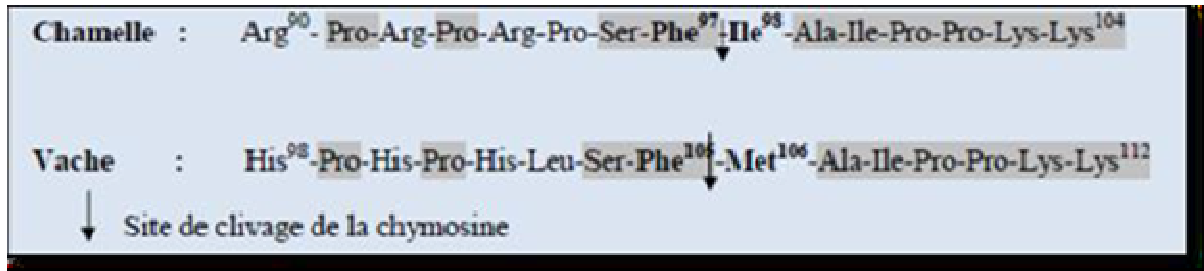
La caséine constitue la protéine caractéristique du lait et la principale composante du fromage (MEHAIA *et al*, 1995). La caséine représente 75 à 79 % de la matière protéique du lait de dromadaire contre 77 à 82 % pour le lait de vache (JENNESS et SLOAN, 1969 ;MEHAIA, 1987 ;RAMET, 2001).

Les caséines sont des phosphoprotéines (MERCIER *et al*, 1991) qui, Contrairement aux protéines solubles du lactosérum, forment des agrégats (micelles) qui sont en suspension dans le lait. Les micelles sont constituées par quatre protéines différentes : les caséines  $\alpha$ -S1,  $\alpha$ -S2,  $\beta$  et  $\kappa$ . Ces caséines sont en interaction avec une fraction minérale dont le composant prédominant est le phosphate de calcium. La composition protéique et les propriétés fonctionnelles de ces micelles varient en fonction de l'espèce, voire de la race considérée car le polymorphisme génétique au sein d'une même espèce peut être assez important (HAZEBROUCK, 2016).

Comparé au lait bovin, les caséines du lait de dromadaire montrent une faible teneur en  $\kappa$  caséine et une proportion plus importante en  $\beta$  caséine, des mobilités électrophorétiques très différentes, une composition en acides aminés partiellement similaire, des structures primaires et secondaires plus ou moins différentes et un degré de phosphorylation moins important (FARAH et FARAH-REISEN, 1985 ;LARSSON-RAZNIKIEWICZ et MOHAMAD, 1986 ;OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 ;KAPPLER *et al*, 1998). Elles sont aussi assez peu

structurées, ce qui les rend très sensibles à la digestion protéolytique (HAZEBROUCK, 2016) (Tableau II).

La  $\kappa$ -CN détiend le rôle clé dans la coagulation du lait par la présure. Son site de clivage par la chymosine est au niveau de la liaison Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> dans le cas du lait bovin et Phe<sup>97</sup>-Ile<sup>98</sup> pour le lait camelin(CHAOUI-KHEROUATOU1 et ATTIA, 2008)(Figure 02).



**Figure 02 : Comparaison des sites d’hydrolyse par la chymosine au niveau des caséines-  
cameline et bovine (KAPPELER *et al*, 1998).**

Elle joue un rôle fondamental dans le phénomène de stabilisation/déstabilisation de la micelle. Elle est caractérisée par la présence d’une portion glycomacropéptide du côté C-terminal contenant des résidus glucidiques à caractère très hydrophile, par contre, le reste de la chaîne protéique (paracaséine) est de nature très hydrophobe. Cela confère à cette protéine un caractère amphiphile (HILL et WAKE, 1969).

**Tableau II : Caractéristiques physico-chimiques de la caséine  $\kappa$  bovine (EIGEL *et al*, 1984 ; FARRELL *et al*, 2004) et de la caséine  $\kappa$  cameline (OCHIRKHUYAG *et al*, 1997 et KAPPELER *et al*, 1998).**

	Caséine $\kappa$ bovine	Caséine $\kappa$ cameline
Masse moléculaire (Da)	19007,0± 1,1	18254-22987
Proportion dans les caséines totales	13	3,5-5
Point isoélectrique	3,97	4,11
Nombre d’acides aminés	169	162
Résidus cystéine	2	2
Nombre de groupements phosphoryles/mole	1-2	1
Présence de glucides	+	+

### **3. Les enzymes coagulantes utilisées en fromagerie**

Les enzymes coagulantes sont des préparations d'enzymes protéolytiques produites par tous les organismes vivants (PALMA *et al*, 2002). Leur utilisation pour la coagulation du lait est parmi les plus anciennes opérations de transformation alimentaires (RAMET, 1985). Ce sont des endopeptidases appartenant au groupe des protéases aspartiques acides (EC 3.4.23), comportant deux résidus d'acides aspartique dans le site actif impliqués dans la catalyse. (MAHAJAN et BADGUJAR, 2010).

Selon les études de YEGIN et DEKKER (2013), BEN AMIRA *et al* (2017) et un bon coagulant doit :

- posséder un bon rapport d'activité coagulante sur l'activité protéolytique (AC/AP) ;
- donner des résultats satisfaisants sur le plan organoleptique ;
- donner un meilleur rendement de fromage.

#### **3.1. Différentes sources d'enzymes coagulantes**

À ce jour, les protéases utilisées par l'industrie fromagère proviennent de quatre sources différentes : la présure animale, les enzymes végétales, les enzymes microbiennes et les enzymes recombinantes (VALLEJO *et al*, 2008).

Considérée comme étant la meilleure enzyme de coagulation du lait, la présure de veau était et reste la plus employée dans la production de toutes les variétés de fromage (MOHAMED AHMED *et al*, 2009 ; NASR *et al*, 2016 ; HATTEM *et al*, 2017). Elle est généralement extraite de la caillette de jeune veau non sevré âgé de 10 à 30 jours (GARG et JOHRI, 2009) et se compose principalement de chymosine (80 %) et de pepsine (20 %). Elle permet de coaguler le lait rapidement à son pH naturel (GARG et JOHRI, 2009).

Les présures provenant d'autres animaux comme la chèvre, l'agneau, et le buffle ont été étudiées, mais elles ne sont pratiquement pas utilisées au niveau industriel, car elles présentent des propriétés enzymatiques moins intéressantes en comparaison avec celles de la présure bovine (YEGIN et DEKKER, 2013 ; ALMEIDA *et al*, 2015).

##### **3.1.1. Les enzymes coagulantes microbiennes**

Plusieurs coagulants microbiens ont été commercialisés et utilisés dans la fabrication du fromage et semblent agir de la même manière que la chymosine. Diverses enzymes du genre *Bacillus*, *Pseudomonas* et d'origine fongique sont utilisées comme substituts de présure notamment au Japon et aux USA (RAMET, 1997 ; MANDY *et al*, 2011). La moisissure du sol

*Rhizomucormiehe* est la plus couramment employée dans l'industrie fromagère (JACOB *et al*, 2011). Toutefois, en plus de l'intensité de leur protéolyse, ces coagulants microbiens montrent une thermostabilité élevée. Celle-ci a pu être réduite par l'application des modifications chimiques aux préparations enzymatiques ou en utilisant des outils de génie génétique (BEN AMIRA *et al*, 2017).

### **3.1.2. La chymosine recombinante**

Désignée sous le nom de chymosine produite par fermentation (FPC), la chymosine recombinante représente l'une des premières applications réussies de la technologie de l'ADN recombinant dans l'industrie alimentaire (YU, 1994 ; YEGIN et DEKKER, 2013). Elle est obtenue à partir de micro-organismes génétiquement modifiés (bactéries, levures et moisissures) tels qu'*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, dans lesquels le gène de l'enzyme était introduit (JACOB *et al*, 2011 ; YEGIN et DEKKER, 2013).

En fromagerie, cette enzyme a permis de fabriquer une variété de fromages ayant des caractéristiques sensorielles et texturales comparables aux produits issus avec de la présure de veau standard (O'SULLIVAN et FOX, 1991 ; BROME et HICKEY, 1990), ce qui a fait d'elle un bon substitut à la présure bovine en présentant actuellement 80 % du marché mondial des enzymes coagulantes (MUNDLE, 2014 ; KUMAR *et al*, 2010).

Plus récemment, la chymosine recombinante de dromadaire, également connue sous le nom de Chymax M (KAPPELER *et al*, 2006), est disponible sur le marché (SOODAM, 2015). Des études comparatives faites par JENSEN *et al* (2013) et BANSAL *et al* (2009) sur la chymosine bovine recombinante et celle du dromadaire ont montré que cette dernière présentait une stabilité thermique légèrement élevée, des niveaux de protéolyse moins élevés et des intensités de saveur plus faibles par rapport à la chymosine bovine recombinante (YEGIN et DEKKER, 2013).

### **3.1.3. Les enzymes coagulantes végétales**

Ces dernières années, une attention croissante a été dirigée vers les coagulants végétaux, en raison de leur disponibilité facile et de leurs processus de purification simples (GROZDANOVIC *et al*, 2013).

De nombreuses protéases présentes dans presque toutes les plantes ont été extraites et utilisées sous forme d'extraits végétaux bruts ou d'enzymes purifiées dans la production

fromagère (SAHAH *et al*, 2013). Parmi ces enzymes végétales on retrouve celles obtenues de racines, de graines, de tiges (comme les tiges d'ananas), de fleurs (comme l'extrait obtenu de la fleur du chardon *Cynaracardunculus* ayant connu le plus de succès à ce jour), de latex, et de fruits (SOUSA et MALCATA, 2002 ;ABOU EL-YAZID ABD EL-SALAM *et al*, 2017). Mais suite à l'activité protéolytique importante de certains d'eux et les modifications qui en résultent sur les propriétés organoleptiques des fromages, l'utilisation des substituts végétaux est rendu difficile (CAVALCANTIM *et al*, 2004 ;CHAZARRA *et al*, 2007).

### **3.1.4. Les enzymes coagulantes d'origine animale**

Les enzymes coagulantes d'origine animale sont des protéases gastriques présentes dans les caillottes des mammifères. Elles sont responsables de la digestion des protéines alimentaires et classées en 4 groupes : la pepsine A (EC 3.4.23.1), la pepsine B (EC 3.4.23.2), la pepsine C ou gastricine (EC 3.4.23.3) et la chymosine (EC 3.4.23.4) (TANG *et al*, 1973 ;FOLTMANN et AXELSEN, 1980 ;RICHTER *et al*, 1998)

La pepsine A et la pepsine B sont dominantes dans l'estomac des mammifères adultes, alors que la gastricine ne représente que 5 % des enzymes totales chez l'adulte, mais elle se trouve dans toutes les parties de l'estomac des mammifères (SAMLOFF, 1989 cité par MD IMTAIYAZ et FAIZAN, 2010). La chymosine, l'enzyme fœtale, est dominante chez les animaux nourris au lait (TANG *et al*, 1973 ;MARTIN *et al*, 1982 ;FOX *et al*, 2004 ;RAMPILLI *et al*, 2005).

Ces protéases sont synthétisées par les cellules principales de la glande fundique de la caillette (SIDIKOU *et al*, 2005 ;BANGA-MBOKOH, 2002) sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes : pepsinogène, progastricsine et prochymosine (KHAN et JAMES, 1998). Comparé à l'enzyme actif, le zymogène possède un segment peptidique supplémentaire lié à la partie N-terminal de l'enzyme actif nommé « pro-segment » qui sert à bloquer le site actif et empêcher l'entrée du substrat dans ce site et stabiliser ainsi la forme inactive (JENSEN *et al*, 2013). En plus de son rôle inhibiteur, le pro-segment est souvent important pour le repliement et la stabilité du zymogène (KHAN et JAMES, 1998).

Ces zymogènes sont stables à pH neutre mais sont convertis en enzymes actives à des pH acides (RICHTER *et al* 1998). Lors de l'ingestion de nourriture, chacun d'eux est libéré dans la lumière gastrique et subit une conversion en enzyme active, dans le suc gastrique acide, par un mécanisme autocatalytique qui est déclenché suite à la perturbation des interactions électrostatiques entre la fraction d'enzyme active et le pro-segment conduisant à

la dissociation de celui-ci et le dévoilement du site actif (KHAN et JAMES, 1998). Cette réaction d'activation est un processus complexe, impliquant une série de changements conformationnels et un clivage protéolytique du pro-segment qui peut se produire en une ou plusieurs étapes par une réaction intra- ou inter moléculaire (RICHTER *et al*, 1998).

#### **3.1.4.1. Les facteurs influençant la production d'enzymes**

La production de ces enzymes varie en fonction de l'âge de l'animal et du régime alimentaire (FOX *et al*, 2004). Chez le fœtus de veau, la prochymosine est produite tôt pendant la gestation (10<sup>ème</sup> semaine) alors que le pepsinogène A et la progastricine commencent à être produits à partir de la 20<sup>ème</sup> semaine. Après la naissance, la synthèse de la prochymosine est significativement liée à l'allaitement tandis que celle du pepsinogène reste en petite quantité tant que le veau est nourri au lait. Avec l'âge et suite à la consommation d'aliments solides, le taux de prochymosine sécrété diminue au profit du pepsinogène qui devient le zymogène dominant dans la muqueuse abomasale (ANDREN, 1992 ;SIDIKOU *et al*, 2005).

#### **3.1.4.2. La chymosine**

La chymosine (E.C. 3.4.23.4) est une protéase aspartique présente dans l'estomac de tous les mammifères allaitants. C'est la principale enzyme de coagulation du lait utilisée en fromagerie (CHITPINITYOL et CRABBE, 1998 ; ESKANDARI *et al*, 2012).

Au cours de la fabrication du fromage, la chymosine assure un double rôle. D'une part, elle se caractérise par une activité coagulante élevée en provoquant l'hydrolyse spécifique de la  $\kappa$ -caséine au niveau du lien Phe105- Met106, et d'autre part, elle possède une faible activité protéolytique générale sur les différentes fractions de caséines (SIDIKOU *et al*, 2005 ; TROCH *et al*, 2017).

De ce fait, cette enzyme conduit à un développement optimal de la saveur dans le fromage mature et la formation d'un caillé fort, aboutissant à un rendement élevé en fromage (ESKANDARI *et al*, 2012).

#### **3.1.4.3. La pepsine**

Baptisée par Theodor Schwann en 1836, la pepsine fut la première enzyme identifiée dans le suc gastrique (VOET D. et VOET J.G., 2016 ;ZHU *et al*, 2017), son activité a été largement étudiée depuis que Northrop l'a cristallisé en 1929 (CAMPOS et SANCHO, 2003).

C'est la principale enzyme protéolytique de digestion (HORNBUCKLE *et al*, 2008 ; NAGASAWA *et al*, 2016), responsable de 15% à 20% de la digestion des protéines alimentaires (SMITH et MORTOM, 2010). Son activité et sa stabilité sont étroitement liées au pH dominant de son environnement (BARDHAN *et al*, 2011 ; CAMPOS et SANCHO, 2003).

La pepsine est moins spécifique que les autres endoprotéinases (AHN *et al*, 2013), elle est capable de séparer les liaisons impliquant la phénylalanine, la tyrosine et la leucine le plus facilement, mais peut hydrolyser presque toutes les autres liaisons peptidiques (HORNBUCKLE *et al*, 2008).

Le remplacement de la présure de veau par la pepsine, extraite de l'estomac de bovins adultes, dans la fabrication du fromage a conduit à une faible diminution du rendement en fromage (0.8%) et pertes de protéines qui ont été jugées importantes sur le plan économique. Une légère baisse des propriétés organoleptiques caractéristiques du fromage a également été observée (EMMONSCE *et al*, 1976).

Les principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine sont représentées dans le tableau III.

### **3.2. Etude des structures d'enzymes coagulantes d'origine animale**

#### **3.2.1. Structure primaire**

Les travaux de TANG et HARTLEY (1970) cité par FOLTMAN *et al* (1979) et JENSEN *et al* (2013) révèlent un haut degré d'homologie de séquences de l'ordre de 55 % entre les structures primaires de la chymosine et la pepsine bovines. Ces dernières sont des protéines globulaires à chaîne polypeptidique unique (CHIPINITYOL, 1998 ; YEGIN et DEKKER, 2013) présentant une faible teneur en acides aminés basiques et riches en acides aminés acides (FOLTMAN *et al*, 1978, 1979 ; HIDAKA *et al*, 1986).

Les deux structures protéiques comportent trois ponts disulfures : Cys45-Cys50, Cys206-Cys210 et (YEGIN et DEKKER, 2013). CHEN *et al* (2000) ont démontré que le pont Cys250-Cys283 est indispensables pour le repliement correct de la prochymosine, alors que le pont Cys45-Cys50 contribue à la stabilité et la spécificité de l'enzyme.

La comparaison structurale entre la chymosine bovine et celles d'autres ruminants indique qu'elles sont très similaires. Cette similitude avec l'agneau (PUNGERCAR *et al*, 1990), le buffle (VALLEJO *et al*, 2008) et le dromadaire (KAPPELER *et al*, 2006) est de 95%, 97 %, et 87% respectivement.

**Tableau III : Principales caractéristiques de la chymosine et de la pepsine bovines.**

Paramètres		Chymosine	Pepsine	Référence
Localisation		Caillettes d'animaux non sevrés et adulte	Caillettes d'animaux non sevrés et adulte	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1979 ; CHITPINITIYOL et CRABBE, 1998 ; TANG, 2013)
Taux de sécrétion	Chez l'animal non sevré	80%	20 %	(BROOME et LIMSOWTIN, 1998 ; YEGIN et DEKKER, 2013)
	Chez l'animal adulte	6 à 10 %	90 à 94 %	
Variantes génétiques		A, B et C	A, B et C	(BANGA-MBOKO, 2002 ; FOX <i>et al</i> , 2004)
Nombre d'acides aminés	Pro-enzyme	365	371	(FOLTMANN <i>etal</i> ,1977)
	Pro-segment <sup>b</sup>	42	45	(PEDERSEN <i>et al</i> , 1979)
	Enzyme mature	323	327	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1969)
PM	Pro-enzyme	36	42	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1969 ; CZINN <i>et al</i> , 2011)
	Pro-segment	---	---	---
	Enzyme mature	31	35	(FOLTMAN <i>et al</i> , 1969 ; BANGA-MBOKO, 2002)
Activité	Coagulante	Elevée	Faible	(BROOME et HICKEY, 1990 ; KAGEYAMA, 2002)
	Protéolytique	Faible	Elevée	
pH optimum d'activation		5,5	1,6 à 2,5	(RAMET, 1997 ; HORNBUCKLE <i>et al</i> , 2008)
Température d'activation		42 °C	40 °C	(RAMET, 1997 ; TANG <i>et al</i> , 1973)
pH d'inactivation		> 7	>7	(FOLTMAN, 1969 ; HORNBUCKLE <i>et al</i> , 2008)
Température d'inactivation		50 à 61 °C	>55 °C	(SCRIBAN, 1999)
Sites préférentiels de clivage		Phe105-Met106	Phe-Trp, Phe-Tyr et Phe-Phe	(TANG <i>et al</i> ,1973 ; FOLTMAN, 1975cités par ISSELNANE, 2014)

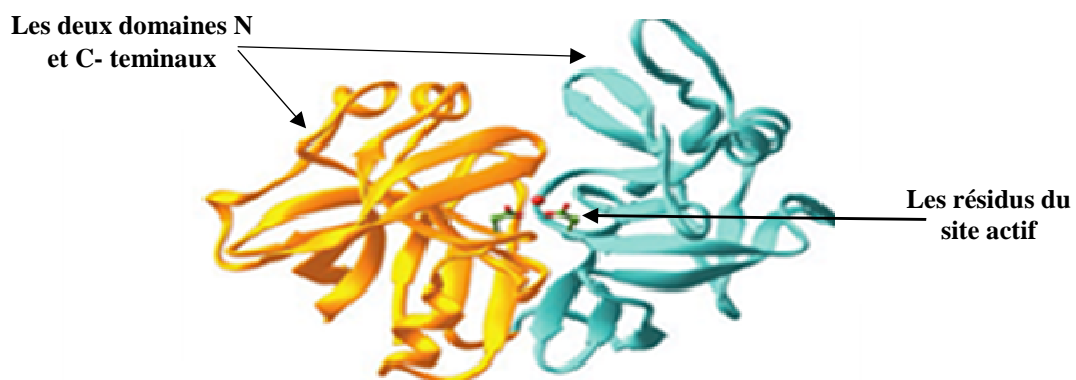
Légende : (---): non rapportée ; (b) : chez l'espèce bovine.

Certaines de ces protéines gastriques sécrétées peuvent subir une glycosylation qui entraîne une augmentation de leur solubilité et empêche leur agrégation dans la voie de sécrétion. De plus elle stabilise leur conformation et augmente leur thermostabilité (MACHALINSKI *et al*, 2006). Par exemple, la chymosine de dromadaire glycosylée (KAPPELER *et al*, 2006) à une thermostabilité plus élevée que la chymosine de veau non glycosylée. Cette thermostabilité peut être un inconvénient pour son utilisation dans la production de fromages industriels.

### **3.2.2. Structure secondaire et tertiaire**

Les structures secondaires et tertiaires déterminées par la cristallographie aux rayons X montrent que la chymosine et la pepsine sont constituées principalement de feuillets  $\beta$  parallèles et antiparallèles avec peu d'hélices  $\alpha$  (GILLIAND *et al*, 1990 ;KAGEYAMA, 2002). La chymosine elle-même est formée de 13% d'hélices  $\alpha$  (9 hélices et 44 résidus) et de 48% de feuillets  $\beta$  (29 brins et 158 résidus) (NEWMAN *et al*, 1991).

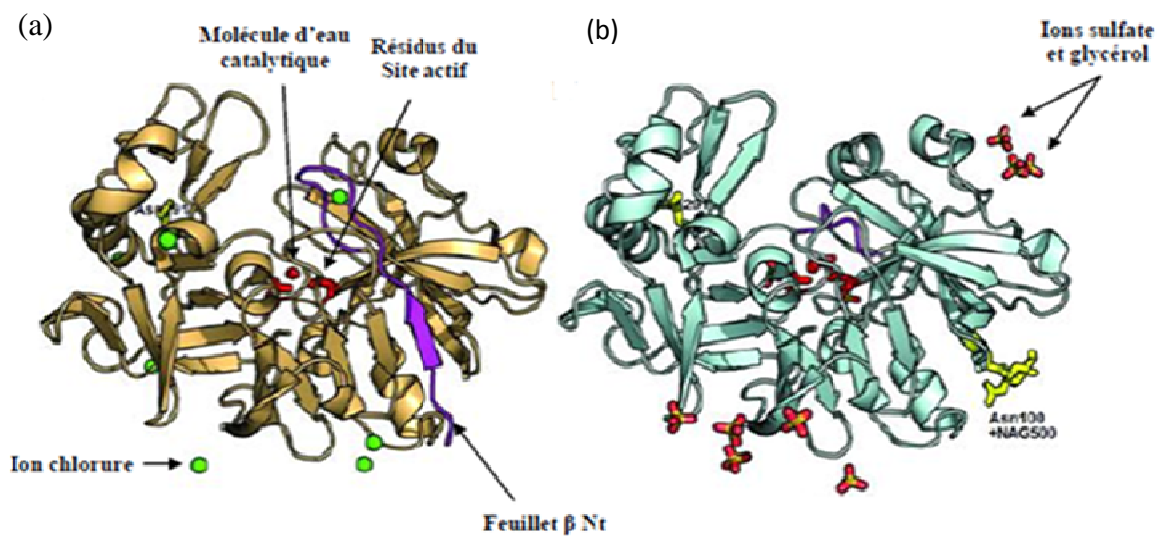
Comme le reste des protéases aspartiques, ces enzymes adoptent une forme bilobée avec deux domaines (N-terminal et C-terminal) (Figure 03) qui partagent 9% de séquences identiques et séparés par une fente profonde contenant les deux résidus d'acides aspartiques essentiels pour l'activité catalytique (SZECSI 1992 ;TAKAHASHI, 2013 ;YEGIN et DEKKER, 2013).



**Figure 03 : Structure par rayon X de la pepsine porcine, diagramme en ruban (VOET D. et VOET J.G., 2016).**

Il a été observé par JENSEN *et al* (2013) et YEGIN et DEKKER (2013), suite à la comparaison de la structure cristalline d'un variant doublement glycosylé de la chymosine de dromadaire recombinante et de celle de la chymosine bovine recombinante non glycosylée,

que ces deux enzymes partagent le même repliement global à l'exception des feuillets  $\beta$  reliant les domaines N et C-terminaux. Cette différence a conduit à une augmentation de la flexibilité dans les mouvements des domaines de la chymosine cameline recombinante. Cette dernière, contrairement à la chymosine bovine recombinante, se caractérise par une grande malléabilité dans la capacité d'interaction avec le substrat et présente en sa surface des charges supplémentaires qui lui permettent d'améliorer cette interaction.



**Figure 04 : Structure tridimensionnelle de la chymosine bovine recombinante (a) et cameline recombinante (b) (JENSEN *et al*, 2013). NAG : N acétyl glucosamine.**

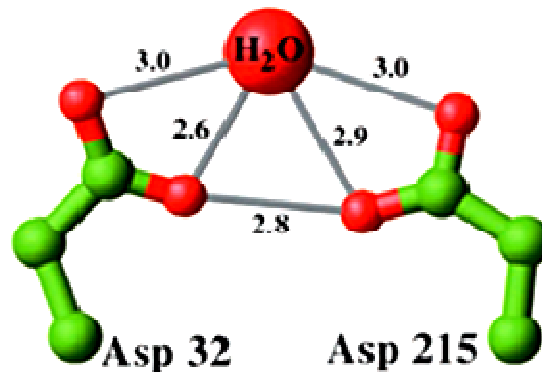
### 3.3. Le site actif et le mécanisme catalytique des enzymes coagulantes d'origine animale

#### 3.3.1. Le site actif

Les protéases aspartiques, également connues sous le nom de protéases acides, sont une famille d'enzymes dont l'activité catalytique dépend de deux résidus d'acide aspartique présents au niveau du site actif (NAGASAWA *et al*, 2016 ; BOTHAM *et al*, 2017). Ce dernier se situe entre les deux domaines (N-terminal et C-terminal) de la protéine et est assez large pour héberger un segment polypeptidique d'au moins 7 résidus (KAGEYAMA, 2002).

Les deux Asp (Asp 32 : Asp-32-Thr/Ser-33-Gly-34 dans le domaine C-terminal et Asp 215 : Asp-215-Thr/Ser-216-Gly-217 dans le domaine N-terminal, selon la numérotation de la pepsine) forment le site catalytique (PEARL et BLUNDELL, 1984 ; BERRY *et al*, 1999 ; KAGEYAMA, 2002). Leurs groupements carboxyles partagent une liaison hydrogène et sont

également liés à une molécule d'eau (PEARL et BLUNDELL, 1984 ; VOET D. et VOET J.G., 2016) (Figure 05).



**Figure 05 : Structure par rayon X de la pepsine porcine. Vue agrandie des résidus Asp du site actif avec la molécule d'eau qui leur est liée (VOET D. et VOET J.G., 2016).**

Les deux résidus catalytiques (Asp 32 et Asp 215) sont protégés par une boucle en épingle à cheveux bêta (souvent appelée « lambeau » ou en anglais « flap ») qui se ferme lorsque le substrat se lie (COOPER *et al*, 1990 ; BERRY A *et al*, 1999). Ce lambeau contient la séquence ~Tyr-75-Gly-X-Gly~ (où X est souvent une Ser, Thr ou Asp). La chaîne latérale de la Tyr-75 joue un rôle important dans la liaison hydrogène avec le Trp-39 pour maintenir le volet fermé lorsque le substrat se lie (NEWMAN *et al*, 1991). Les tentatives pour remplacer la Tyr-75, dans les protéases aspartiques, par d'autres acides aminés conduisent à une réduction de l'activité enzymatique (PARK *et al*, 1996 ; PARK *et al* 1997 ; BERRY A *et al*, 1999).

La particularité que possède la chymosine est que dans la structure native, le lambeau du site actif adopte un réarrangement particulier. Le résidu Tyr-77 (correspondant à la Tyr-75 de la pepsine) ne se lie pas au Trp mais forme des interactions hydrophobes avec la Phe-119 et la Leu-32, bloquant l'accès à la fente de liaison au substrat. Ceci peut avoir des implications importantes concernant le mécanisme de liaison au substrat et sa spécificité puisque ce résidu fait partie des poches de spécificité S1 et S1' (GILLILAND *et al*, 1990 ; NEWMAN *et al*, 1991).

Une caractéristique importante de toutes les protéases aspartiques est la présence d'un réseau de liaisons hydrogènes dans le site actif appelé « grip de pompier » qui est formé par les groupes hydroxyles de deux Thr ou Ser présentes dans les séquences Asp-Thr(Ser)-Gly de la fente catalytique (STRISOVSKY *et al*, 2000 ; INGR *et al*, 2003). STRISOVSKY *et al*

(2000) suggèrent que le réseau «grip de pompier» n'est pas essentiel pour l'activité mais contribue significativement à la stabilité globale de l'enzyme, et que les protéases avec une thréonine (Thr) dans leurs séquences Asp-Thr(Ser)-Gly sont environ 10 fois plus stables thermodynamiquement que celles contenant une serine (Ser).

Le site actif est tapissés de résidus chargés négativement et positivement ainsi que de résidus hydrophobes (BOGGETTO et REBOUD-RAVAUX, 2001) formant des sous sites S1-S4 et S'1-S'4 (nomenclature de SCHECHTER et BERGER (1967)). Ainsi les acides aminés hydrophobes et aromatiques sont préférés aux positions P1 et P'1 (KAGEYAMA, 2002) qui constituent le site de coupure qui interagit avec la partie correspondant de l'enzyme S1 et S'1.

Les protéases aspartiques sont inhibées par la pepstatine (FITZGERALD *et al*, 1990 ; RAO *et al*, 1998 ; CAMPOS et SANCHO, 2003). Elles sont également sensibles aux composés diazocétones tels que l'ester méthylique de diazoacétyl-dl-norleucine (DAN) et le 1,2-époxy-3- (p-nitrophénoxy) propane (EPNP) en présence d'ions cuivre (RAO *et al*, 1998).

### **3.3.2. Le mécanisme catalytique**

En se basant sur des données enzymatiques et cinétiques, Thomas Meek a proposé en 1998 un mécanisme catalytique pour les protéases aspartiques (Figure 06) (VOET D. et VOET J.G., 2016).

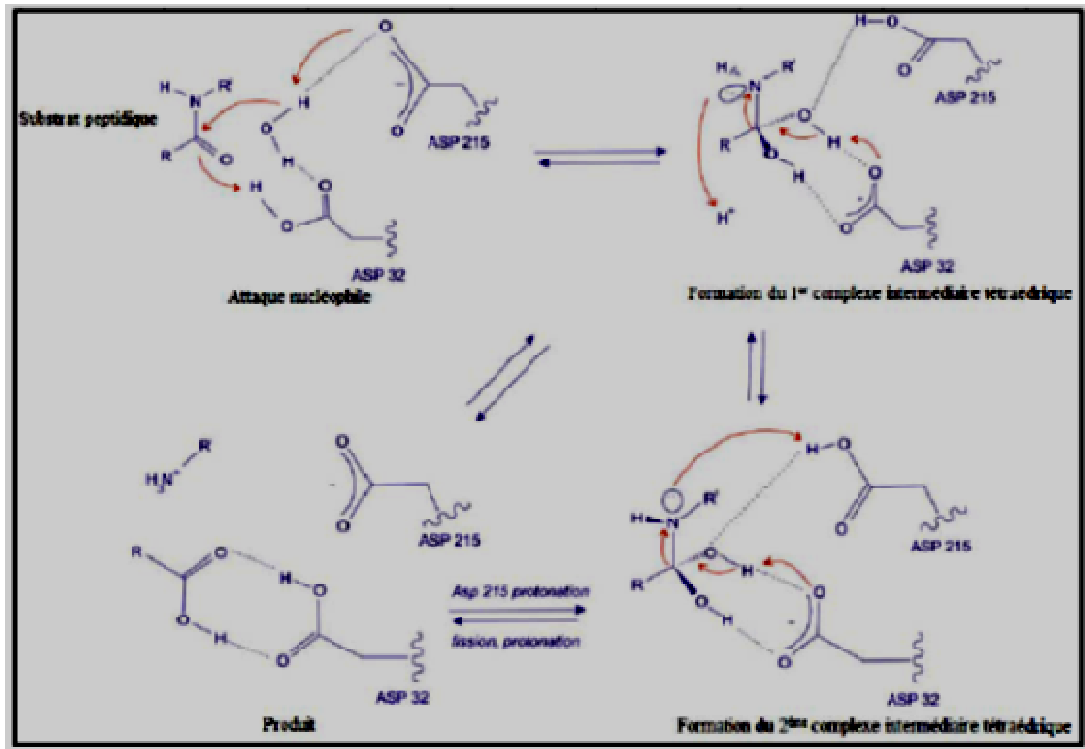
Dans ce mécanisme, la catalyse met en jeu les deux résidus d'Asp du site actif qui vont agir simultanément comme base (Asp 215) et comme acide (Asp 32), parce que leur environnement direct favorise l'ionisation de l'un d'entre eux mais pas celle de l'autre (BOTHAM *et al*, 2017 ; CAMPOS et SANCHO, 2003).

Dans la première étape de la réaction, le groupement carboxyle de l'Asp 215 agissant comme base active, par capture d'un proton, la molécule d'eau fixée, appelée « eau lytique », en lui arrachant un proton  $H^+$  donnant ainsi naissance à un groupement nucléophile le ( $OH^-$ ) (VOET D. et VOET J.G., 2016 ; BOTHAM *et al*, 2017).

Le nucléophile formé attaque alors l'atome électrophile qu'est le carbonyle carbone situé au niveau de la liaison peptidique destinée à être hydrolysée. Il se forme un intermédiaire tétraédrique instable (POLGAR, 1987 ; SUGUNA *et al*, 1987; FUSEK et VETVICKA, 1995 ; BOTHAM *et al*, 2017).

Le deuxième Asp (Asp 32), qui n'était pas chargé, cède un proton au groupe amino produit par la rupture de la liaison peptidique, pour faciliter la rupture de l'intermédiaire

tétraédrique et la libération des produits. Le transfert ultérieur du proton d'Asp 215 vers l'Asp32 restaure l'état initial de l'enzyme (BOTHAM *et al*, 2017).



**Figure 06 : Mécanisme catalytique des protéases aspartiques (VOET D. et VOET J.G., 2016).**

### 3.4. La coagulation

La coagulation du lait est une étape cruciale dans le processus de fabrication du fromage. Elle résulte de la déstabilisation des micelles de caséines (TROCH *et al*, 2017), provoquant ainsi la transformation du lait liquide en un gel, appelé coagulum ou caillé.

Celle-ci peut être induite soit par voie enzymatique, par voie acide ou les deux.

#### 3.4.1. Coagulation enzymatique

Ce mécanisme est réalisé suite à l'hydrolyse de la caséine. Elle a pour conséquence la coagulation sans modification du pH. Les enzymes employées sont des protéases coagulantes, le plus souvent la présure qui est le coagulant traditionnellement utilisé pour la coagulation du lait (TROCH *et al*, 2017). Son mécanisme se déroule en trois phases principales (Figure 07) :

-phase enzymatique ou réaction primaire : cette étape commence par un clivage enzymatique de la liaison peptidique phénylalanine105-méthionine106 de la caséine

$\kappa$ . L'hydrolyse de cette liaison produit un fragment hydrophobe N-terminal, la paracaséine, qui est constituée du résidu (1-105) et qui reste attachée aux micelles et un fragment hydrophile C-terminal, le caséinomacropéptide, qui est constitué du résidu (106-169) et qui se trouve dans le lactosérum (ILOUBO *et al*, 2012).

L'hydrolyse progressive de la caséine  $\kappa$  durant cette phase altère les propriétés des micelles, notamment la diminution de leur électronégativité suite à la libération du caséinomacropéptide fortement chargé et donc une diminution des forces de répulsion électrostatiques ainsi que du degré d'hydratation à un point où elles deviennent susceptibles à l'agrégation, qui représente la seconde phase de la réaction (TROCH *et al*, 2017).

-phase de coagulation ou phase secondaire : celle-ci débute pour un degré d'hydrolyse de la  $\kappa$ -caséine d'environ 80% à pH 6,6 (CROGUENNEC *et al*, 2008 cité par TROCH *et al*, 2017). Les micelles déstabilisées se rapprochent et commencent à s'agréger en formant des liens hydrophobes par l'intervention des ions calcium qui s'attachent à la partie chargée négativement des micelles diminuant ainsi les forces de répulsion électrostatiques auxquelles elles sont soumises (ILOUBO *et al*, 2012). Ces micelles agrégées forment un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum qui piège le lactosérum et les globules gras (BEN AMIRA *et al*, 2017).

Le temps écoulé pour l'atteinte de cette phase se nomme temps de coagulation par la présure. En pratique, il est défini comme le temps écoulé jusqu'à l'observation visuelle de floculation.

- phase de formation du gel ou réaction tertiaire : c'est une réaction lente de protéolyse générale des caséines (non spécifique), suivie de la synérèse du coagulum qui permet l'expulsion du lactosérum suite à la contraction des micelles (BRULÉ *et al*, 2006).

Dans le gel formé, la caséine est présente sous une forme fortement minéralisée et ce degré de minéralisation confère au gel présure des caractères différents de ceux du gel lactique. Le gel présure est souple, imperméable et contractile (LENOIR *et al*, 1985 ; ECK, 1990 cités par HAMRANI, 2008).

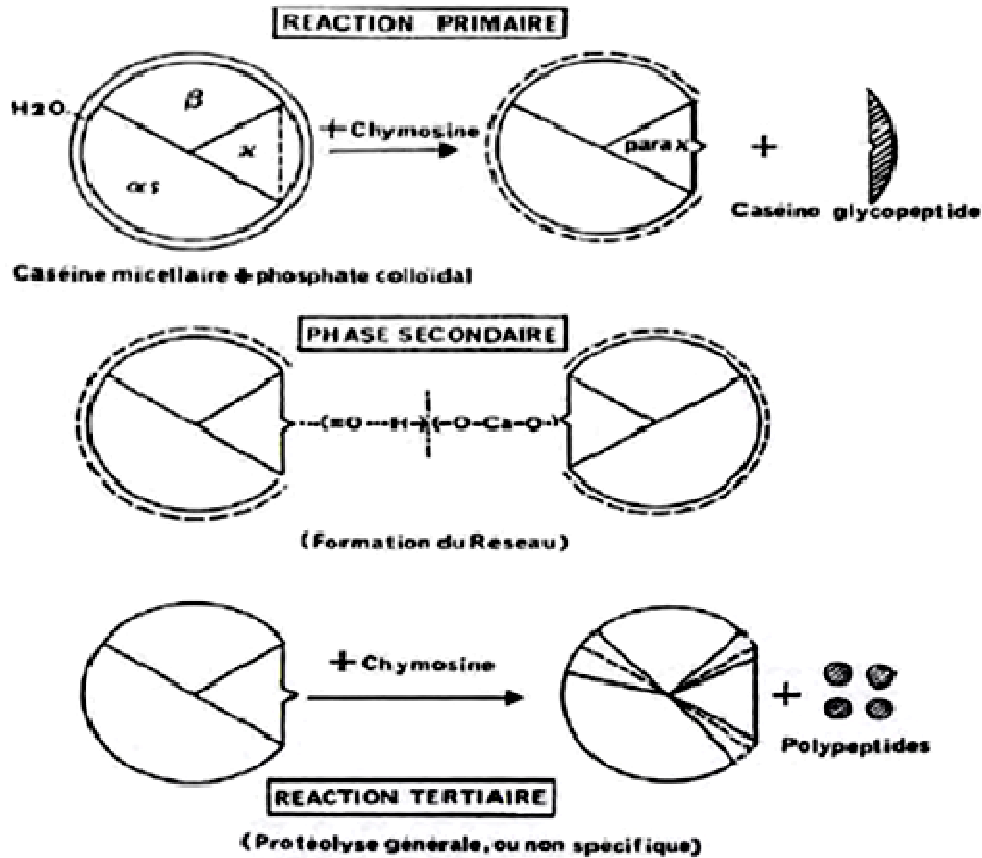


Figure 07 : Phases de coagulation enzymatique du lait (ALAIS, 1984).

### 3.4.2. Coagulation acide

Consiste en la précipitation des caséines à leur point isoélectrique par acidification biologique en utilisant des bactéries qui transforment progressivement le lactose en acide lactique ou par acidification chimique (injection de  $\text{CO}_2$  ou addition de gluconodelta lactone). A température ambiante, les micelles commencent à s'agréger à pH 5,2. Lorsque le pH isoélectrique (pHi) de la caséine est atteint (pH 4,6), il y a floculation totale (MAHAUT *et al*, 2005 ;TROCH *et al*, 2017).

Le gel formé présente une perméabilité satisfaisante, mais une friabilité élevée avec une élasticité et plasticité pratiquement nulles dues au manque de structuration du réseau qui comporte des liaisons de faibles énergies de type hydrophobe qui résistent peu aux traitements mécaniques (MAHAUT *et al*, 2005).

### **3.5. Aptitude du lait camelin à la coagulation**

Le lait de dromadaire est réputé pour son inaptitude à la coagulation (MAHBOUB *et al*, 2010). Quelle que soit la méthode utilisée, acide ou enzymatique, le coagulum formé ne présente pas les qualités requises pour subir d'autres traitements technologiques (FARAH, 1993 ; ATTIA *et al*, 2000). MOHAMED *et al* (1990) et KORLEPARA *et al* (2017) indiquent que le temps de coagulation du lait de dromadaire est deux à quatre fois plus lent que celui du lait de vache.

Les techniques effectuées, en utilisant la présure, pour tester l'aptitude du lait de chamelle à la coagulation n'ont pas été concluantes (MEHAIA, 1993; BAYOUMI, 1990 ; RAMET, 1997 ; BOUDJENAH-H *et al*, 2012), il en résulte la formation d'un coagulum moins ferme et à un rendement plus faible (BORNAZ *et al*, 2009 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2014 ; BERHE *et al*, 2017). Cette difficulté de coagulation est due principalement aux propriétés structurelles et fonctionnelles uniques des composants du lait. Notamment, la faible teneur en kappa caséine présente ( 5 % contre 13,5 % pour le lait de vache) et la plus grande taille des micelles du lait de chamelle qui est environ le double (380 µm) de celle du lait de vache (150µm) (FARAH et RUEGG, 1989 ; FARAH et BACHMANN, 1987 ; BORNAZ *et al*, 2009).

Afin de remédier à l'aptitude limitée du lait de chamelle à la coagulation, différentes adaptations technologiques ont été proposées. Dans ce cadre, les travaux menés par différents auteurs : RAMET (1994) sur la pepsine bovine, WANGOH *et al* (1993), SIBOUKEUR *et al* (2005), BOUDJENAH-H *et al* (2011), BOUDJENAH-H *et al* (2012) sur les extraits issus de caillettes de dromadaires adultes, EL-ZUBEIR et JABREEL (2008) sur la pepsine de camifloc et HAMIDI *et al* (2017) sur l'extrait enzymatique immobilisé de la couche de kaolin du gésier de poulet ont permis d'obtenir des résultats intéressants.

A large, horizontally-oriented red oval border is centered on the page, enclosing the text.

*Partie 02*

*Partie expérimentale*

## 1. Matériels et méthodes

La présente étude a été réalisée au laboratoire pédagogique de Biochimie de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Elle a été sous tendue par le matériel et les méthodes énumérés ci-dessous.

### 1.1. Matériels

#### 1.1.1. Matériel biologique

- **Caillettes de dromadaires**

Les caillettes proviennent de dromadaires sélectionnés, d'une part, selon leur âge et, d'autre part, selon leur régime alimentaire (non sevrés et sevrés). Après l'abattage au niveau de l'abattoir communal d'Ouargla, le dernier tiers du troisième compartiment de leurs estomacs est prélevé. Les caillettes sont alors lavées à l'eau de robinet, dégraissées, hachées, mises dans des sacs en plastique puis congelées à  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Tableau IV : Caillettes de dromadaires utilisées**

Dromadaire	Non sevré	Sevré
Age	13 mois	8 ans

- **Poudre de lait écrémé type « low heat »** : Cette poudre de lait nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de Tizi- Ouzou) ;
- **Caséines bovines et camelines lyophilisées** : Elles sont obtenues selon le protocole décrit par SCHAMET *et al* (1992), à partir de lait préalablement écrémé ;
- **Enzymes coagulantes** :
  - pepsine (EC 3.4.23.1), extraite d'estomacs de porc ;
  - chymosine bovine recombinante Chy-Max (Christian. Hansen Lab. (DK)) qui nous a été fournie gracieusement par la Laiterie de Drâa Ben Khedda (wilaya de Tizi- Ouzou).
- **Sérum albumine bovine (BSA)**, (SIGMA chemical Co., U.S.A) ;
- **Kit pour l'étalonnage des gels d'électrophorèse en PAGE-SDS** : préparé au sein du laboratoire et renferme 4 protéines de PM connu : l' $\alpha$ -Lactalbumine (14 kDa), la  $\beta$ -Lactoglobuline (18kDa), l'ovalbumine (45kDa) et la sérum albumine bovine (67kDa).

### **1.1.2. Appareillage**

Agitateur magnétique, balance électronique et balance de précision, pH -mètre, bain-marie, centrifugeuse, spectrophotomètre UV-visible, lyophilisateur, unité d'électrophorèse.

### **1.1.3. Petit matériel**

Micropipettes, membrane de dialyse, papier filtre, verre frité et différents types de verrerie (bêchers, fioles jaugées, pipettes graduées, tubes à essais, entonnoirs...).

### **1.1.4. Produits chimiques et réactifs**

- produits et solvants : acide chlorhydrique, acide acétique, acide trichloracétique, éthanol, glycérol... ;
- sels et tampons : sulfate d'aluminium, sulfate de sodium, chlorure de sodium, phosphate di-sodique... ;
- colorants et réactifs : acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, dodécyl sulfate de sodium, glycine, 2-mercaptoéthanol, N, N'méthylène-bis-acrylamide, persulfate d'ammonium, réactif de Folin-Ciocalteu, TEMED....

## **1.2. Méthodes**

### **1.2.1. Extraction des enzymes coagulantes**

Les extraits coagulants sont obtenus selon la méthode d'extraction proposée par VALLES et FURET (1977) pour le bovin et adapté par nos soins aux extraits issus de caillettes de dromadaires (Figure 08).

#### **1.2.1.1. Macération**

Des échantillons de caillettes de poids P (g) sont décongelés et macérés dans un volume (1,25 ×P) d'une solution d'HCl (0,2M) à une température de 38°C pendant 60 minutes. Après filtration sur papier filtre du mélange on obtient un extraits brut total.

#### **1.2.1.2. Clarification**

Elle consiste en l'ajout de 1% (V/V) d'une solution de sulfate d'aluminium  $Al_2(SO_4)_3$  (1M) et 5% (V/V) d'une solution de sulfate dissodique  $Na_2SO_4$  (1M) à l'extrait obtenu à la température de 38°C.

Une filtration est ensuite réalisée permettant l'obtention d'un filtrat jaune.

### **1.2.1.3. Concentration du filtrat**

Le filtrat subit une concentration par addition d'une solution saturée de NaCl, additionnée à 1% (V/V) d'une solution d'HCl (d= 1.19). Après un repos d'une heure suivie d'une centrifugation (2100xg / 20min), nous obtenons un précipité humide que l'on fait dissoudre dans un volume minimal d'eau distillée à raison de 10% (p/v).

### **1.2.1.4. Ajustement du pH**

Le pH de ces extraits enzymatiques clarifiés est augmenté jusqu'à la valeur de 5,5 par l'utilisation d'une solution de phosphate dissodique Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (1M).

### **1.2.1.5. Dialyse**

Les extraits issus de caillottes de dromadaires non sevrés et adultes sont placés dans des boudins de dialyse dont le seuil de rétention est de 10000 Da, puis placés dans l'eau distillée pendant 48 heures à 4°C, sous agitation lente. La solution de contre dialyse est renouvelée toute les 4 heures.

Les extraits obtenus ont été dénommés ECD NS (extrait de caillette de dromadaire non sevré) et ECD A (extraits de caillette de dromadaire adulte). Leur conservation a été réalisée à 4°C après addition d'azide de sodium.

## **1.2.2. Calcul du rendement de l'extraction**

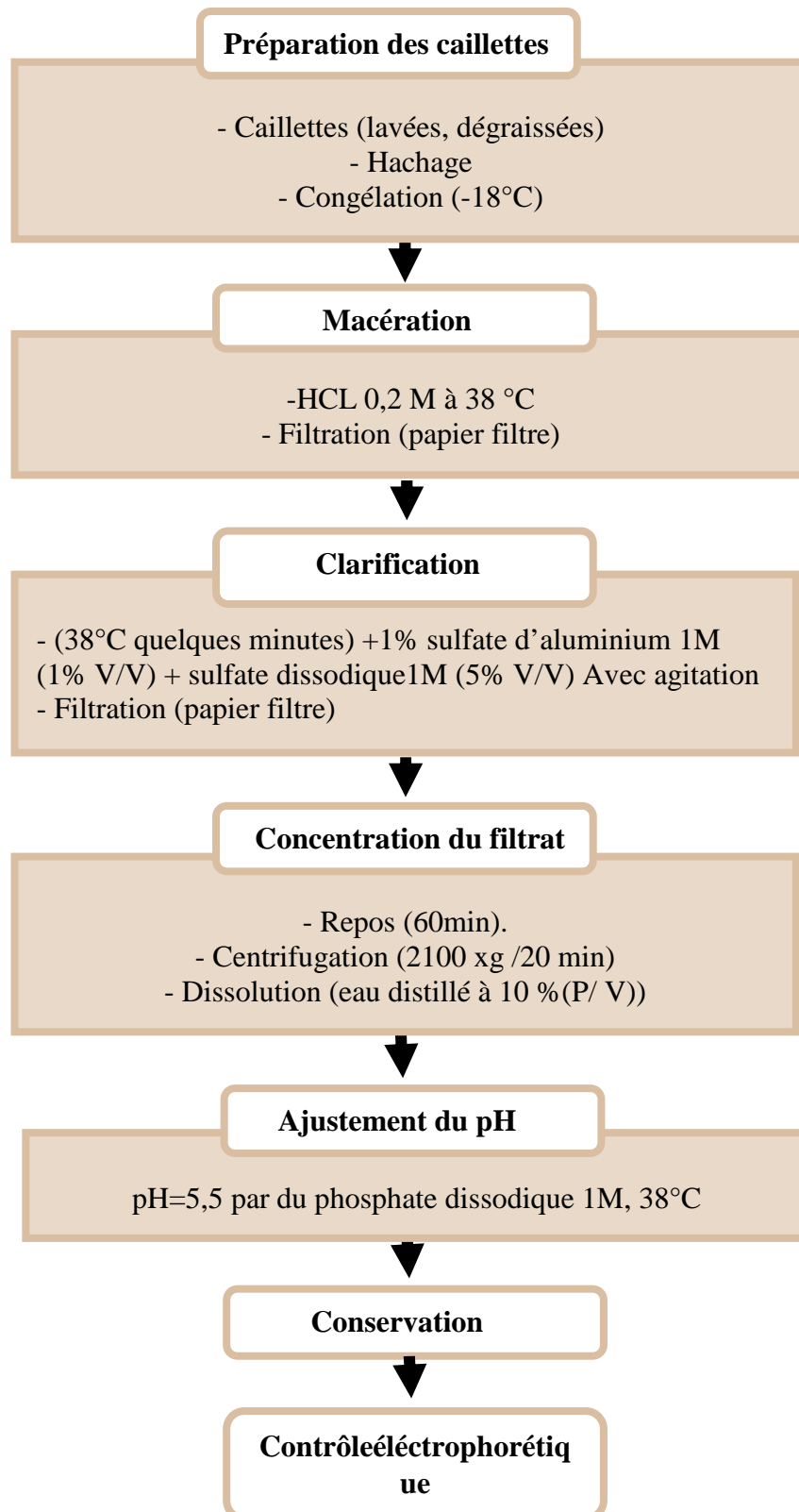
Le rendement d'extraction R pour les extraits de caillottes de dromadaires non sevrés et adultes exprimé en pourcentage (%) est défini comme étant le rapport de la masse de l'extrait obtenu (précipité) et la masse de la caillette employée. Il est déterminé selon la formule suivante :

$$R(\%) = M/M_0 \times 100$$

**R(%)** : rendement exprimé en pourcentage

**M** : masse en gramme de l'extrait résultant (précipité)

**M<sub>0</sub>** : masse en gramme de la caillette



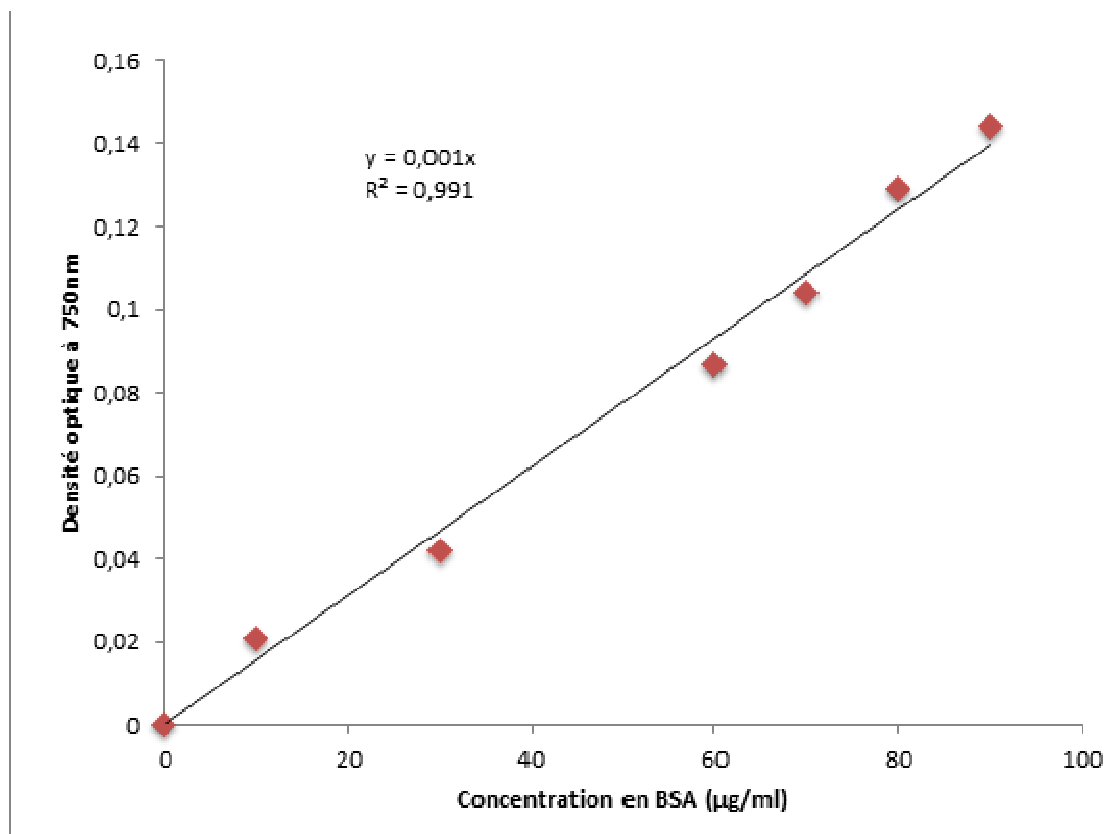
**Figure 08:** Protocole d'isolement des extraits enzymatiques gastriques préconisé par VALLES et FURET (1977) pour le bovin, et adapté aux extraits issus de caillettes de dromadaires.

### 1.2.3. Caractérisation des extraits coagulants

#### 1.2.3.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des extraits enzymatiques est réalisé par la méthode de LOWRY *et al* (1951). C'est une mesure colorimétrique où l'addition d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu à une solution protéique donne une coloration bleue foncée. Cette coloration résulte de la réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine en un complexe, le bleu de molybdène.

La densité optique (DO) mesurée au spectrophotomètre visible à 750 nm permet de déterminer la teneur en protéines des extraits en se référant à une courbe d'étalonnage  $DO=f(C)$  établie avec des concentrations de BSA connues (Figure 09). Le mode opératoire est présenté en annexe06.



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

**$R^2$ = coefficient de corrélation.**

### **1.2.3.2. Mesure de l'activité coagulante**

L'activité coagulante des ECD NS et ECD A est déterminée selon la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN *et al* (1977) (Figure 10). Cette méthode consiste à déterminer visuellement dans des conditions standardisées, le temps d'apparition des flocons dû à la formation d'agrégats de caséine.

Cette transformation s'observe mieux sur un film fin de lait dans un tube en rotation, disposé sur un fond noir. Cette méthode donne des résultats fiables avec une bonne reproductibilité.

La méthode consiste à ajouter 1 ml d'extrait coagulant à 10 ml de substrat standard (poudre de lait reconstituée) à 30°C puis à noter le temps de coagulation.

La préparation du substrat standard consiste à la dissolution de la poudre de lait type (low heat) à 10% (P/V) dans une solution de CaCl<sub>2</sub> (0,01M) et ajustement du pH à 6,5 par l'ajout d'une solution de NaOH (0,1N). Celui-ci est ensuite réparti dans des tubes à essais, à raison de 2 ml/tube, suivi d'une incubation dans un bain marie à 30 °C pendant 15 min.

L'unité d'activité coagulante(U.A.C) ou "unité présure" (U.P) est définie comme étant la quantité d'enzyme par millilitre d'extrait enzymatique qui provoque la floculation de 10 ml de substrat en 100 sec à 30 °C. Elle est calculée comme suit : **UP=10×V/ Tc×Q.**

**UP:** unité présure ;

**V:** volume de substrat standard utilisé (ml) ;

**Q :** volume d'extrait coagulant (ml) ;

**Tc :** temps de coagulation (secondes).

#### **1.2.3.2.1. Détermination de la température optimale d'activité**

Pour la détermination de la température optimale de l'activité des extraits coagulants, le lait a été porté à différentes températures : 20, 30, 40, 50, 60 et 80°C.

#### **1.2.3.2.2. Détermination du pH optimal de l'activité**

Le pH optimal de l'activité coagulante des extraits enzymatiques a été déterminé en faisant varier le pH du lait entre : 5,5, 6, 6,5 et 7.

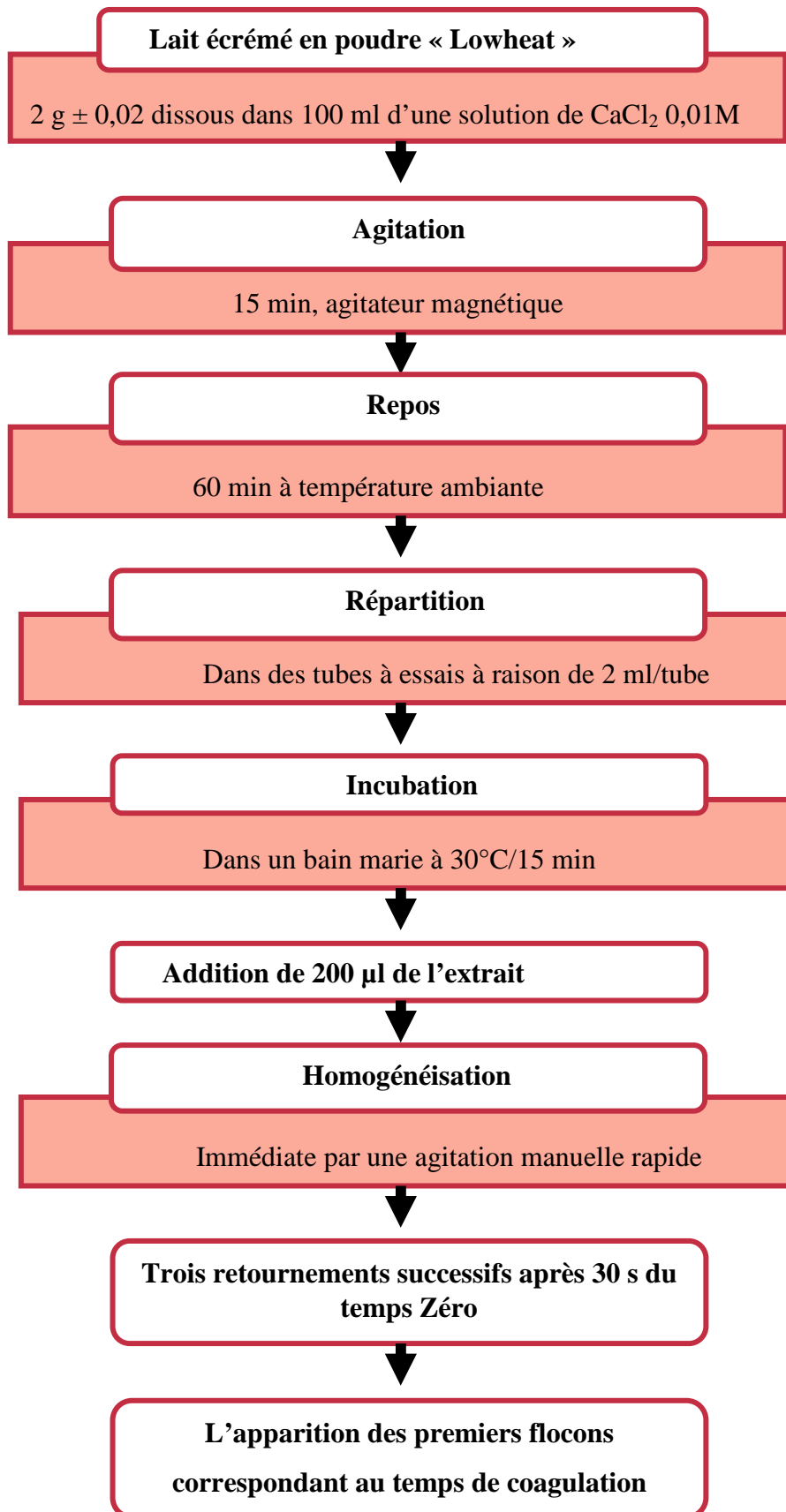


Figure 10 : Mesure du temps de floculation par la méthode de BERRIDGE(1945) modifiée par COLLIN et *al* (1977).

#### **1.2.3.2.3. Détermination de la concentration optimale de CaCl<sub>2</sub>**

L'influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante a été déterminée en utilisant des concentrations variées de CaCl<sub>2</sub> : 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 et 0,05 M.

#### **1.2.3.3. Mesure de l'activité protéolytique**

La mesure de l'activité protéolytique des extraits coagulants est déterminée par la méthode de GREEN et STACKPOOLE (1975) (annexe 07).

L'objectif de cette mesure est l'évaluation du taux de dégradation du substrat (Caséine) pendant la réaction enzymatique. Pour cela, on mesure la concentration en produits d'hydrolyse des caséines solubles dans de l'acide trichloracétique (TCA) à 12%. Le dosage des peptides solubles est effectué selon la méthode préconisée par LOWRY *et al* (1951).

Les résultats s'expriment en termes de concentration de tyrosine (µg/ml) d'extrait enzymatique (FEDERICI, 1982 cité par HAMRANI, 2008) par référence à une courbe étalon établie à partir de concentrations croissantes en tyrosine, variant de 10 à 100 µg/ml et à 660 nm (Figure 12).

Pour l'étude de l'activité protéolytique, la concentration des extraits coagulants est ajustée de façon à obtenir un temps de coagulation voisin de 4 minutes, selon les conditions standards de mesure de l'activité coagulante.

#### **1.2.3.3.1. Préparation du substrat caséinique**

Après écrémage du lait, les caséines bovines et camelines sont précipitées à pH 4,6 et 4,3, respectivement comme préconisé par SCHAMET *et al* (1992) et WONGOH *et al* (1998) (Figure 11) avec du HCl (4N). Elles sont ensuite séparées des protéines solubles qui restent en suspension, par centrifugation à (3500xg/15 min) pour les caséines bovines et (4000xg/30 min) pour les caséines camelines. Les fractions de caséines et de protéines obtenues sont dialysées contre l'eau distillée à 4 °C dans des membranes de dialyse dont le seuil d'exclusion est de 10000Da afin d'éliminer les composés azotés non protéiques, le lactose et les sels minéraux. Après dialyse elles sont congelées à -20°C, puis lyophilisées. Les caséines lyophilisées sont solubilisées à 1 % (p/v) dans du tampon phosphate, pH 5,5.

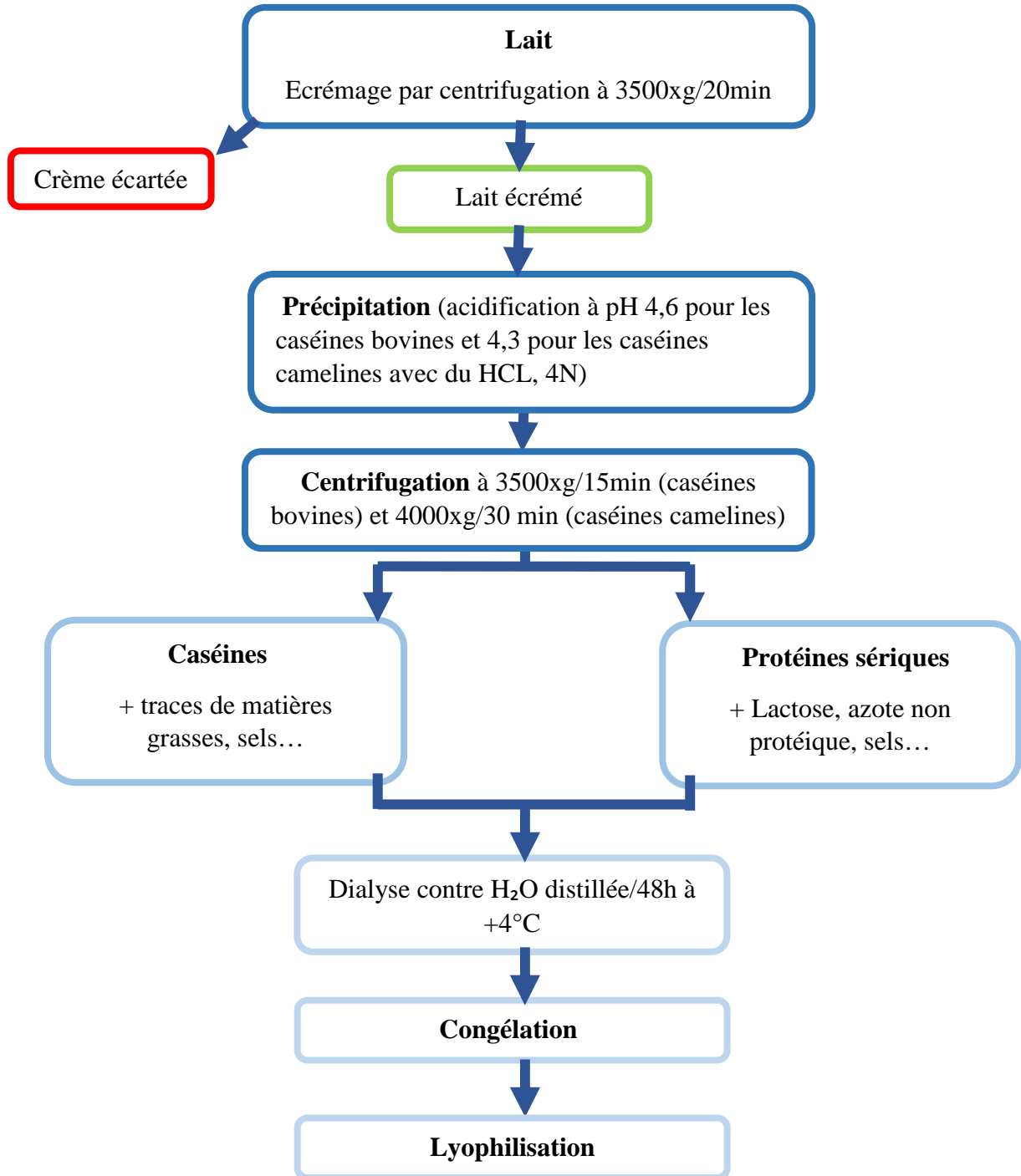
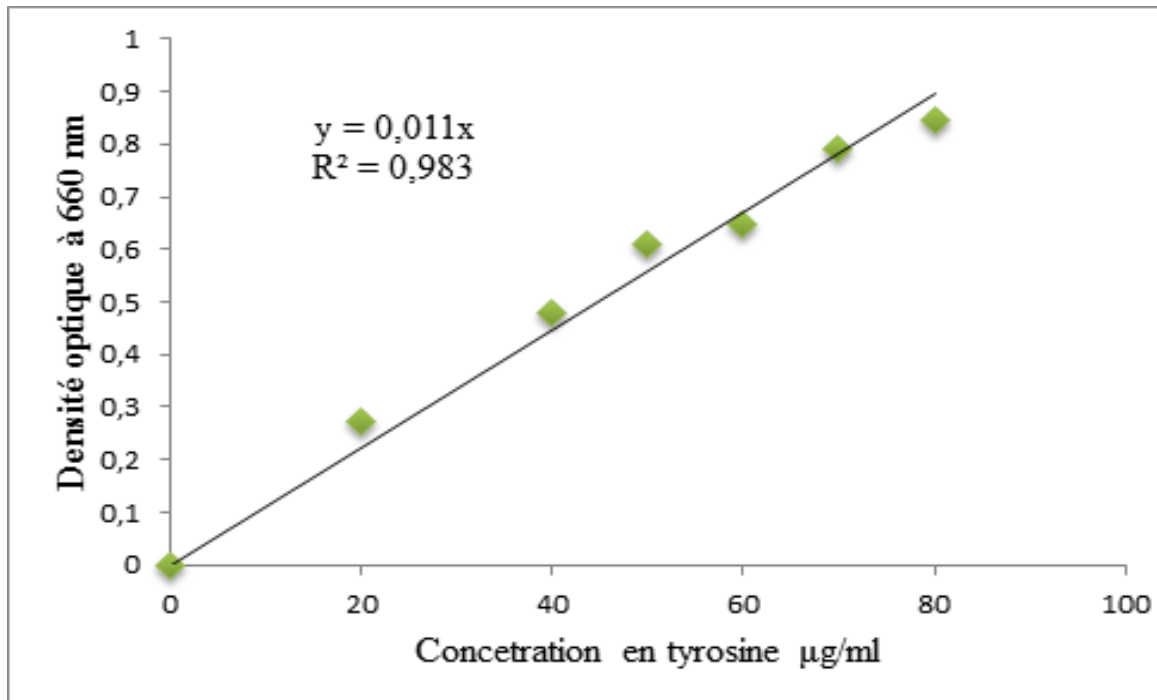


Figure 11 : Protocole d'isolement des caséines et des protéines du lactosérum à partir du lait bovin (SCHAMET *et al*, 1992) et du lait camelin (WONGOHO *et al*, 1998).



**Figure 12: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951). La tyrosine est utilisée comme protéine de référence ;  $R^2$ = coefficient de corrélation.**

#### 1.2.4. Méthode électrophorétique

##### •Principe

L'électrophorèse désigne une méthode d'analyse et de fractionnement, basée sur la migration différentielle de particules chargées (dans ce cas les protéines) sous l'effet d'un champ électrique.

##### 1.2.4.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

En dehors de l'électrophorèse en veine liquide, les séparations des particules dans un champ électrique sont souvent réalisées sur des supports solides (papier, agarose, acétate de cellulose et polyacrylamide). Parmi ces supports, le gel de polyacrylamide étant l'un des plus utilisés en raison d'un certain nombre d'avantages qu'il procure :

- transparence du gel, permettant une analyse quantitative des protéines par densitométrie;
- reproductibilité élevée et facilité de mise en œuvre ;
- possibilité de servir comme tamis moléculaire.

Notons que le gel de polyacrylamide correspond à un mélange, à des proportions convenables, d'acrylamide et son comonomère le N,N' méthylène-bis-acrylamide en utilisant des catalyseurs comme le persulfate d'ammonium et le TEMED (tétra méthyl éthylène diamine). Ainsi, le degré de porosité du gel (ou de réticulation) est variable selon les indices T et C choisis selon la relation :

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

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

a : acrylamide (g) ;

b : N,N'-méthylène-bis-acrylamide (g) ;

v : volume final de la solution (ml) ;

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

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

#### **1.2.4.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS)**

##### **1.2.4.2.1. Conditions expérimentales**

Les protocoles ont été optimisés au laboratoire (LABAB) en utilisant des mini-cuves Hoefer SE 200 et SE 280. Le mode opératoire est représenté en annexe 08.

L'électrophorèse est réalisée selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973) en conditions dissociantes et dénaturantes.

Le dodécyle sulfate de sodium « SDS » ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-OSO}_3, \text{Na}^+$ ), est un détergent anionique et un puissant agent dénaturant. En présence d'un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, tel le 2-mercaptoéthanol, et à température élevée (3 à 4 mn à 100°C), il permet de solubiliser les protéines et de se fixer à ces derniers (dont les chaînes sont ouvertes) en leur conférant une charge négative.

La fixation du SDS sur les protéines permet d'éliminer le facteur de séparation selon la charge. De ce fait, les différents composés ne seront différenciés par migration électrophorétique que selon leur poids moléculaire.

La PAGE-SDS utilise un système biphasique, comprenant deux gels : un gel de concentration faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines, et un gel de séparation où les composés seront séparés selon leur poids moléculaire.

Pour cela, nous avons utilisé un gel de concentration (T= 4,8 % et C= 2,8 %) en tampon (TRIS, 0,5 M ; pH 6,8) et un gel de séparation (T= 15 % et C= 2,7 %) en tampon (TRIS, 1,50 M ; pH 8,8). Le tampon d'électrode est composé de (TRIS, 49 mM ; glycine, 384 mM ; SDS 1%, p/v ; pH 8,3).

#### **1.2.4.2.2. Conditions générales et conduite de l'électrophorèse**

##### **1.2.4.2.2.1. Préparation des échantillons destinés à l'analyse électrophorétique**

L'extrait enzymatique est prélevé à raison de 1 mg/ml, puis mis en solution dans le tampon de gel de concentration (TRIS 0,5 M), de SDS (10 %, p/v), de 2-mercaptoéthanol (4%, v/v) et d'eau distillée. Il est chauffé à 100°C pendant 3 à 4 minutes puis additionné de glycérol (50 %, v/v). Du bleu de bromophénol est ajouté comme indicateur coloré au tampon pour permettre le suivi de la migration et repérer la fin de l'électrophorèse.

##### **1.2.4.2.2.2. Dépôt de l'échantillon dans le gel et mise sous tension**

L'échantillon à analyser est déposé à raison de 20 µl dans chaque puits, à l'aide d'une microseringue. L'unité d'électrophorèse est mise sous tension appropriée et la migration doit se dérouler en courant et voltage constants (20mA ; 200V).

##### **1.2.4.2.2.3. Révélation des bandes de migration électrophorétique**

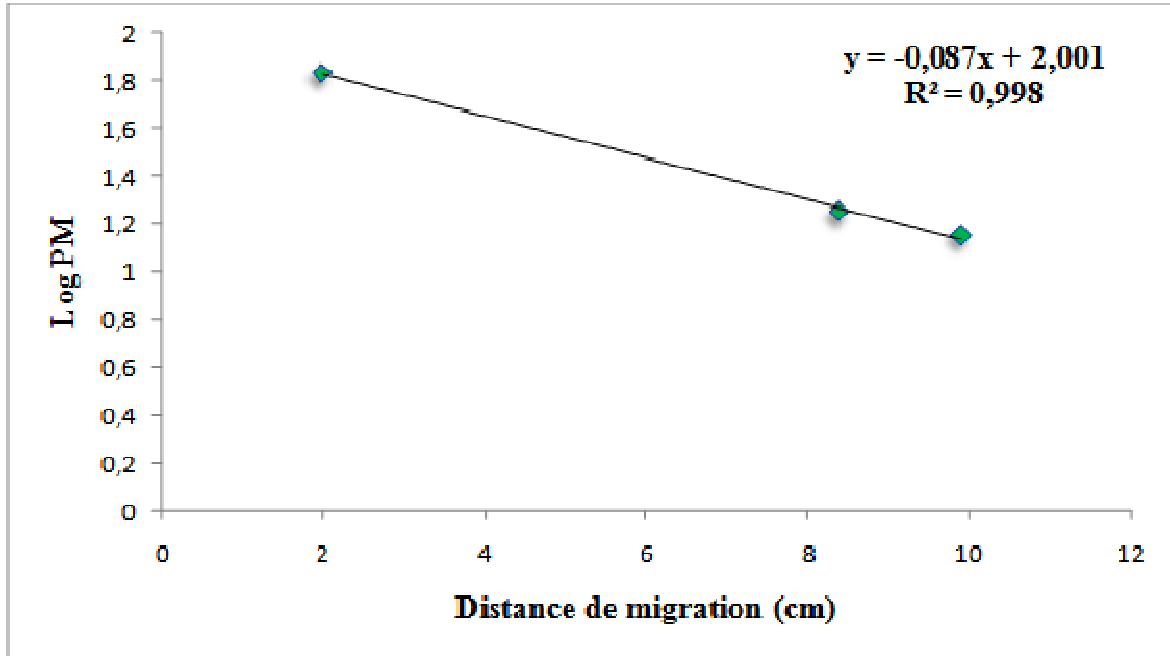
A la fin de la migration, le gel d'électrophorèse a subi les étapes suivantes :

- fixation : les protéines sont fixées par immersion dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45 mn ;
- coloration : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de Coomassie 0,2% (p/v) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (p/v) ;
- décoloration : elle est réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/ méthanol/ acide acétique).

#### **1.2.4.3. Détermination des poids moléculaires des protéines**

L'existence d'une relation linéaire dans la zone de fractionnement entre le Log (PM) et la distance de migration, permet la détermination des poids moléculaires des protéines. Pour cela, nous avons fait migrer dans les mêmes conditions, des protéines de MM connus, à savoir, la sérum albumine (67 kDa), la  $\beta$ -Lactoglobuline (18 kDa) et l' $\alpha$ -Lactalbumine (14

kDa). Une courbe de calibration du gel de séparation, établie en utilisant ces dernières protéines, a été tracée. Les PM des différentes entités protéiques sont déterminés graphiquement sur cette courbe  $\text{Log (PM)}=f(\text{distance})$  (Figure 13).



**Figure 13 : Courbe de calibration du gel de séparation en PAGE-SDS établie en utilisant un standard protéique composé de BSA (67 kDa),  $\beta$ -Lactoglobuline (18 kDa) et  $\alpha$ -Lactalbumine (14 kDa).**

**2. Résultats et discussion**

**2.1. Rendement d'extraction des enzymes coagulantes**

**Tableau V : Rendement d'extraction et concentration en protéines pour les deux ECD non sevré et adulte**

<b>Préparation enzymatique</b>	<b>ECD NS</b>	<b>ECD A</b>
<b>Rendement R(%)</b>	<b>6,16</b>	<b>6,28</b>
<b>Concentration en protéines (mg/ml)</b>	15,33	7,86

La méthode d'extraction de VALLE et FURET (1977) appliquée sur les caillettes de dromadaires non sevrés et adultes nous a permis d'obtenir un rendement d'extraction égale à 6,16% et 6,28% respectivement (Tableau V). Avec la même technique d'extraction, BOUDJENAH, (2012) a obtenu un rendement d'extraction égal à 30% à une température de 42°C en travaillant sur la caillette de dromadaire. Cette différence pourrait être due à la nature des tissus animaux utilisés et aux conditions expérimentales.

**2.2. Caractérisation des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés (NS) et adultes (A)**

**2.2.1. Mesure de l'activité coagulante**

La mesure du temps de floculation selon la méthode de BERRIDGE (1945) modifiée par COLLIN (1977) a permis de calculer l'activité coagulante exprimée par le nombre d'unité présure (UP) (Tableau VI).

**Tableau VI: Activité coagulante (UP) des deux ECD**

<b>Préparation enzymatique</b>	<b>ECD NS</b>	<b>ECD A</b>
<b>Activité coagulante (UP)</b>	12,5	9,09

Il ressort de ce tableau que l'activité coagulante (UP) varie d'un ECD à l'autre. L'extrait issu de caillette de dromadaire non sevré montre une activité coagulante (UP) de 12,5 qui est légèrement supérieure à celle obtenue avec l'extrait issu de caillette de dromadaire

adulte(9,09). Nos résultats ne concordent pas avec ceux rapportés par SIBOUKEUR *et al* (2005), BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2011) et BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2014) qui ont montré que les extraits provenant de caillettes de dromadaires âgés présentent une meilleure activité coagulante pour le lait camelin que ceux provenant de jeunes dromadaires. La différence d'activité peut être associée à la différence de concentrations protéiques trouvées dans les deux ECD.

Suivant la même méthode de mesure de l'activité coagulante, BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2012) ont trouvé une activité coagulante (AC) de 0,41 avec une concentration de 1,64 mg/ml pour une préparation enzymatique issue de caillette d'un dromadaire adulte, alors qu'elle est de 0,135 pour l'extrait de caillette de dromadaire non sevré qui a une concentration de 1,26 mg/ml. ISSELNANE *et al* (2016) ont indiqué une AC de 3,91 avec l'extrait brut d'un dromadaire adulte ayant une quantité de protéines de 30 mg.

D'après HESSAS (2001), le nombre d'unités présure contenues dans le même volume d'extraits varie selon leur origine. L'ECD NS et l'ECD A ont été préparés dans les mêmes conditions et ne diffèrent que par l'âge du dromadaire dont ils proviennent, ce qui peut expliquer l'écart obtenu dans leur activité coagulante.

D'une part, ECK et GILLIS (1997) et BROOME et HICKEY (1990) indiquent que la chymosine est l'enzyme majeure responsable d'au moins 85% de l'activité coagulante totale et la pepsine n'assure que 20%. D'autre part, SIBOUKEUR *et al* (2005) rapportent que la sécrétion de la chymosine diminue au cours de la croissance de l'animal au profit de la pepsine et s'arrête presque totalement après sevrage. De ce fait, la meilleure activité coagulante obtenue avec l'ECD NS pourrait être attribuée au taux de chymosine contenu dans cet extrait qui peut être supérieur par rapport à l'ECD A.

D'après ALAIS et MULTON (1963), la production d'enzyme par caillette d'agneau est inversement proportionnelle à son poids.

### **2.2.1.1. Les facteurs affectant l'activité coagulante de l'ECD NS et de l'ECD A**

#### **2.2.1.1.1. Effet de la température sur l'activité coagulante de l'ECD NS et de l'ECD A**

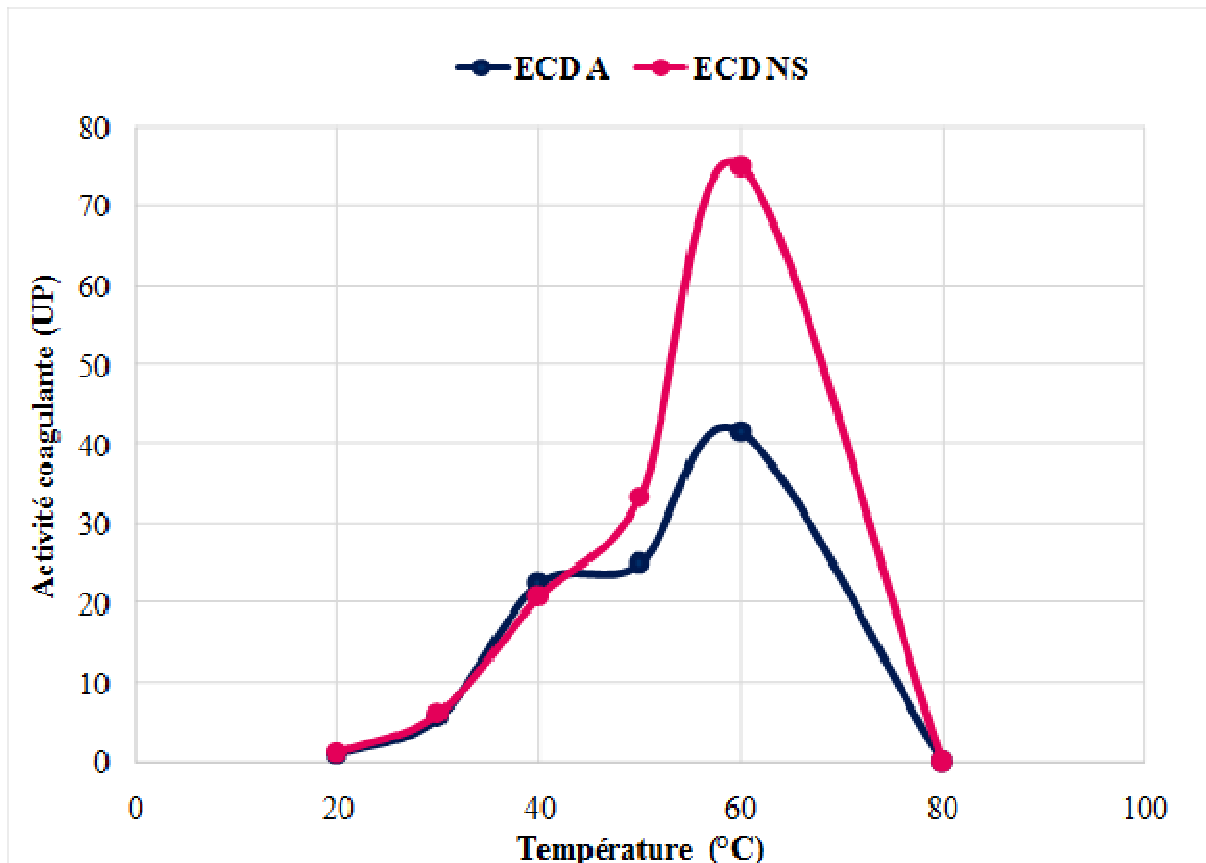
La température affecte fortement la coagulation et le temps de coagulation du lait (DYBOWSKA et FUJIO, 1996 ; TROCH *et al*, 2017).

La détermination de la température optimale d'activité des ECD NS et ECD A a été réalisée en mesurant le temps de coagulation à différentes températures du lait standard allant de 20°C à 80°C.

D'après la figure 14, les comportements des ECD étudiés présentent une légère différence. En effet, quel que soit la température, l'ECD NS donne la meilleure activité coagulante par rapport à l'ECD A.

A des températures de 20°C à 60°C l'activité coagulante augmente progressivement pour les deux extraits enzymatiques.

La meilleure activité coagulante pour les deux ECD est obtenue à la température de 60°C. Au-delà de cette valeur, l'activité baisse pour les deux extraits et fini par s'annuler à 80°C. A cette température, les enzymes coagulantes présentes dans les extraits sont dénaturées.



**Figure 14 : Influence de la température sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.**

TROCHet al (2017) ont rapporté, dans leur description du processus de coagulation du lait par la présure et les facteurs qui l'influencent, qu'au-dessous de 10°C, l'enzyme reste

active mais le gel ne se forme pas. Entre 10°C et 20°C, la coagulation est lente. A 40°C la présure a présenté une activité coagulante optimale. Cette activité ralentie au-dessus de 42°C et s'arrête complètement à 55°C.

Comparativement à la présure bovine, les ECD NS et A semblent renfermer des enzymes coagulantes présentant une thermostabilité accrue. Celle-ci serait due à la structure de ces enzymes et les liaisons qui en existent.

Selon NOUANI *et al* (2011), la température optimale de la pepsine purifiée de poulet est de 40°C. L'enzyme est totalement inactive à une température du lait égale à 55°C. HAMIDI *et al* (2017) ont réalisé la coagulation du lait de dromadaire par l'extrait enzymatique issu de la couche de kaolin du gésier de poulet. Cet extrait avait une température optimale de 42°C.

ABOU EL-YAZID ABD EL-SALAM *et al* (2017) ont signalé que l'optimum d'action pour la préparation enzymatique coagulante extraite des fleurs violettes d'artichaut (*Cynaracardunculus L. ssp. scolymus*) a été observé à 60°C.

Une enzyme coagulante microbienne isolée à partir d'une culture de *Bacillus cereus* a été étudiée par MELACHOURIS et TUCKEY (1968). La vitesse maximale de coagulation de celle-ci a été obtenue à 75-80°C.

D'après ROGELJ *et al* (2001), la présure bovine et la chymosine de veau recombinante ont un optimum d'activité coagulante à une température de 45°C contre 40°C pour la chymosine d'agneau recombinante.

D'après les résultats des auteurs cités dessus, les enzymes coagulantes provenant de microorganismes ainsi que de végétaux semblent avoir la thermostabilité la plus importante par rapport à celles issues d'autres organismes.

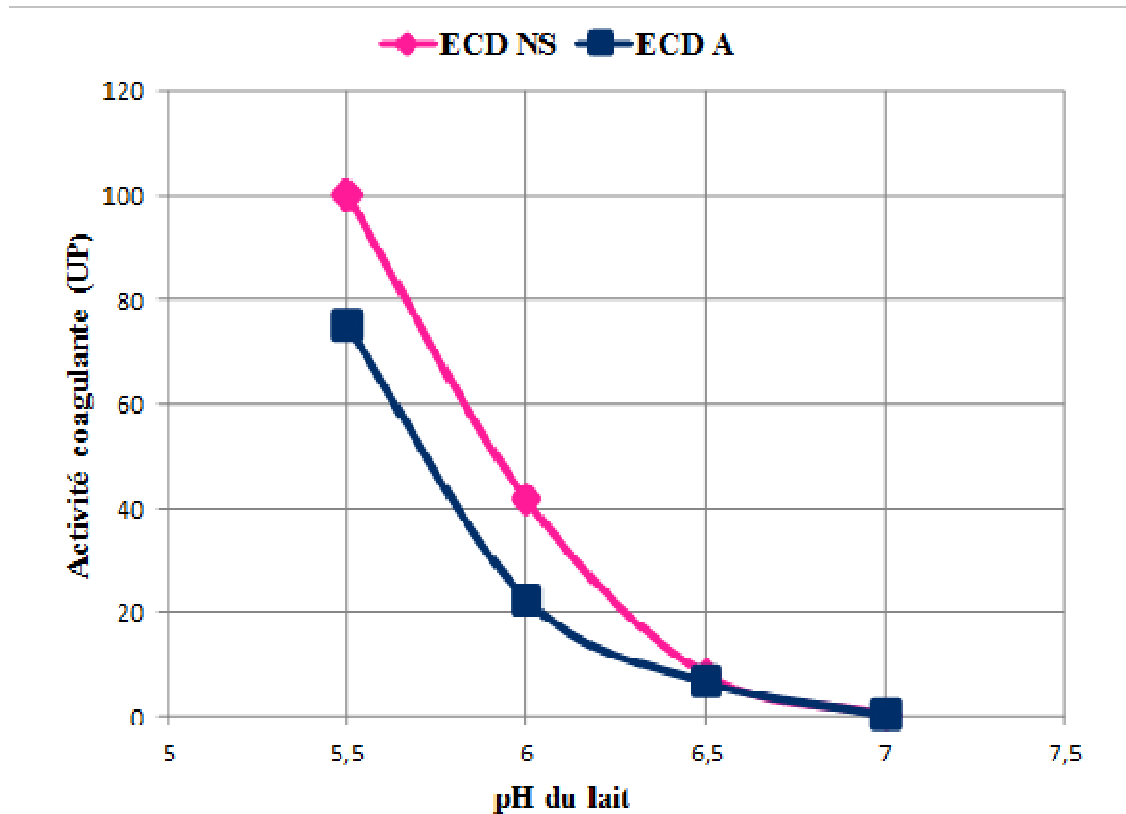
#### **2.2.1.1.2. Effet du pH sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A**

L'influence du pH du lait sur l'activité coagulante (UP) des ECD est illustrée dans la figure 15.

D'après nos résultats, les deux préparations enzymatiques sont sensibles aux variations du pH du lait avec un comportement très semblable. L'activité coagulante optimale est révélée à pH 5,5 (100 UP pour l'ECD NS contre 75 UP pour l'ECD A). Au-delà de cette valeur l'activité diminue jusqu'à atteindre, à pH 7, 0,33 et 0,24, respectivement pour l'ECD NS et l'ECD A.

Les travaux menés par BOUJENAH-HAROUN *et al* (2012) ont montré un optimum d'activité au pH égal à 5,8-6 pour des extraits coagulants issus de caillettes de dromadaires adultes.

Selon CROGUENEC *et al* (2008) cité par TORCH *et al* (2017), LOPEZ *et al* (1998) et LENOIR *et al* (2006) le pH optimum d'activité des enzymes coagulantes d'origine animale est d'environ 5,1-5,5 pour la chymosine et 2 à 3 pour la pepsine et sont inactivées à des pH supérieurs à 7.



**Figure 15 : Influence du pH du lait sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.**

MAACHOU (2004) indique une activité coagulante optimale au pH 5,5 pour la pepsine purifiée de poisson. HAARD *et al* (1982) cité par HAMRANI (2008) rapportent que le pH maximal de coagulation de la pepsine porcine se situe entre 6,4 et 6,6 et au-delà de cette valeur son activité diminue considérablement, par contre la pepsine bovine est capable de coaguler le lait à pH 6,8.

Concernant les travaux réalisés sur les protéases végétales et microbiennes, MOUZALI (2001) a indiqué pour l'extrait brut de cardon un pH optimum d'action égal à 5,2, KUMAR *et al* (2010) ont trouvé une activité coagulante optimale à pH 5,5 de protéase de *Rhizopus oryzae* et FERNANI (2003) a constaté une activité optimale à pH 5,5 pour une protéase

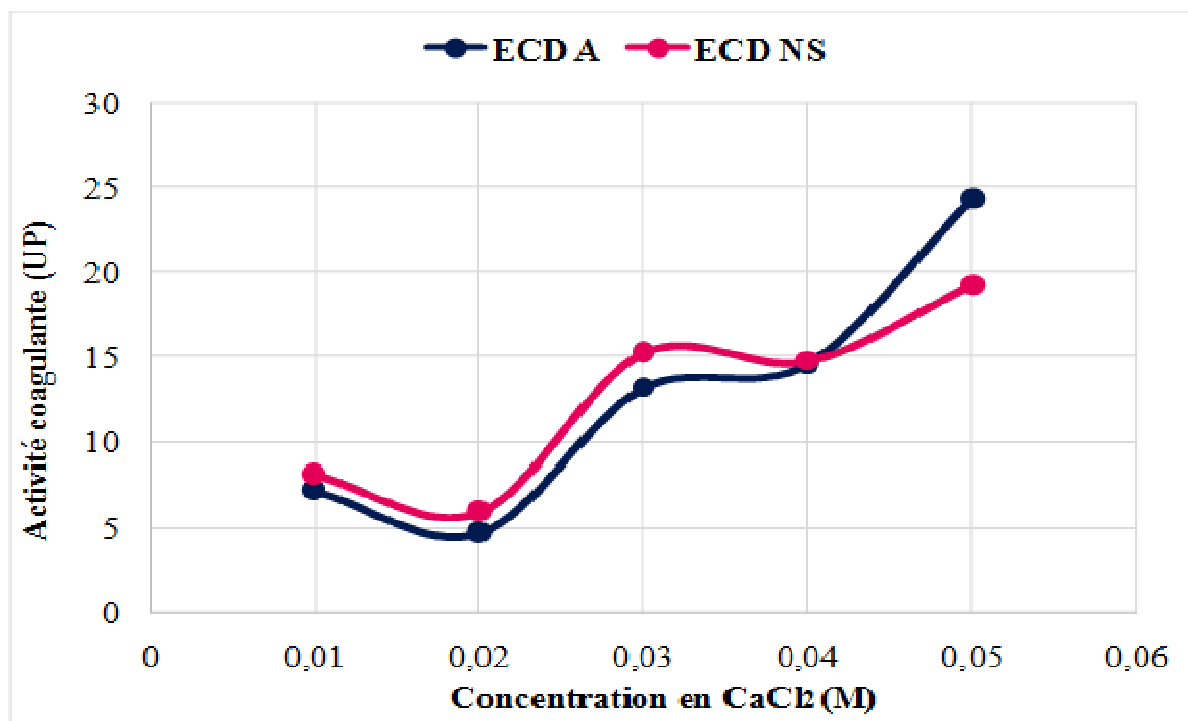
purifiée des graines de melon. Une activité coagulante optimale pour la coagulase de *Bacillus subtilis* (Lc<sub>33</sub>) a été obtenue, d'après MATOUB (2000), au pH 6,2.

D'après RAMET (1990), la diminution du PH du lait de 7 à 5,2 entraîne une réduction du temps de coagulation. Cet abaissement influence la réaction d'agrégation suite à la déstabilisation des micelles liée à la diminution de la charge nette de la caséine (DALGLEISH et LAW, 1988 ; GASTALDI *et al*, 1996) et la libération d'ions de calcium par solubilisation du phosphate de calcium micellaire (VISSER *et al*, 1980 ; LE GRÄET et BRUL, 1993). Ceci pourrait expliquer le temps de coagulation court qu'on a obtenu à pH 5,5.

### 2.2.1.1.3. Effet de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A

Le calcium semble être le facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation (NOUANI *et al*, 2011). Sa teneur affecte le temps de coagulation et la fermeté du gel (TROCH *et al*, 2017).

L'évolution de l'activité coagulante sur le substrat standard par les deux extraits enzymatiques étudiés (ECD NS et ECD A) en fonction de la concentration en CaCl<sub>2</sub> est montrée par la figure 16.



**Figure 16 : Influence de la concentration en CaCl<sub>2</sub> sur l'activité coagulante de l'ECD NS et l'ECD A.**

La figure montre que les deux ECD agissent presque de la même manière vis-à-vis des différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$ . L'ECD NS présente les activités coagulantes les plus importantes par rapport à l'ECD A pour les concentrations allant de 0,01M à 0,03M. A 0,04M l'activité coagulante est similaire entre les deux ECD. L'optimum d'activité est obtenu avec une concentration en  $\text{CaCl}_2$  de 0,05M pour les deux ECD, avec une meilleure activité obtenue avec l'ECD A.

On observe également que l'élévation de la concentration en  $\text{CaCl}_2$  est accompagnée de l'augmentation de l'activité de coagulation sauf aux concentrations de 0,02M pour les deux ECD. En effet, de nombreux travaux montrent qu'un enrichissement en calcium ionique entraîne un raccourcissement du temps de floculation et donc une élévation de l'activité coagulant (RAMET et WEBER, 1980 ; SANDRA *et al*, 2012 ; KAMAL *et al*, 2017).

D'après RAMET et WEBER (1980), l'addition de quantités croissantes de  $\text{CaCl}_2$  au lait entraîne une augmentation de la teneur en phosphate de calcium colloïdal et intervient aussi sur l'abaissement du pH, provoquant la modification des équilibres salins et la réduction de la stabilité micellaire. Il résulte de cette action une hausse de l'activité coagulante, mais également une augmentation de la fermeté du gel formé. Selon SANDRA *et al* (2012), l'ajout de chlorure de calcium, en plus de son effet sur la fermeté des gels, augmente le rendement encaillé.

La présure a un optimum d'activité, selon NOUANI *et al* (2011), à 0,04M de  $\text{CaCl}_2$ . Les mêmes auteurs indiquent que la protéase coagulante extraite à partir du proventricule de poulet (*GALLUS GALLUS*) possède une meilleure activité à 0,02M.

ABD EL-SALAM *et al* (2017) ont montré que l'extrait coagulant brut des fleurs violettes d'artichaut (*Cynara cardunculus* L. ssp. *scolymus*) présente son optimum d'action à une concentration de  $\text{CaCl}_2$  égale à 0,04M contre 0,16M pour l'extrait purifié.

### **2.2.2. Mesure de l'activité protéolytique**

La mesure de l'activité protéolytique des extraits nous permet de caractériser le pouvoir protéolytique de chacun, par la mesure du taux de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des caséines bovines et camelines par les deux préparations coagulantes (ECD NS et ECD A) obtenu par la mesure de l'absorbance à 660 nm (Figure 17).

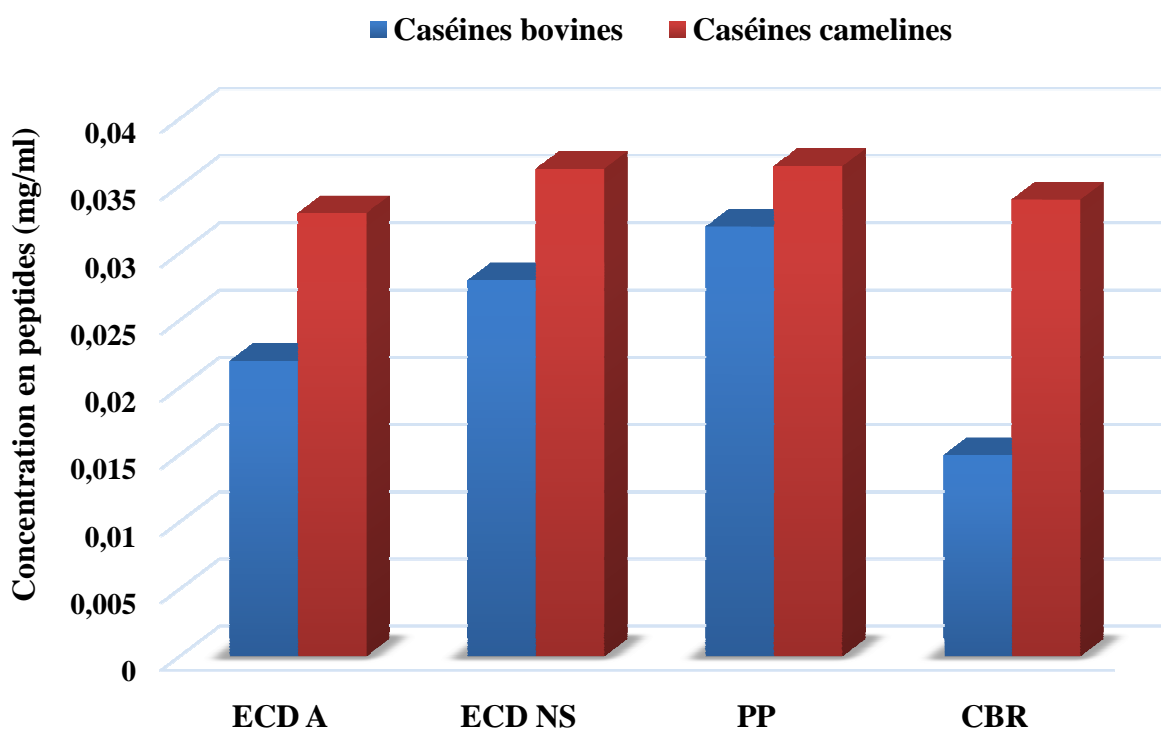
Nous avons employé la pepsine porcine (PP) et la chymosine bovine recombinante (CBR) comme témoins.

Le taux de peptides libérés par les extraits enzymatiques étudiés et par les deux références (PP et CBR) est proportionnel à leur activité protéolytique.

D'après la figure 13, l'activité protéolytique de la PP sur les caséines bovines et camelines est la plus importante, suivie par l'ECD NS, puis l'ECD A et enfin le CBR qui présente l'activité protéolytique la plus faible. Cependant, l'activité protéolytique semble plus importante sur les caséines camelines que sur les caséines bovines.

L'activité protéolytique de l'ECD A sur les caséines bovines est proche de la CBR, contrairement à l'ECD NS qui présente une activité proche de la PP.

Sur les caséines camelines, on a noté une plus grande activité protéolytique avec les quatre extraits avec une activité similaire d'une part, entre l'ECD A et la CBR et d'autre part, entre l'ECD NS et la PP. Cela laisse supposer qu'il y en a une plus grande hydrolyse des caséines avec libération des acides aminés ainsi que des peptides de faibles poids moléculaire avec l'ECD NS qu'avec l'ECD A.



**Figure 17 : Le taux de peptides issus de la protéolyse des caséines bovines et camelines par les ECD NS, ECD A, PP et CBR.**

Au cours de la coagulation du lait, en plus de l'attaque de la caséine  $\kappa$ , d'autres sites comme la caséine  $\alpha_{1}$  et  $\beta$  sont susceptibles à la protéolyse. Cette hydrolyse diffère d'une

enzyme à une autre. L'attaque de la caséine  $\alpha_1$  et  $\beta$  par la chymosine est plus lente que l'attaque spécifique de la caséine  $\kappa$  par un facteur d'environ 100 (DALGLEISH, 1982).

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par HESSAS (2001), SIBOUKEUR *et al* (2005) et BOUDJENAH-HAROUN *et al* (2014), qui ont montré que l'extrait gastrique issu de caillette d'un dromadaire adulte est caractérisé par une activité moins importante qu'un extrait issu de caillette de dromadaire non sevré.

Une forte activité protéolytique est généralement indésirable en technologie laitière car, si la quantité de peptides libérés de cette hydrolyse enzymatique est élevée elle serait à l'origine du développement d'amertume dans les fromages (SIBOUKEUR *et al*, 2005).

### **2.1.3. Le rapport activité coagulante /activité protéolytique (AC/AP)**

Le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique mesurée sur les caséines bovines et camelines est indiqué dans le tableau VI.

**Tableau VII : Rapport AC/AP pour les extraits coagulants.**

	<b>Caséines bovines</b>	<b>Caséines camelines</b>
<b>ECD NS</b>	446,43	344,35
<b>ECD A</b>	413,18	275,45

Nous remarquons que le rapport AC/AP est plus important dans le cas des caséines bovines avec une valeur plus élevée pour l'ECD NS. Nous constatons que l'activité des ECD est meilleure sur les caséines bovines que sur les caséines camelines.

D'après FOX *et al* (2000) cité par HATTEM *et al* (2017), des extraits de caillettes de dromadaires ont été utilisés pour coaguler le lait de vache avec succès. De plus, JENSEN *et al* (2013) indiquent que la chymosine cameline recombinante présente une activité de coagulation supérieure de 70% à celle de la chymosine bovine recombinante vis-à-vis du lait bovin.

Le rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique pour les préparations enzymatiques représente l'indice d'appréciation de la qualité des enzymes coagulantes.

Sa mesure permet de déterminer l'aptitude d'une préparation enzymatique à coaguler le lait et nous renseigne également sur la qualité du produit fini, car une valeur élevée de ce rapport reflète un excellent produit avec une fermeté désirable et aucune libération d'arômes amers.

### **2.3. Analyse électrophorétique en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS) des extraits de caillettes de dromadaires non sevrés et adultes**

Dans le but d'avoir une idée sur la nature des différences pouvant être mises en évidence entre un extrait de caillette provenant d'un animal non sevré et celui provenant d'un animal adulte, nous avons examiné le comportement de ces extraits en électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de Dodécyl Sulfate de Sodium (SDS) et du  $\beta$  mércaptoéthanol. Le profil électrophorétique obtenu est représenté dans la figure 18.

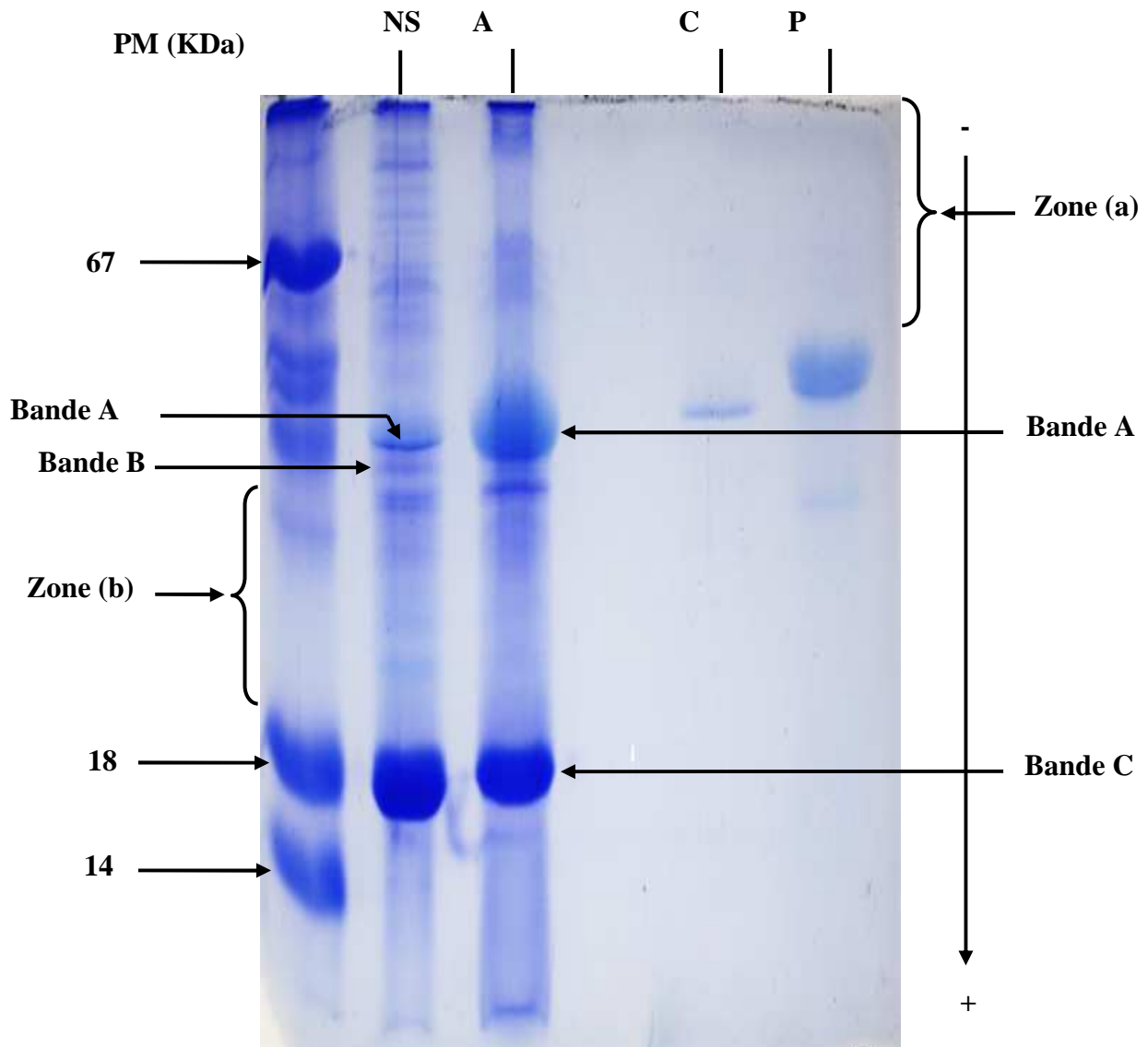
Les deux extraits d'origines différentes varient dans leur comportement électrophorétique ce qui reflète l'existence de différences quantitatives et qualitatives remarquables dans leur composition protéique.

Sur l'électrophorégramme, les protéines migrent en fonction de leur poids moléculaire, sous forme de bandes de largeur et d'intensité différentes. Celles qui présentent une largeur et une intensité de coloration plus ou moins importantes sont notées A, B et C selon l'ordre croissant de leur migration. Tandis que les protéines présentant des bandes proches et de faible intensité sont groupées dans deux zones notées (a) et (b).

En comparant les profils des deux ECD, nous constatons que :

La bande A est présente dans l'ECD NS et l'ECD A, mais avec une plus forte intensité au niveau de l'ECD A. Ceci peut être attribué à sa concentration élevée dans ce dernier par rapport à l'ECD NS. Sa masse moléculaire (MM) est d'environ 41,51 kDa et migre à un niveau très proche de la chymosine bovine recombinante ayant une MM d'environ 44 kDa, mais aussi légèrement inférieur à celui de la pepsine porcine qui possède une MM d'environ 48 kDa. Il a été rapporté par ANDREN (1992) que chez l'espèce bovine, après la naissance, le veau produit des quantités faibles de pepsinogène, mais avec l'âge sa sécrétion augmente et devient le zymogène prédominant dans la caillette. BROOME et LIMSOWTIN (1998) ont également rapporté que la caillette d'un animal mature peut contenir jusqu'à 90 à 94% de pepsine. Donc, nous pouvons suggérer que la bande A, d'intensité croissante en allant de l'ECD NS à l'ECD A et d'un PM situé au voisinage des deux enzymes de référence (pepsine et chymosine), pourrait correspondre à la pepsine. Ceci pourrait être confirmé par les résultats de ISSELNANE *et al* (2016), qui ont montré que l'extrait de caillette de dromadaire adulte purifié présente une seule bande sur PAGE-

SDS avec une MM de 38 kDa et qui migre de façon similaire à la pepsine porcine sur PAGE native ;



**Figure 18: Profil électrophorétique en PAGE-SDS avec  $\beta$ -ME des extraits de caillottes de dromadaires. (T=17%, C=2,7%).**

NS : extrait de caillotte de dromadaire non sevrés (ECD NS) ;


A : extrait de caillotte de dromadaire adulte (ECD A) ;

C : chymosine bovine recombinante (Chymax) ;

P : pepsine porcine ;

Protéines étalons (Sérum Albumine Bovine 67 kDa ;  $\beta$ -Lactoglobuline 18 kDa ;  $\alpha$ -Lactalbumine 14 kDa.

- La bande B, contrairement à la bande A, est d'intensité importante dans l'ECD NS et très faible dans l'ECD A. Son niveau de migration est presque proche de celui de la chymosine recombinante. Elle comporte une MM avoisinant 39 kDa qui est très proche de celle trouvée par KAPPELER *et al* (2006) pour la chymosine cameline recombinante (40 kDa). GARNOT *et al* (1977), GUILLOTEAU *et al* (1984) et ANDREN (1992) indiquent que la concentration de chymosine chez un veau nouveau-né est 5 à 10 fois plus supérieure à celle de la pepsine A et semble être indépendante de l'âge de l'animal, mais sensiblement liée à l'allaitement. On se référant à ces résultats on pourrait associer la bande B à la chymosine ;
  
- La bande C, la plus large et la plus intense des bandes obtenues, est bien focalisée dans les deux extraits. Elle correspond à un PM d'environ 17 kDa. Nous pouvons supposer qu'elle pourrait correspondre au lysozyme si on se réfère à ce qui est rapporté par JOLLÈS *et al* (1990). Ces auteurs indiquent que le lysozyme camelin se focalise en une seule bande lors d'une électrophorèse PAGE SDS dont la MM est de l'ordre de 14,795 kDa.  
Le lysozyme est sécrété dans la lumière de l'estomac, particulièrement au niveau de la partie fundique de la muqueuse, en concentrations élevées (PAHUD et WIDMER, 1982 cité par DOBSON *et al*, 1984) ce qui est traduit par la forte intensité de la bande C. d'après DOBSON *et al* (1984), le lysozyme est exprimé à tous les âges chez les ruminants, ce qui pourrait expliquer l'apparition de la bande C dans les deux ECD ;
  
- Les bandes protéiques de la zone (a) contenues dans les deux ECD se caractérisent par une faible intensité de coloration, un niveau de migration presque similaire et des MM supérieurs à 50 kDa ;
  
- La zone (b) renferme des bandes d'intensité faible et de MM compris entre 36 kDa et 23 kDa. Trois bandes sont observées uniquement dans l'ECD NS, ce qui nous permet de supposer que l'extrait de caillette du jeune dromadaire possède des protéines de rôle indéterminé que le dromadaire adulte aurait perdu au cours de son évolution.



*Conclusion  
générale*

## **Conclusion générale**

Nous avons effectué l'extraction des enzymes coagulantes à partir de caillettes d'un dromadaire non sevré (13 mois) et d'un autre adulte (8 ans) en adoptant un protocole d'isolement approprié.

Deux préparations coagulantes brutes ont été obtenues (l'ECD NS et l'ECD A). Ces deux extraits avaient une teneur en protéines égale à (15,33 mg/ml) et (7,86 mg/ml), respectivement.

Ces ECD ont été testés sur leurs activités coagulantes et protéolytiques. Les résultats ont montré qu'ils ont tous deux un bon pouvoir coagulant avec une meilleure aptitude à coaguler le lait standard marquée pour l'ECD NS. L'activité protéolytique évaluée sur les caséines bovines et camelines était plus faible avec l'ECD A que l'ECD NS, notant un niveau de protéolyse plus élevé sur les caséines camelines.

La détermination du rapport de l'activité coagulante sur l'activité protéolytique a révélé que les ECD sont meilleures sur les caséines bovines que les caséines camelines et que l'ECD NS présente le rapport activité coagulante/activité protéolytique le plus élevé.

La mesure de l'activité coagulante aux différentes conditions de température, de pH et de concentration en  $\text{CaCl}_2$ , affirme que l'activité optimale est atteinte en utilisant ces extraits à des températures allant de 40°C à 60°C, un pH voisin de 5,5 et une concentration de  $\text{CaCl}_2$  égale à 0,05M.

Afin de comparer la composition protéique des deux ECD, nous avons utilisé une PAGE-SDS. L'électrophorégramme obtenu a révélé une différence dans le contenu protéique des extraits. L'ECD NS renferme une bande qui pourrait correspondre à la chymosine. La principale bande pour l'ECD A pourrait être une pepsine, cette bande a été également observée pour l'ECD NS mais avec une plus faible intensité. Au niveau de l'ECD A, la bande qui peut être attribuée à la chymosine est faiblement représentée.

En perspectives, l'approfondissement dans l'étude moléculaire des enzymes coagulantes issus de dromadaires non sevrés et adultes, utilisant différentes techniques de séparation et de séquençage, est nécessaire pour cerner la relation structure-fonction et comprendre à quoi sont dues les différences d'activités entre ces enzymes, et contribuer ainsi à les comparer avec celles d'autres espèces.



*Références  
bibliographiques*

**ABBAS S., HIFSA A., AALIA N. et LUBNA S. (2013).** Physico-chemical analysis and composition of camel milk. *International Research*, 2(2), 85-98.

**ABDEL-MAJIED E.M. et TAHA A.A.M. (2003).** Morphological, morphometric and histochemical characterization of the gastric mucosa of the camel (*Camelus dromedaries*). *Anatomia Histologia. Embryologia*, 32, 42-47.

**ABOU EL-YAZID ABD EL-SALAM B., ABD EL-HAMID IBRAHIM O. et ABD EL-RAZEK EL-SAYED H. (2017).** Purification et caractérisation de l'enzyme de coagulation du lait de l'artichaut (*Cynaracardunculus L.*) Fleurs comme coagulant sur le fromage blanc à pâte molle. *International Journal of Dairy Science*, 12(4), 254-265.

**AHN J., CAO M.-J., YU Y.Q. et ENGEN J.R. (2013).** Reproducibility and Specificity of Pepsin and other Aspartic Proteases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(6), 1222–1229.

**ALAIS C. et MULTON C. (1963).** Étude de la sécrétion d'enzyme coagulant dans la caillette de l'agneau. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 3 (1), 65-70.

**AL JASSIM R. et HOGAN J. (2013).** Camel Nutrition for Meat Production; in: "Camel Meat and Meat Products" ed CABI, India.

**ALMEIDA C. M., GOMES D., FARO C., et SIMÕES I. (2015).** Engineering a cardosin B-derived rennet for sheep and goat cheese manufacture. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-13.

**ANDREN A. (1992).** Production de prochymosine, de pepsinogène et de progastricsine, et leur localisation cellulaire et intracellulaire dans la muqueuse de l'abomasal bovin. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum*, 210, 59-64.

**ANONYME (2018).** Production. Passerelle sur la production laitière et les produits laitiers. F.A.O.

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

**BABELHADJ B., BENAÏSSA A., ADAMOÛ A., TEKKOUK-ZEMMOUCHI F., RAACHE S., BABELHADJ T. et GUNTARD C. (2017).** Morpho-zoometric approach of female camels (*Camelus dromedaries L.*) of the Sahraoui and Targui Algerian populations. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 70(2), 65-69.

**BANGA-MBOKO H., GODEAU J.M., DRION P.V., EL AMIRI B., DRION V., PERENYI Z., SOUSA N.M. et BECKERS J.F. (2002).** Evaluation de l'utilisation du pepsinogène sanguin comme biomarqueur de l'intégrité de la muqueuse gastrique chez le porc. 1. Historique, physiopathologie de la muqueuse gastrique et différentes formes de pepsinogènes. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146, 339-346.

**BANSAL N., DRAKE M.A., PIRAINO P., BROE M.L., HARBOE M., FOX P.F. et MCSWEENEY P.L.H. (2009).** Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 19, 510–517.

**BARDHAN K.D., STRUGALA V. et DETTMAR P.W.(2011).** Reflux revisited: advancing the role of pepsin. *International Journal of Otolaryngology*, DOI: 10.1155/2012/646901.

**BAYOUMI S. (1990).** Études sur la composition et la coagulation de la présure du lait de chamelle. *KielerMilchwirtschaftForschungsberichte*, 42, 3-80.

**BELLO A., ONYEANUSI BI., SONFADA ML., ADEYANJU JB., UMARU MA. et ONU JE. (2014).** Gross embryonic differentiation of the stomach of the one humped camel (*Camelusdromedarius*). *Anatomy and Physiology*, 4(1), 131.

**BEN AMIRA A., BESBES S., ATTIA H. et BLECKER C. (2017).** Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, S76-S93.

**BERHE T., SEIFU E., IPSEN R., KURTU M. Y. et HANSEN E. B. (2017).** Processing Challenges and Opportunities of Camel Dairy Products. *International Journal of Food Science & Technology Online*.

**BERRIDGE N. J. (1945).** The purification and crystallization of rennin. *Biochemical Journal*, 39, 179-187.

**BERRYAC., HUMPHREYSAM.J., MATHARUA P., GRANGERAR., HORROCKSB P., MOONCR.P., CERTAC U., RIDLEYCR.G., BURC D. et KAYA J. (1999).** A distinct member of the aspartic proteinase gene family from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *FEBS Letters*, 447(2-3), 149-154.

**BOGGETTO N. et REBOUD-RAVAUX M. (2001).** La protéase du VIH et le développement d'inhibiteurs. *Virologie*, 5(6), 9-18.

**BORNAZ S., SAHLI A., ATTALAH A., et ATTIA H. (2009).** Physicochemical characteristics and renneting properties of camels' milk: a comparison with goats', ewes' and cows' milks. *International Journal of Dairy Technology*, 62(4), 505-513.

**BOTHAM K.M., WEIL A., RODWELL V.W., KENNELLY P.J. et BENDER D.A. (2017).** Biochimie de Harper. De Boeck Supérieur, 6<sup>ème</sup> éd., NOTO, Paris et Bruxelles, p 64.

**BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE C.L., MOULTI-MATI F., SI AHMED S., MAHBOUB N., SIBOUKEUR O. et MATI A. (2011).** Comparative study of milkclotting activity of crude gastric enzymes extracted from camels' abomasum at different ages and commercial enzymes (rennet and pepsin) on bovine and camel milk. *Emirate Journal of Food and Agriculture*, 23 (4), 301-310.

**BOUDJENAH-HAROUN S. (2012).** Aptitude à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, Algérie.

**BOUDJENAH-HAROUN S., LALEYE S., CODJO L., SENOUSSE C., MOULTI-MATI F., SI AHMED S. et MATI A. (2012).** Coagulation du lait de chamelle en utilisant des enzymes gastriques dromadaires comme un substitut de la présure commerciale. *American Journal of Food Technology*, 7, 409-419.

**BOUDJENAH-HAROON S., SOUID W., BALLA A., SENOUSSE C., ALMI D., SI AHMED S. et MATI A. (2014).** Coagulating bovine milk with enzymes extracted from camel milk. *Livestock Research for Rural Development*, 26(3).

**BOUDJENAH-HAROON S., ISSELNANE S. et MATI A. (2017).** Study of the affinity of extracts from dromedary abomasums for cow's milk. *Agricultural Research and Technology: Open Access Journal*, 12(3), 1-5.

**BREZOVECKI A., ČAGALJ M., DERMIT Z. F., MIKULEC N., LJOLJIC D. B. et ANTUNAC N. (2015).** Camel milk and milk products. *Mljekarstvo*, 65 (2), 81-90.

**BROOME M.C. et HICKEY M.W. (1990).** Comparison of fermentation produced chymosin and calf rennet in cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 53-59.

**BROOME, M. C. et G. K.Y LIMSOWTIN. (1998).** Milk coagulants. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 188-190.

**BRULÉ G., LENOIR J. et REMEUF F. (2006).** La Micelle de Caséine et la Coagulation du Lait ; in : « Le fromage » ed. Eck et Gillis. Tec & Doc., 3<sup>ème</sup>éd., Lavoisier, Paris.

**BURGER P.A. (2016).** The history of old world camelids in the light of molecular genetics. *Tropical Animal Health and Production*, 48, 905-913.

**CAMPOS L.A. et SANCHO J. (2003).** The active site of pepsin is formed in the intermediate conformation dominant at mildly acidic pH. *FEBS Letters*, 538(1-3), 89-95.

**CAVALCANTI M.T.H., TEIXEIRA M. F. S., LIMA FILHO J. L. et PORTO A. L. F. (2004).** Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardioopsis* sp. *Bioresource Technology*, 93, 29-35.

**CEPIL, 1987.** Le lait matière première de l'industrie laitière. INRA, Paris.

**CHAOUI-KHEROUATOU1 N. et ATTIA H. (2008).** Etude comparative des caséines camelines (*camelus dromedarius*) et bovines. *Sciences et Technologie*, 28, 73-79.

**CHAZARRA S., SIDRACH L., LOPEZ-MOLINA D. et RODRIGUEZ-LOPEZ J. N. (2007).** Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynarascolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17, 1393-1400.

**CHEHMA A. (2003).** Productivité pastorale et productivité laitière en Algérie. Lait de chamelle pour l'AFRIQUE. FAO ; *Production et Santé Animale*, 2, 43-51.

**CHEN H., ZHANG G., ZHANG Y., DONG Y. et YANG K. (2000).** Functional implications of disulfide bond, Cys206- Cys210, in recombinant prochymosin (chymosin). *Biochemistry*, 39, 12140-12148.

**CHITPINTYOL S. et CRABBE M. J. C. (1998).** Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61, 395-418.

**COLLIN J.C., GRAPPIN R. et LEGREAT Y. (1977).** Etude de la méthode de mesure, selon BERRIDGE, du temps de coagulation du lait additionné d'une solution enzymatique. *Revue Laitière Française*, 355, 389-394.

**COOPER J.B., KHAN G., TAYLOR G., TICKLE I.J. et BLUNDELL T.L. (1990).** X-ray analyses of aspartic proteinases II: Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 214(1), 199-222.

**CZINN S.J. et BLANCHARD S.S. (2011).** Developmental anatomy and physiology of the stomach ; in « Pediatric gastrointestinal and liver disease » Elsevier, 4<sup>ème</sup> éd., Science Direct, p 262-268.

**DALGLEISH D.G. et LAW J.R. (1988).** pH-induced dissociation of bovine casein micelles. I. Analysis of liberated caseins. *Journal of Dairy Research*, 55, 529-537.

**DEBOUZ A., GUERGUER L., HAMID OUDJANA A. et HADJ SEYD A. (2014).** Etude comparative de la qualité physico-chimique et microbiologique du lait de vache et du camelin dans la wilaya de Ghardaïa. *ElWahat pour les Recherche et les Etudes*, 7(2), 10-17.

**DOBSON D.E., PRAGER E.M. et WILSON A.C. (1984).** Stomach lysozymes of ruminants: I. Distribution and catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 259 (18), 11607-11616.

**DYBOWSKA E. et FUJIO Y. (1996).** Effect of temperature and gluconolactone (GDL) concentration on milk aggregation and gelation process as revealed by optical method. *Milchwissenschaft*, 51, 557-560.

**EIGEL W. N., BUTLER J. E., ERNSTROM C. A., FARRELL H. M., HARWALKAR J. V. R., JENNESS R. et WHITNEY R. M. (1984).** Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631.

**ECK A. (1990).** Le fromage. Tec & Doc., 2<sup>ème</sup> éd, Lavoisier, Paris.

**ECK A. et GILLIS J.C. (1997).** Le Fromage. Tec & Doc., 3<sup>ème</sup> éd., Lavoisier, Paris.

**EL-ZUBEIR I.E.M. et JABREEL S.O. (2008).** Fromage frais de lait de chamelle coagulé avec Camifloc. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 90-95.

**EMMONSCE D.B., REISER B., GIROUX R.N. et STANLEY D.W. (1976).** Cheddar cheese made with bovine pepsin. I. yield and quality of cheese. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 9(4), 189-200.

**ESKANDARI M. H., HOSSEINI A., ALASVAND ZAVASVAND S. et AMINLARI M. (2012).** Cloning, Expression, Purification and Refolding of Caprine Prochymosin. *Food Biotechnology*, 26(2), 143-153.

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

**FARAH Z. et BACHMANN M. R. (1987).** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42(11), 689-692.

**FARAH Z. et RUEGG M. W. (1989).**The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Structure*, 8(2), 6.

**FARAH Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 60, 603–626.

**FARRELL J. H. M., JIMENEZ-FLORES R., BLECK G. T., BROWN E. M., BUTLER J. E., CREAMER L.K., HICKS C. L., HOLLAR C. M., NG-KWAI-HANGK. F. et SWAISGOOD H. E. (2004).** Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk--Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87, 1641-1674.

**FAYE B., CHAIBOU M. et VIAS G. (2012).** Integrated impact of climate change and socioeconomic development on the evolution of camel farming systems. *British Journal of Environment and Climate Change*, 2(3), 227-244.

**FAYE B. (2014).**The camel today: asserts and potentials. *Anthropozoologica*, 49(2), 167-176.

**FAYE B. et KONUSPAYEVA G. (2017).** Le lait de chamelle : nouvelle frontière du développement laitier dans les pays du sud ? ; in : « le Lait, Vecteur de Développement », 2<sup>ème</sup> éd., IAV Hassan II, INRA, CIRAD, Rabat, Maroc, p 39-40.

**FERNANI L. (2003).** Obtention et caractérisation d'une protéase coagulant le lait à partir de gain de melon *cucumis melon L.* Thèse Magister en Sciences agronomiques, Université de M'Hamed Bouguerra, Boumerdes, Algérie.

**FITAK R.R., MOHANDESAN E., CORANDERT J. et BURGER P.A. (2016).**The de novo genome assembly annotation of a female domestic dromedary of North African origin. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 314-324.

**FITZGERALD P.M.D., MCKEEVER B.M., VAN MIDDLESWORTH J.F., SPRINGER J.P., HEIMBACH J.C., LEU-CHIH-TAI, HERBER W.K., DIXON R.A.F. et DARKE P.L. (1990).** Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 14209-14219.

**FOLTMAN B. (1969).** Prochymosin and chymosin (prorennin and rennin). *Biochemical Journal*, 115(3), 3-4.

**FOLTMANN B., PEDERSEN V.B., JACOBSEN H., KAUFFMANT D. et WYBRANDTF G. (1977).** The complete amino acid sequence of prochymosin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.*, 74, 2321-2324.

**FOLTMAN B., LONBLAD P. et AXELSEN N. H. (1978).** Demonstration of chymosin (EC 3.4.23.4) in the stomach of newborn pig. *Biochemical Journal*, 160, 425-427.

**FOLTMAN B., PEDERSEN V. B., KAUFFEMAN D. et WYBRANDT G. (1979).** The primary structure of calf chymosine. *The Journal of Biological, Chemistry*, 254(17), 8447-8456.

**FOLTMANN B. et AXELSEN N.H. (1980).** Gastric proteinases and their zymogens. Phylogenetic and developmental aspects. *FEBS. Proceedings*, 60, 271-280.

**FOX P. F., MCSWEENEY P. L. H., COGAN T. M. et GUINEE T. P. (2004).** Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology, Volume 1. Elsevier, 3<sup>ème</sup>éd., Academic Press, London.

**FUSEK M. et VETVICKA V. (1995).** Asparticproteinase: physiologie and pathologie. CRC Press. Boca Raton, New York, London et Tokyo.

**GARG S. K. et JOHRI B. N. (2009).** Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10(3), 313-355.

**GARNOT P., TOULLEC R., THAPON J.L., MARTIN P., HOANG M.T., MATHIEU C.M. et RIBADEAU-DUMAS B. (1977).** Influence of age, dietary protein and weaning on calf abomasalenzymic secretion, *Journal of Dairy Research*, 44, 9-23.

**GASTALDI E., LAGAUDE A. et TARODO DE LA FUENTE B. (1996).** Micellar transition state in casein between pH 5.5 and 6.0. *Journal of Food Science*, 61, 1-7.

**GEBREYOHANES GM. et ASSEN MA. (2017).** Adaptation Mechanisms of Camels (*Camelus dromedarius*) for Desert Environment: A Review. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 8(6), 486.

**GILLIAND G. L., WINBORNE E. L., NACHMAN J. et WOLODAWER A. (1990).** The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins*, 8(1), 82-101.

**GREEN M.L. et STACKPOOLE A. (1975).** The preparation and assessment of a suitable *Mucorpusillus Lindt* proteinase swine pepsin mixture for Cheddar cheese making. *Journal of Dairy Research*, 42, 297-312.

**GROZDANOVIC M.M., BURAZER L. et GAVROVIC-JANKULOVIC M. (2013).** Kiwifruit (*Actinidiadeliciosa*) Extract Shows Potential as a Low-Cost and Efficient Milk-Clotting Agent. *International Dairy Journal*, 32, 46-52.

**GUILLOTEAU P., CORRING T., TOULLEC R. et ROBELIN J. (1984).** Enzyme potentialities of the abomasum and pancreas of the calf. I. and mdash; Effect of age in the preruminant, *Reproduction Nutrition Development*, 24(3), 315-325.

**HAMIDI M., CHOUKRI A., et HACHI M. (2017).** Influence of the camel breed factor on cheese production with an extract of kaolin of chicken gizzard in Algeria; preliminary study. *Livestock Research for Rural Development*, 29(5), 85.

**HAMRANI L. (2008).** Étude comparative de deux protéases coagulant le lait, extraites de pro ventricules de poulet (*Gallus gallus*) et d'estomacs de limon (*Seriolasp.*). Thèse de Magister. Institut national agronomique El Harrach, Algerie.

**HARBOE M.K. and FOLTMANN B. (1975).** Bovine pepsin: the sequence of the first 65 amino acid residues (completing the sequence of the first 110 residues of bovine pepsinogen). *FEBS. Letters*, 60.

**HATTEM H. E., HASSABO R. M., SALEH A. E. et MOUSSA M. A. (2017).** A study of milk clotting activity of crude gastric rennet extracted from camels' abomasum at different ages. *Journal of Agricultural Research*, 95 (3), 1299-1309.

**HAZEBROUCK S. (2016).** Laits de chèvre, d'ânesse et de chamelle : une alternative en cas d'allergie au lait de vache?. *Innovations Agronomiques, INRA*, 52,73-84.

**HESSAS I. (2001).** Contribution à l'amélioration de l'aptitude technologique du lait camelin : Effet de l'utilisation d'un extrait stomacale de dromadaire sur le temps de floculation. Thèse d'Ingénieur, Institut d'Agronomie Sahararienne, Université de Ouargla, Algérie.

**HIDAKA M., SASAKI K., UOZUMI T. et BEPPU T. (1986).** Cloning and structural analysis of the calf prochymosin gene. *Gene*, 43, 197-203.

**HILL R.J. et WAKE R.G. (1969).** Amphiphile nature of k-casein as the basis for its micelle stabilizing property. *Nature*, 221, 635-639.

**HOLLER H., BREVES G. et LECHNER-DOLL M. (1989).** Profils et taux de renouvellement en minéraux dans le pré-estomac de dromadaires pâturant en diverses saisons au Kenya. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42(1), 81-87.

**HORNBUCKLE W.E., SIMPSON K.W. et TENNANT B.C. (2008).** Gastrointestinal Function ; in « Clinical Biochemistry of Domestic Animals » Academic Press, 6<sup>ème</sup> éd., Science Direct, p 413- 457.

**IBRAHIM AHMED A., HASSAN AHMED A. et ZARROUG HASSAN I. (2014).** Gross Anatomical and Histometric Studies on the Stomach Glandular Sacs of the Dromedary Camel (*Camelus dromedarius*). *Sudan Journal of Science and Technology*, 15(1), 46-56.

**ILBOUDO A.J., SAVADOGO A., SEYDI M.G., et TRAORE A.S. (2012).** Place de la matière azotée dans le mécanisme de la coagulation présure du lait. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 6(6), 6075-6087.

**ISSELNANE S. (2014).** Caractérisation chromatographique et électrophorétique de l'extrait coagulant issu de caillettes de dromadaires adultes. Mémoire de Magister en Sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri, Tizi-ouzou, Algérie.

**ISSELNANE S., BOUDJENAH-HAROUN S., NOUANI A., SI AHMED-ZENNIAS., BOUAZZAB., YABRIR B. et MATI A. (2016).** Molecular characterization of crude enzymatic extract from algerian camel abomasum (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(3), 217-223.

**INGR M., UHLÍKOVÁ T., STRÍSOVSKÝ K., MAJEROVÁ E. et KONVALINKA J. (2003).** Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the "fireman's grip" and dimerization. *Protein Science*, 12(10), 2173-82.

**JACOB M., JAROS D. et ROHM H. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.

**JENNESS R. et SLOAN R.E. (1969).** The composition of milk of various species. *A review Dairy Science Abstracts*, 32, 599-612.

**JENSEN L.J., MØLGAARD A., POULSEN J.C.N., HARBOE M.K., SIMONSEN J.B., LORENTZEN A.M., HJERNØ K., VAN DEN BRINK J.M., QVIST K.B. et LARSEN S. (2013).** Camel and bovine chymosin : the relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica*, 69, 901-913.

**JOLLÈS J., PRAGER E.M., ALNEMRI E.S., JOLLÈS P., IBRAHIMI I.M. et WILSON A.C. (1990).** Amino Acid Sequences of Stomach and Nonstomach Lysozymes of Ruminants. *Journal of Molecular Evolution*, 30, 370-382.

**JOUANY J. P. et KAYOULI C. (1989).** La digestion microbienne chez les camélidés. Options Méditerranéennes - Série Séminaires – n°2, 89-96.

**JOUANY J.P. (2000).** La digestion chez les camélidés ; comparaison avec les ruminants. *INRA Productions Animales*, 13(3), 165-176.

**KADIM I.T., MAKGOUB O. et PURCHAS R.W. (2008).** A review of the growth, and of the carcass and meat quality characteristics of the one-humped camel (*Camelus dromedaries*). *Meat Science*, 80(3), 555-569.

**KAGEYAMA T. (2002).** Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cellular and Molecular life Sciences*, 59(2), 288-306.

**KAMAL M., FOUKANI M. et KAROUI R. (2017).** Effect of heating and calcium and phosphate mineral supplementation on the physical properties of rennet-induced coagulation of camel and cow milk gels. *Journal of Dairy Research*, 84(2), 220-228.

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

**KAPPELER S.R., VAN DEN BRINK H.M., RAHBECK-NIELSEN H., FARAH Z., PUHAN Z., BECH HANSEN E. et JOHANSEN E. (2006).** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 647-654.

**KASSA A.H. (2016).** Paper reviewed article on the physiology and adaptive mechanism of camel/dromedary in semi-desert and arid environment. *International Journal of Current Research*, 8(6), 33116-33124.

**KAYOULI C., JOUANY J.P., DARDILLAT C. et TISSERAND J.L. (1995).** Particularités physiologiques du dromadaire : conséquences pour son alimentation. Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches 03.

**KHAN A. R. et JAMES M.N. (1998).** Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic. *Protein Science*, 7(4), 815-836.

**KONUSPAYEVA G., CAMIER B., GAUCHERON F. et FAYE B. (2014).** Some parameters to process camel milk into cheese. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(4), 354-358.

**KORLEPARA R. G., ADARSH M.K., VYSHNAVI M. et SRIKANTH K. (2017).** Camel milk an white gold of dessert- A Review. *International Archive of Applied Science and Technology*, 8(3), 74-83.

**KULA T.J. et TEGEGNE D. (2016).** Chemical Composition and Medicinal Values of Camel Milk. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(4), 13-25.

**KUMAR A., GROVER S., SHARMA J. et BATISH V.K. (2010).** Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(4), 243-258.

**LAEMMLI U. K. et FAVRE M. (1973).** Maturation of the head of the bacteriophage T4. 1. DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, 80, 575-599.

**LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMED M.A. (1986).** Analysis of the casein content in camel (*Camelus dromedarius*) milks. *Swedish Journal of Agricultural Research*, 16, 13-18.

**LECHNER-DOLL M., VON ENGELHARDT W., ABBAS A.M., MOUSA H.M., LUCIANO L. et PEALE E. (1995).** Particularities In Forestomach Anatomy, Physiology and Biochemistry of Camelids Compared to Ruminantia; in : Elevage et alimentation du dromadaire. Camel production and nutrition, Options Méditerranéennes. Série B : Tisserand JL (Ed.). n°13, CIHEAM, 19-32.

**LE GRÄET Y. et BRUL G. (1993).** Les équilibres minéraux du lait : influence du pH et de la force ionique. *Lait*, 73, 51-60.

**LENOIR J., REMEUF F. et SCHNEID N. (2006).** Le Lait de Fromagerie ; in : « Le fromage » ed. Eck et Gillis. Tec & Doc, 3ème éd., Lavoisier, Paris.

**LONGO-HAMMOUDA F.H. et MOUATS A. (2008).** Comparaison de l'anatomie, la physiologie de la digestion et le métabolisme des camélidés par rapport aux ruminants. *Journal Algérien des Régions Arides*, 7, 5.

**LOPEZ M.B. LOMHOLT S.B. et QVIST K.B. (1998).** Rheological properties and cutting time of rennet gels. Effects of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal*, 8, 289-293.

**LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.

**MACHALINSKI C., PIRPIGNANI M.L., MARINO C., MANTEGAZZA A. et DE JIMENEZ BONINO M.B. (2006).** Structural aspect of Mucor bacilliformis proteinase, a new member of the aspartyl-proteinase family. *Journal of Biotechnology*, 123, 443-452.

**MAACHOU D. (2004).** Extraction et purification de protéase coagulant le lait en vue de leur substitution à la présure traditionnelle : Essai d'obtention d'une protéase issue d'estomac de poisson *serioladumerli*. Mémoire de Magister en Sciences agronomiques, Université M'Hamed Bouguerra, Boumerdes, Algérie.

**MAHAJAN R. T. et BADGUJAR S. B. (2010).** Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. *Journal of Pharmacy Research*, 3(9), 2048-2068.

**MAHAUT M., JEANTET R. et BRULE G. (2005).** Initiation à la Technologie Fromagère. Tec & Doc., Paris, France, p 1-21.

**MAHBOUB N., TELLI A., SIBOUKEUR O., BOUJENA-H AROUN S., SLIMANI N. et MATI A. (2010).** Contribution à l'amélioration de l'appétit fromagère du lait camelin :

étude des conditions de conservation des enzymes gastriques camelines. *Annales des Sciences et Technologie*, 2(1), 71-79.

**MANDY J., DORIS J., et HARALD R. (2011).** Recent advances in milk clotting enzymes. Review, *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14-33.

**MARTIN P., TRIEU-CUOT P., COLLIN J. C. et RIBADEAU DUMAS B. (1982).** Purification and characterization of bovine gastricsin. *European journal of Biochemistry*, 122, 31-39.

**MATOUB L. (2000).** Essai de purification et de caractérisation d'une coagulase produite par la souche locale *Bacillus subtilis* (Lc<sub>33</sub>). Mémoire de Magistère en Sciences agronomiques, Institut National d'Agronomie, El-Harrach, Algérie.

**MD. IMTAIYAZ H., et FAIZAN A. (2010).** Progastricsin : structure, function and its role in tumor progression. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(3), 118-127.

**MEHAIA M.A. (1987).** Studies on camel milk casein micelles ; treatment with soluble and immobilized chymosin. *Milchwissenschaft*, 42, 706-708.

**MEHAIA M.A. (1993).** Fromage blanc frais et doux (type Domiati) à partir de lait de chamelle : Composition, rendement et évaluation sensorielle. *Journal of Dairy Science*, 76, 2845-2855.

**MEHAIA M.A., HABLAS M.A., ABDELRAHMAN K.M. et EL-MOUGY S. A. (1995).** Milk composition of mayahemwadah and hamra camels in Saudi Arabia. *Food chemistry*, 5, 115-122.

**MELACHOURIS N. et TUCHEY S.L. (1968).** Properties of a milk-clotting microbial enzyme. *Journal of Dairy Science*, 51(5), 650-655.

**MERCIER J.C., GROSCLAUDE F. et MARTIN P. (1991).** La caséine  $\kappa$  et la famille multigénique des trois caséines « sensibles au calcium » Polymorphisme, biosynthèse et évolution. *Médecine/Sciences*, 7(3), 1-8.

**MOHAMED M. A., LARSSON-RAZNIKIEWICZ M. et MOHAMUD M. A. (1990).** Hard cheese making from camel milk. *Milchwissenschaft*, 45(11), 716-718.

**MOHAMED AHMED I. A., MORISHIMA I., BABIKER E. E., et MORI N. (2009).** Dubiumin, achymotrypsin-like serine protease from the seeds of *Solanumdubium*Fresen. *Phytochemistry*, 70(4), 483-491.

**MOUZALI L. (2001).** Extraction enzymatique et caractérisation de l'agent coagulant de la fleur de cardon sauvage *Cynaracardunculus*. Mémoire de Magister en Sciences agronomiques, Institut National d'Agronomie, El-Harrach, Algérie.

**MUNDLE M. (2014).** Are transgenic food crops safe for human consumption?. *Journal of Comprehensive Health*, 2, 8-17.

**NAGASAWA T., SANO K., KAWAGUCHI M., KOBAYASHI K., YASUMASU S. et INOKUCHIT. (2016).** Purification and molecular cloning of aspartic proteinases from the

stomach of adult Japanese fire belly newts, *Cynops pyrrhogaster*. *Journal of Biochemistry*, 159(4), 449–460.

**NASR A.I. A.M., MOHAMED AHMED I.A., et HAMID O.I. A. (2016).** Characterization of partially purified milk-clotting enzyme from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Food Science and Nutrition*, 4(5), 733-741.

**NEWMAN M., SAFRO M., FRAZAO C., KHAN G., ZDANOV A., TICKLE I.J., BLUNDELL T.L. et ANDREEVA N. (1991).** X-ray analysis of aspartic proteinases IV. Structure and refinement at 2.2 Å resolution of bovine chymosin. *Journal of Molecular Biology*, 221, 1295-1309.

**NOUANI A., HAMRANI L. et BELLAL M.M. (2011).** Purification et caractérisation de protéase coagulant le lait extraite à partir du proventricule de poulet (GALLUS GALLUS). *Neuvièmes Journées de la Recherche Avicole*, Tours.

**OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J.M., DALGALARRONDO M., CHOISSET Y. et HAERTLE T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian Yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, 77, 601-613.

**O'Sullivan M. et Fox P.F. (1991).** Evaluation of microbial chymosin from genetically engineered *Kluyveromyces lactis*. *Food Biotechnology*, 5(1), 19-32.

**OUAJD O. et KAMEL B. (2009).** Physiological particularities of Dromedary (*Camelus dromedarius*) and experimental implications. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences*, 36, 19-29.

**PALMA J.M., SANDALIO L.M., CORPAS F.J., ROMERO-PUERTAS M.C., MCCARTHY I. et DEL RIO LA. (2002).** Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 521–30.

**PARK Y.N., AIKAWA J.I., NISHIYAMA M., HORINOUCHE S. et BEPPU T. (1996).** Involvement of a residue at position 75 in the catalytic mechanism of a fungal aspartic proteinase, *Rhizomucorpusillus* pepsin. Replacement of tyrosine 75 on the flap by asparagine enhances catalytic efficiency (Article). *Protein Engineering*, 9(10), 869-875.

**PARK Y.N., AIKAWA J.I., NISHIYAMA M., HORINOUCHE S. et BEPPU T. (1997).** Site-directed mutagenesis of conserved Trp39 in *Rhizomucorpusillus* pepsin: Possible role of Trp39 in maintaining Tyr75 in the correct orientation for maximizing catalytic activity (Article). *Journal of Biochemistry*, 121(1), 118-121.

**PEARL L. et BLUNDELL T. (1984).** The active site of aspartic proteinases. *FEBS Letters*, 174(1), 96-101.

**PEDERSEN V.B., CHRISTENSEN KA. et FOLTMANN B. (1979).** Investigations on the activation of bovine prochymosin. *European journal of Biochemistry*, 94, 573-580.

**PEYER D.E., et FABREGUES B. (1989).** Le dromadaire dans son milieu naturel. *Revue d'Élevage et de la Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 42, 127-132.

**POLGAR L. (1987).** The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis. *FEBS Letters*, 219(1), 1-4.

**PRUD'HOM M., CORDESSE R., DE ROUVILLES. et THIMONIER J. (1993).** Les camélidéssud-américains. Le point des connaissances -INRA production animale. g.1., p 5-15.

**PUNGERCAR J., STRUKELJ B., GUBENSEK F., TURK V. et KREGAR I. (1990).** Complete primary structure of lamb preprochymosin deduced from cDNA. *Nucleic Acids Research*, 18,1.

**RAJI A.R. (2011).** Morphological and histochemical investigation of the camel (*Camelus dromedarius*) abomasal mucous membrane by light and scanning electron microscopy (SEM). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 37, 304-308.

**RAMET J.P. et WEBER F. (1980).** Contribution à l'étude de l'influence des facteurs de milieu sur la coagulation enzymatique du lait reconstitué. *Le Lait*, 60(591-592), 1-13.

**RAMET J.P. (1985).** Study of enzymatic coagulation of camel milk in Saudia-Arabia. Mission Report. FAO.

**RAMET J. P. (1990).** Les agents de transformation du lait ; in : « Le Fromage » ed. ECK, Tec & Doc., 2<sup>ème</sup> éd., Lavoisier, Paris.

**RAMET J.P. (1993).** La Technologie des Fromages au Lait de Dromadaire (*Camelus dromedarius*). Etude FAO, production et santé animale, 113, Rome.

**RAMET J.P. (1994).** Les aspects scientifiques et la technologie spécifique pour la production de fromage au lait de chamelle. Actes de l'atelier sur le lait de dromadaire et de chamelle, Nouakchott, Mauritanie.

**RAMET J. P. (1997).** Propriétés physiques du coagulum ; in : « Le Fromage, de la Science à l'Assurance de Qualité » ed. Eck A., et Gillis J.C. (coordonnateurs), Tec & Doc., 3<sup>ème</sup> éd., Lavoisier, p 324-333.

**RAMET J.P. (2001).** The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedarius*). Animal Production and Health Paper, FAO, 113, 67 p.

**RAMPILLI M., LARSEN R. et HARBOE M. (2005).** Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal*, 15, 1130-1137.

**RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V. (1998).** Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology*, 62(3), 597-635.

**RICHTER C., TANAKA T. et YADA R.Y. (1998).** Mecanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochemical Journal*, 335, 481-490.

**ROGELJ I., PERKO B., FRANCKY A. et PUNGERCAR J. (2001).** Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production. *Journal of Dairy Science*, 84(5), 1020-1026.

**SAHAH M. A., MIR S. A. et PARAY M. A. (2013).** Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science and Technology*, 94(1), 5-16.

**SAMLOFF I.M. (1989).** Peptic ulcer: the many proteinases of aggression. *Gastroenterology* 96, 586-595.

**SANDRA S., HO M., ALEXANDER M. et CORREDIG M. (2012).** Effect of soluble calcium on the renneting properties of casein micelles as measured by rheology and diffusing wave spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 91(1), 75-82.

**SBOUI A., KHORCHANI T., DJEGHAM M. et BELHADJ O. (2009).** Comparaison de la composition physicochimique du lait camelin et bovin du Sud tunisien ; variation du pH et de l'acidité à différentes températures. *Afrique Science*, 5(2), 293-304.

**SCHECHTER I. et BERGER A. (1967).** On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Commun.*, 27, 157-162.

**SCRIBAN R. (1999).** Biotechnologie. Tec& Doc., 5<sup>ème</sup> éd., Lavoisier, Paris.

**SENOUSSI A., BRAHIMI Z. et BEZIOU S. (2017).** Portée de l'élevage camelin en Algérie et perspectives de développement. *Revue des Bio Ressources*, 7(1), 29-38.

**SHAMET K.M., BROWN R. J. et Mc MAHON D.J. (1992).** Proteolytic activity of some milk clotting enzymes on caseins. *Journal of Dairy Science*, 75 (6), 1373-1379.

**SIBOUKEUR O., MATI A. et HESSAS B. (2005).** Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agricultures*, 5, 473-478.

**SIDIKOU D. I., REMY B. et BECKERS J. F. (2005).** Development of a Radioimmunoassay for Bovine Pepsinogen A. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire*, 58 (4), 229-235.

**SMITH M.E. et MORTON D.G. (2010).** The digestive system. Elsevier, 2<sup>ème</sup> éd., Science Direct.

**SOODAM K., POWELL I. B., KENTISH S. E. et GRAS S.L. (2015).** Effect of rennet on the composition, proteolysis and microstructure of reduced-fat Cheddar cheese during ripening. *Science and Technology*, 95(5), 665-686.

**SOUSA M.J. et MALCATA F.X. (2002).** Advances in the role of a plant coagulant (*Cynaracardunculus*) in vitro and during ripening of cheese from several milk species. *Lait*, 82, 151-170.

**SZECSI P.B. (1992).** The aspartic proteases. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 210, 5-22.

**STRISOVSKY K., TESSMER U., LANGNER J., KONVALINKA J. et KRÄUSSLICH H.G. (2000).** Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase : rethinking the "fireman's grip" hypothesis. *Protein Science*, 9(9), 1631-1641.

**SUGUNA K., PADLAN E.A., SMITH K.W., CARLSON W.D. et DAVIES D.R. (1987).** Binding of a reduced peptide inhibitor to the aspartic proteinase from *Rhizopus chinensis*: Implications for a mechanism of action. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 7009-7013.

**TAKAHASHI K. (2013).** Structure and function studies on enzymes with a catalytic carboxyl group(s): from ribonuclease T<sub>1</sub> to carboxyl peptidases. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, 89(6), 201-225.

**TANG J., SEPULVEDA P., MARCINISZYN J., CHEN K.C.S., HUANG W-Y., TAO N., LIU D. et LANIER J.P. (1973).** Amino-acid sequence of porcine pepsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 3437-3439.

**TANG J. (2013).** Pepsin A ; in : « Handbook of Proteolytic Enzymes » Elsevier, 3<sup>ème</sup> éd., Science Direct.

**TITAOUNE M. (2006).** Considération zootechnique de l'élevage du dromadaire dans le Sud-est Algérie : Influence du sexe et de la saison sur certains paramètres sanguins. Thèse de Magistère en Science vétérinaires, Faculté des sciences vétérinaire, Université de Batna, Algérie.

**TROCH T., LEFEBURE E., BAETEN V., COLINET F., GENGLER N. et SINDIC M. (2017).** Cowmilk coagulation : process description, variation factors and évaluation méthodologies. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 21(4), 276-287.

**VALLEJO J.A., AGEITOS J.M., POZA M. et VILLA T.G. (2008).** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichiapastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10606–10610.

**VALLENAS A., CUMMINGS J. F. et MUNNELL J. F. (1971).** Agross study of the compartmentalized stomach of two new world camelids, the lama and guanaco. *Journal of Morphology*, 134, 399-424.

**VALLEJO J. A., AGEITOS J. M., POZA M. et VILLA T. G. (2008).** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *pichiapastoris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10606-10610.

**VALLES E. et FURET J.P. (1977).** Etude des caillettes des bovins à l'état ruminant pour l'obtention des extraits coagulants à base de pepsine bovine ; méthodes d'extraction. *Lait*, 61, 601-617.

**VISSER S., VAN ROOYEN P.J. et SLANGEN C.J. (1980).** Peptide substrates for chymosin (rennin). Isolation and substrate behaviour of two tryptic fragments of bovine  $\kappa$ -casein. *European Journal of Biochemistry*, 108, 415-421.

**VOET D. et VOET J.G. (2016).** Biochimie. De Boeck Supérieur, 3<sup>ème</sup> éd., NOTO, Paris et Bruxelles, p 546-549.

**VON ENGELHARDT W., HAARMEYER P., KASKE M. et LECHNER-DOLL M. (2006).** Chewing activities and oesophageal motility during feed intake, rumination and eructation in camels. *Journal of Comparative Physiology B*, 176, 117–124.

**WANG J.L., LAN J., WANG G.X., LI H.Y. et XIE Z.M. (2000).** Anatomical subdivisions of the stomach of the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Morphology*, 245(2), 161-167.

**WANGO J., FARAH Z. et PUGHAN Z. (1993).** L'extraction de la présure de chameau et sa comparaison avec l'extrait de présure de veau. *Milchwissenschaft Milk Science International*, 48, 322-325.

**WANGO J., FARAH, Z et PUGHAN Z. (1998).** Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, 53, 136-139.

**YAGIL R. (1985).** The Desert camel; comparative physiological adaptation. Ed Karger, Basal.

**YEGIN S. et DEKKER P. (2013).** Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy science and technology*, 93(6), 565-594.

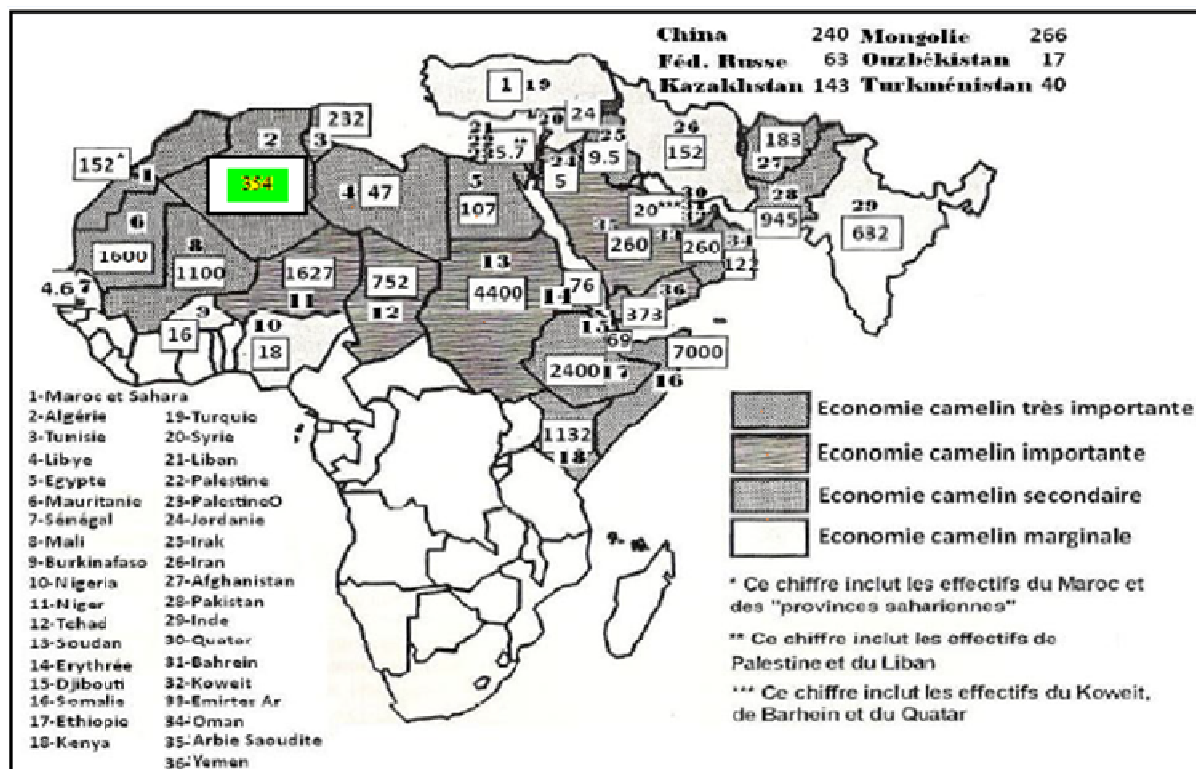
**YU P. L. (1994).** Production de chymosine pour l'industrie laitière par la technologie de l'ADN recombinant. *Biotechnologie Australasienne*, 4(1), 19-23.

**ZHU L., LU L., WANG S., WU J., SHI J., YAN T., XIE C., LI Q., HU M. et LIU Z. (2017).** Oral absorption basics: pathways and physicochemical and biological factors affecting absorption; in « Developing solid oral dosage forms » Elsevier, 2<sup>ème</sup> éd., Science Direct, p 297-329.

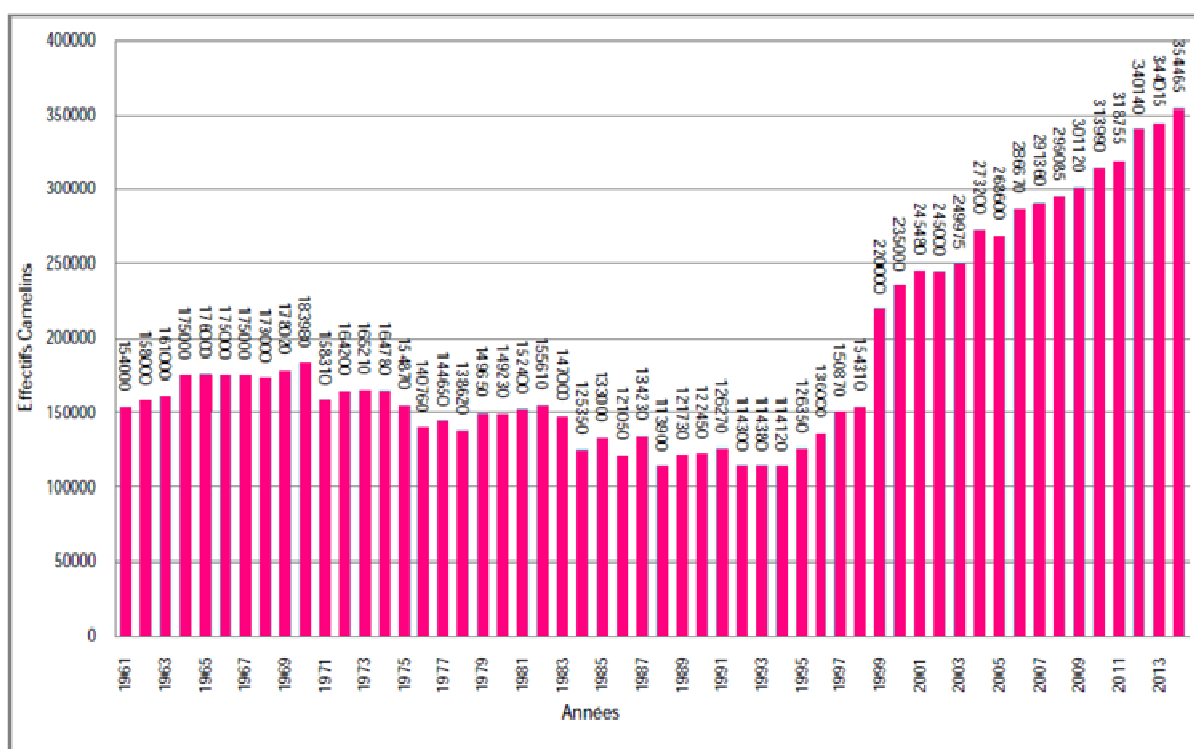


# *Annexes*

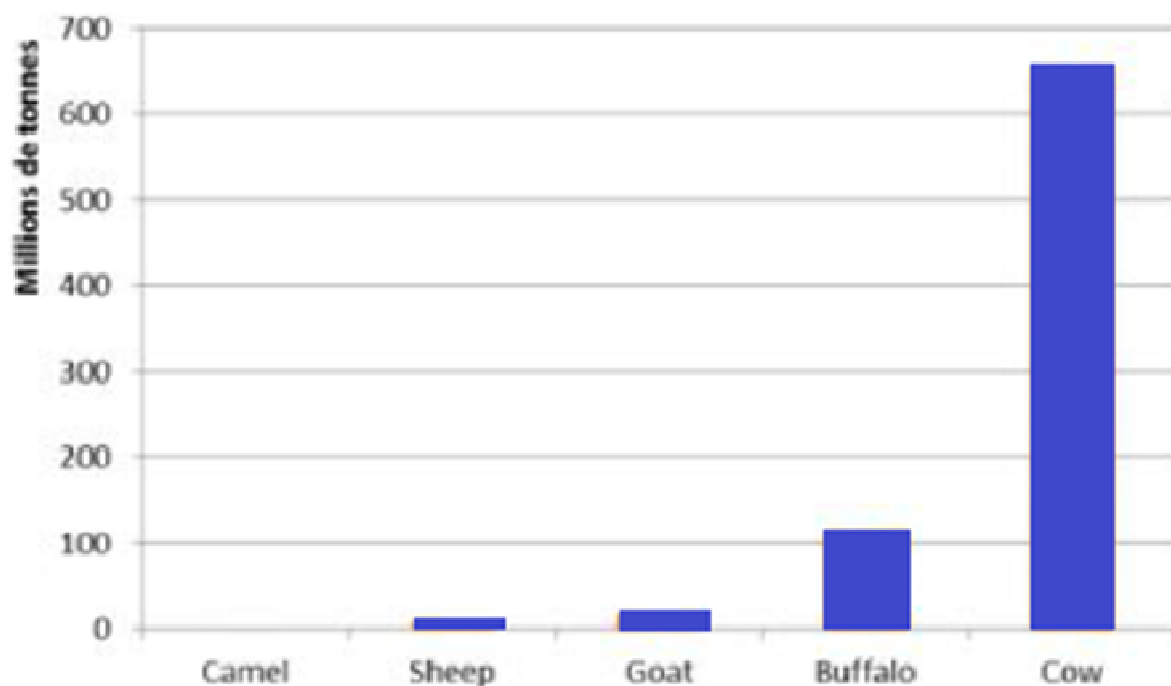
**Annexe 01 : Répartition et effectifs camélins en Afrique et en Asie (Milliers de têtes) (SENOUSSI *et al*, 2017).**



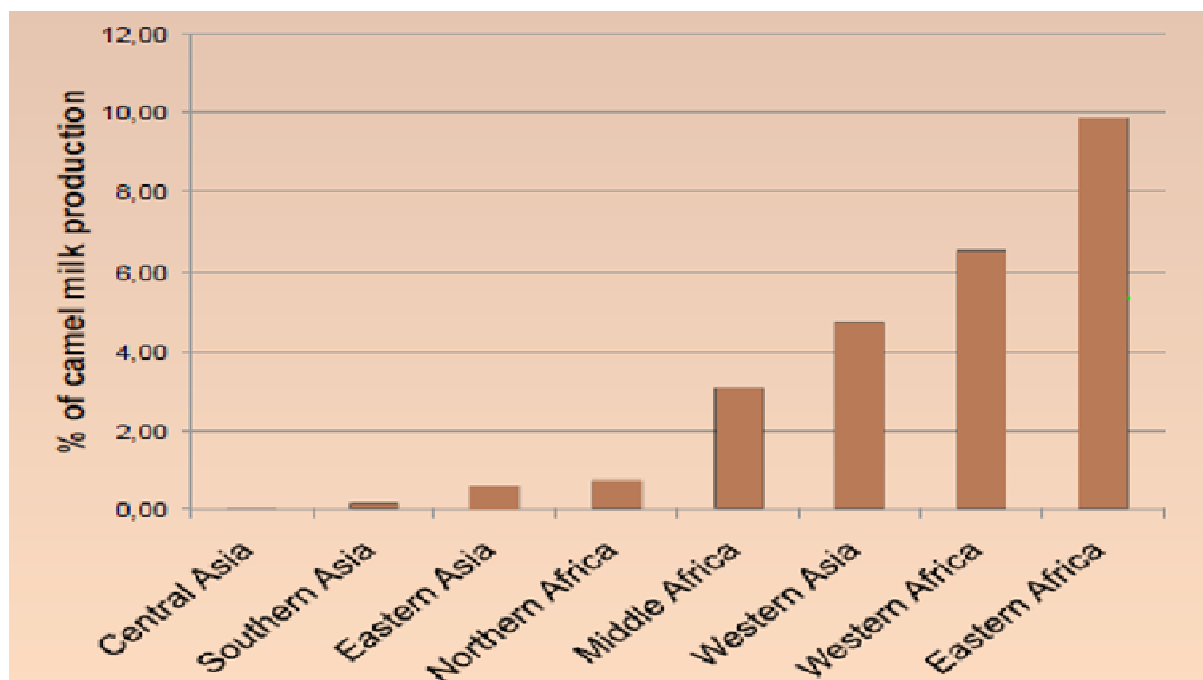
**Annexe 02 : évolution des effectifs camélins en Algérie (SENOUSSI *et al*, 2017).**



**Annexe 03 : Les espèces laitières dans le monde (FAYE et KONUSPAYEVA, 2017).**



**Annexe 04 : La part du lait de chamelle dans le monde (FAYE et KONUSPAYEVA, 2017).**



**Annexe 05 : Les sacs glandulaires (Faye, 1997 cité par TITAOUINE M ,2006).**



**Annexe 06 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951)**

**1. Solutions**

**Solution alcaline A**

- Soude 0,1 N.....500 ml
- Carbonate de sodium anhydre ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ).....10 g

**Solution cuivrique B**

- $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$  (0,32 g/100 ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et de K (1 g/100 ml).....2 ml

**Solution C**

- Solution A.....50 ml
- Solution B.....1 ml

### Solution mère de BSA

- BSA.....10 mg
- Eau distillée (qsp).....100 ml

### Gamme étalon

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

<b>Concentration en BSA <math>\mu\text{g/ml}</math></b>	0	10	30	60	70	80	90
<b>Solution mère de BSA (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	0	100	250	600	700	800	900
<b>Eau distillée (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	1000	900	750	400	300	200	100

### 2. Méthode

- 1 ml d'échantillon contenant 100  $\mu\text{g}$  de protéine maximum et 25  $\mu\text{g}$  minimum :
- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30 mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

### 3. Expression des résultats

Une courbe étalon est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les D.O mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la D.O correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

## **Annexe 07 : Mesure de l'activité protéolytique par la méthode de GREEN et STACKPOOLE (1975).**

### **1. Préparation de la solution tampon phosphate**

**Solution A :** phosphate mono potassique

9,073 g/l ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

**Solution B :** phosphate disodique

11,87g/l ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

Pour avoir une solution tampon à pH = 5,5 mélanger :

97,3 ml de A+ (100-97,3) de B.

### **2. Condition d'hydrolyse**

1 ml de la solution de caséine à 2% dans le tampon phosphate (pH 5,5) est additionné à 1 ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange réactionnel ainsi préparé est incubé pendant 1 heure à 35 °C.

Après incubation, la réaction enzymatique est arrêté par addition de 5 ml de solution trichloracétique (T.C.A) à 12% (P/V). Après 15 minutes de repos, il se forme un précipité blanc que l'on sépare par centrifugation à 6200g/10mn.

### **3. Préparation de l'échantillon**

A 1 ml de filtrat (surnageant obtenu) sont additionnés 5 ml de la solution C. on mélange puis on laisse incubé pendant 10 minutes dans le bain marie à 35 °C. Dans chaque tube, on ajoute 0,5 ml de réactif Folin –ciocalteu et on agite immédiatement. On continue l'incubation pendant 20 minutes.

### **4. Préparation du témoin**

A 1 ml de la solution caséinique à 2% sont additionnés 5 ml de T.C.A à 12 % (pour empêcher la réaction enzymatique) puis 1 ml d'extrait enzymatique dilué. Le mélange ainsi préparé est traité de la même façon que précédemment.

### **5. Courbe étalon de tyrosine**

**Solution étalon :** tyrosine à raison de 100 µg/ml dans une solution tampon phosphate.

**Gamme étalon :** des solutions diluées de concentrations croissantes : 20, 40, 50, 60, 70, 80 µg/ml sont préparées à partir de la solution étalon.

**Dosage :** méthode de LOWRY (annexe 06).

## **Annexe 08 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS).**

### **1. Solutions**

#### **Solution d'acrylamide (A)**

Acrylamide.....	37,5 g
Bis-acrylamide.....	1 g
Eau distillée (qsp).....	100 ml

#### **Tampon du gel de séparation (S)**

Tris.....	18,15 g
Eau distillée.....	100 ml
Ajuster à pH 8,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

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

Tris.....	6 g
Eau distillée (qsp).....	100ml
Ajuster à pH 6,8 avec de l'HCl 4 N (6N)	

#### **Tampon d'électrode 5X (garder à +4°C) solution mère**

Tris.....	15g
Glycine.....	72g
Eau distillée (qsp).....	1000ml

Ajuster à pH 8,3 avec du Tris si le pH de la solution est\_ valeur normal (8,3-8,5)

#### **Tampon d'électrode 1X + SDS (garder à T ambiante)**

Tampon d'électrode 5X.....	200ml
SDS.....	10ml (10%)
Eau distillée (qsp).....	1000ml

#### **Tampon d'échantillon 2X**

Solution (C).....	500µl
Eau distillée.....	250µl
SDS 10 %.....	200µl
2-mercaptoéthanol.....	50µl

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon  
Chauffage à 95°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide  
Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50 % (v/v) et quelques grains de bleu  
debromophénol

• **Coloration au Bleu de Coomassie R 250**

**Solution de fixation**

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

**Solution de coloration**

Bleu de Coomassie R 250.....0,5g  
TCA.....4g  
Méthanol.....100ml  
Eau distillée.....100ml

**Solution de décoloration**

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

**Solution de persulfate d'ammonium**

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

**2. Electrophorèse**

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

Solution (A).....3,23ml  
Solution (S).....1,87ml  
Eau distillée.....2,27ml  
SDS 10 %.....75µl  
TEMED.....11µl  
Persulfate d'ammonium 10 %.....100µl

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

**Préparation du gel de concentration :** T = 4 % et C = 2,7 % (pour une plaque)

Solution (A).....	500µl
Solution (C).....	1,25ml
Eau distillée.....	3,2ml
SDS à 10%.....	50µl
TEMED.....	11µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....	50µl

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

**Dépôt d'échantillon :** 20 µl

**Mise sous tension :** 20 mA, 200 V

**Fixation :** 45 minutes dans la solution de fixation (cas de la coloration au Bleu deCoomassie)

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

**Décoloration :** dans la solution de décoloration.