

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZIOUZOU FACULTE
DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE –MICROBIOLOGIE



Memoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master type stage en Biologie

Options : Biochimie appliquée.

Thème

**La désamidation enzymatique et non
enzymatique des protéines
alimentaires**

**Présenté par : HENNOUCHE Yasmine & OUKALI Hayet
Soutenu le : 11 / 07 / 2017**

Devant le jury :

Présidente :	Mme SENOUSSE CH	Maitre assistante à UMMTO
Examinatrice :	Mme ALMI D	Maitre assistante à UMMTO
Promotrice :	Mme ZENNIA S	Maitre de conférences à UMMTO

2016/2017

Avant-propos

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

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

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

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

- une synthèse des données bibliographiques sur le thème suivant :

La désamidation enzymatique et non enzymatique des protéines alimentaires.

- une partie pratique liée aux contrôle et à l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés ».

Dédicaces

C'est avec respect et grâces que je tiens à exprimer toutes ma reconnaissance et sympathie à :

Dieu, en qui j'ai toujours cru.

Mes chers parents, pour leur amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragé à continuer mes études. Qu'on le bon dieu leur accord une longue vie.

Ma belle-famille, pour leur sympathie, patience et compréhension.

Mon cher fiancé, Tamani S pour avoir toujours été l'oreille écoutante, pour son aide précieux et sa présence sa patience tous le long de ce travail.

Mes sœurs et mes amis qui ont toujours su trouver les mots pour me reconforter.

Mes professeurs, pour leur savoir qu'ils m'ont transmis.

Hayet

Dédicaces

C'est avec respect et grâces que je tiens à exprimer toutes ma reconnaissance et sympathie à :

Dieu, en qui j'ai toujours cru.

Mes chers parents, pour leur amour inconditionnel et pour m'avoir toujours encouragé à continuer mes études. Qu'on le bon dieu leur accord une longue vie.

Ma belle-famille, pour leur sympathie, patience et compréhension.

Mon cher fiancé, pour avoir toujours été l'oreille écoutante, pour son aide précieux et sa présence sa patience tous le long de ce travail.

Mes sœurs et mes amis qui ont toujours su trouver les mots pour me reconforter.

Mes professeurs, pour leur savoir qu'ils m'ont transmis.

Yasmine

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Résumé

Introduction	1
I. Synthèse des données bibliographiques	2
1.1. Rappel sur les protéines	3
1.1.1. Définition et différents types de protéine	3
1.1.2. Les modifications chimiques des protéines	6
1.2. Désamidation enzymatique des protéines	11
1.2.1. Désamidation enzymatique du résidu glutamyle	12
1.2.1.1. Mécanisme d'action des désamidases.....	12
1.2.1.1.1. Les transglutaminases.....	12
1.2.1.1.2. Les peptidoglutaminases	14
1.2.1.1.3. Les protéines-glutaminases	15
1.2.2. Impact de la désamidation enzymatique sur les protéines alimentaires	16
1.3. Désamidation non enzymatique des protéines.....	17
1.3.1. Définition et conditions de réalisation.....	17
1.3.2. Mécanisme de la désamidation non enzymatique	18
1.3.3. Importance de la réaction de désamidation non enzymatique.....	19
1.3.4. Influence de divers facteurs sur la cinétique de désamidation	21
1.3.4.1. Effet du pH.....	21
1.3.4.2. Effet de la température.....	21
1.3.4.3. Effet de la structure de la protéine	22
1.3.5. Système de réparation de la désamidation non enzymatique	22
II. Matériel et méthodes.....	24
2.1. Matériel	25
2.1.1. Appareillages	25
2.1.2. Le petit matériel	25
2.1.3. Matériel biologiques	25
2.1.3.1. Echantillons du lait	25
2.1.3.2. Enzymes et protéines étalon.....	25

2.1.4. Produits et réactifs	26
2.2. Méthodes	26
2.2.1. Méthodes chimiques	26
2.2.1.1. Dosage des protéines	26
2.2.1.2. Dosage des glucides.....	26
2.2.1.3. Dosage de la vitamine C dans le lait.....	27
2.2.2. Préparation des échantillons	27
2.2.2.1. Ecrémage	27
2.2.2.2. Séparation par précipitation acide des protéines bovines.....	27
2.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine	28
2.2.4. Chromatographie de perméation sur gel de Sephacryl S100.....	29
2.2.5. Méthode électrophorétique	31
III-Résultats et discussion	34
3.1. La caractérisation des protéines du lait de vache	35
3.1.1. Teneur en protéines	35
3.1.2. Teneur en lactose	36
3.1.3. Teneur en vitamine C	37
3.2. Fractionnement des protéines sériques et des caséines du lait de vache	38
3.2.1. Chromatographie de perméation sur gel.....	38
3.3. Contrôle électrophorétique des hydrolysats enzymatiques des protéines sériques.....	41
Conclusion.....	43
Références bibliographiques	45
Annexes	55

Liste des abréviations

AD	Maladie d'Alzheimer
α-Lac	α -Lactalbumine
APC	Cellule Présentatrice d'Antigène
β-Lg	β -Lactoglobuline
BSA	Albumine Sérique Bovine
2.6 DCPIP	2.6 dichlorophénol-indophénol
DNE	Désamidation non enzymatique
DNS	Acide 3,5 Dinitrosalicylique
ERN	Espèce réactive d'azote
ERO	Espèce réactive d'oxygène
HLA	Antigène de leucocyte humain
Igs	Immunoglobulines
LR	Lait Reconstitué
LV	Lait de Vache
OGA	N-acetyl- β -D glucosaminidase
O-GlcNAcylation	O-Acétyl-glucosaminylation
OGT	O-linked N acetyl glucosaminyltransferase
PG	Protéine Glutaminase
pH	Potentiel d'hydrogène
PIMT	L-isoaspartyl-méthyltransférase
PM	Poids Moléculaire
PSv	Protéines solubles bovines
PTM	Modifications post traductionnelles
RE	Reticulum endoplasmique
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SPI	Isolat de protéine de soja
TCA	Acide trichloroacétique
TG	Transglutaminase
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UHT	Ultra Haute Température
WPI	Isolat de protéine de lactosérum

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Exemple de la phosphorylation de la serine ; addition d'une charge négative à des conditions faiblement basiques (SCHÔNICHEN <i>et al</i> , 2013).	8
2	La désamidation enzymatique de résidu glutamine en acide glutamique avec libération d'ammonium (SERRA <i>et al</i> , 2016).	12
3	Réactions enzymatiques catalysées par les transglutaminases (ECKERT <i>et al</i> , 2014).	14
4	Effet de la protéine glutaminase sur l'isolât de protéines de lactosérum (MIWA <i>et al</i> , 2013).	16
5	Mécanisme de désamidation non enzymatique du résidu asparagine (MCNALLY et HASTEDT, 2007).	19
6	Vue d'ensemble de la structure cristalline de la L-isoaspartyl-méthyltransférase humaine (RYTTERSGAARD <i>et al</i> , 2002).	23
7	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al</i> , (1951).	27
8	Courbe étalon du dosage du lactose par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).	28
9	Etapas de séparation des protéines du lait bovin.	29
10	Etapas de l'hydrolyse enzymatique par la trypsine des protéines du lait.	31
11	Réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bis acrylamide.	33
12	Photographie d'unité d'électrophorèse	34
13	Chromatographie Sur gel de permeation des protéines sériques bovines sur Sephacryl S100.	41
14	Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions dissociantes et dénaturantes (SDS-PAGE) des fractions de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines.	43

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Résumé de l'ensemble des modifications post-traductionnelles (VOET D et VOET J.G, 2016).	7
II	Résultats de la caractérisation physico-chimique des 3 échantillons du lait de vache.	37

Résumé

Les protéines sont des macromolécules complexes constituées d'unités d'acides aminés de formule chimique $\text{NH}_2\text{-RCH-COOH}$. Elles représentent 15% de la masse corporelle totale et 50% du poids sec des êtres vivants. Ce sont des molécules renouvelables, synthétisées par l'organisme grâce à un apport quotidien en acides aminés. Ces protéines qu'elles soient d'origine animale ou végétale assurent un rôle fondamental pour l'organisme et pour les industries agroalimentaires, pharmaceutiques ou même cosmétiques.

Néanmoins, ces protéines subissent diverses modifications qui peuvent être bénéfiques ou pas. Parmi elles la désamidation enzymatique et non enzymatique des protéines qui a lieu sur les résidus asparaginyle et glutaminyle respectivement. La désamidation enzymatique des résidus Gln est assurée par la glutaminase, la transglutaminase et les peptidoglutaminases, ces enzymes permettent la conversion du glutamyle en acide glutamique. Cette conversion est à l'origine de plusieurs améliorations des protéines et des dérivés de protéines (les hydrolysats, le concentré de protéine... etc.), en effet elles permettent d'améliorer les propriétés technologiques surtout pour les protéines alimentaires telles que la α -zéine, le soja et même les protéines du lactosérum.

La désamidation des protéines joue un rôle important dans la régulation biologique, probablement comme une horloge biologique dans la détermination de la fonction et du catabolisme des protéines ou un signal pour la dégradation des enzymes et des hormones.

Les réactions de désamidation d'Asn, qui se produisent non enzymatiquement dans les peptides et les protéines, ont été largement étudiées dans de nombreux domaines des sciences chimiques et pharmaceutiques.

Au cours du processus de vieillissement, la désamidation non enzymatique peut nuire à de nombreuses protéines, et donc, il est possible que la désamidation spontanée puisse avoir une fonction biologique importante dans la pathogenèse de nombreux troubles humains impliqués dans des tissus vieillissants.

Mots clés: Protéines alimentaires, Désamidation enzymatique, désamidation non enzymatique, résidu asparaginyle, résidu glutaminyle, résidu iso-aspartique.

Abstract

The proteins are complex macromolecule made up of units of amino acids of chemical formula $\text{NH}_2\text{-RCH-COOH}$. They account for 15% of the total body mass and 50% of the dry weight of the alive beings. They are renewable molecules, synthesized by the organization thanks to a daily contribution in amino acids. These proteins which is of origin animal or vegetable ensure a fundamental role for the organization and agroalimentary, pharmaceutical industries or even cosmetics.

Nevertheless, these proteins undergo various modifications which can be beneficial or not. Among them the enzymatic and non enzymatic deamidation of the proteins which takes place on the residue asparaginylyle and glutaminyle respectively. The enzymatic deamidation of the residue Gln east ensured by the glutaminase, transglutaminase and the peptidoglutaminase, these enzymes allow the conversion of glutamyle into glutamic acid. This conversion is at the origin of several improvements of proteins and of derived from proteins (the protein hydrolysate, the protein concentrates...etc), indeed they especially allow improved technological properties for food proteins tell that the α -Zein, the soya and even the proteins of the whey which were used better after their treatments.

The nonenzymatic deamidation of proteins plays a significant role in the biological regulation, probably like a biological clock in the determination of the function and the catabolism of proteins or a signal for the degradation of the enzymes and the hormones.

The reactions of non enzymatic deamidation of Asn, occur in peptides and proteins, they largely studied in many fields of chemical and pharmaceutical sciences.

During the process of ageing, the non enzymatic deamidation can harm many proteins, and thus, it is possible that the spontaneous deamidation can have a significant biological function in the pathogenesis of many human disorders implied in out-of-date fabrics.

Key words: Food proteins, enzymatic deamidation, non enzymatic deamidation, asparaginylyl residue, glutaminyl residue, residue iso-aspartic.



Introduction

Introduction

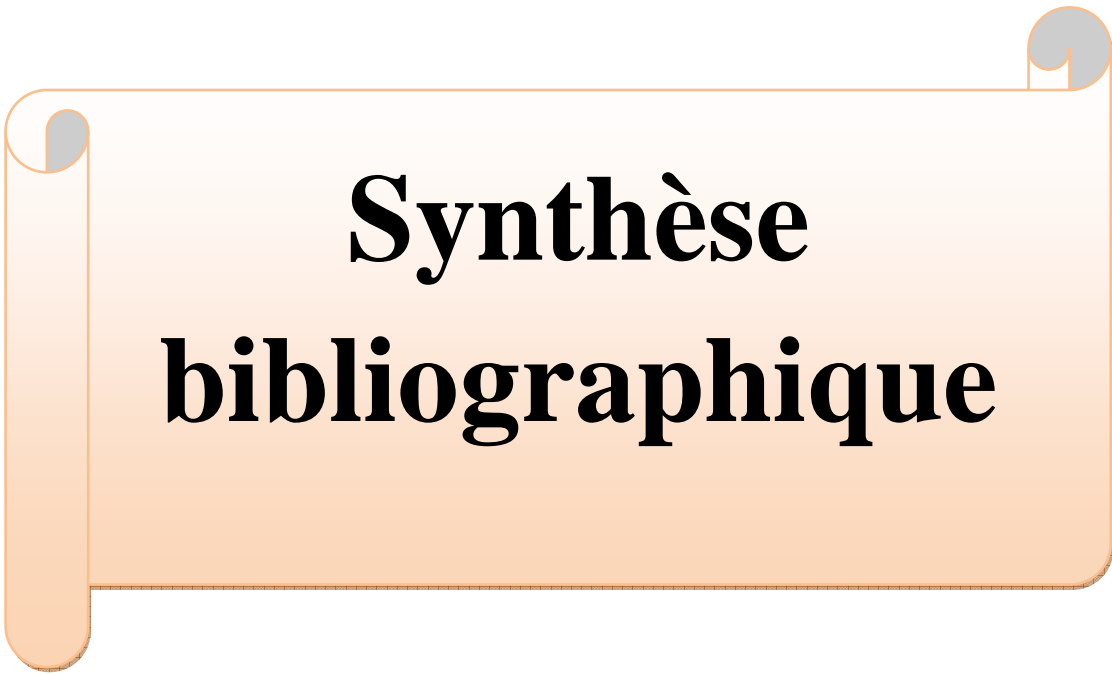
Connu pour leurs importance nutritionnelles, technologiques et biologiques, les protéines constituent une source en acides aminés indispensables, avec un apport énergétique qui n'est pas de moindre, elles comportent des peptides à activité divers d'une part, et d'autre part, elles jouent un rôle fondamental dans l'industrie laitière, dans la mesure où elles sont à la base de fabrication des fromages, yaourts et crème glacées tout comme elles sont utilisées dans différentes industries pour leur propriétés moussantes, émulsifiantes, gélifiantes, hydratantes,...etc. Elles jouent également un rôle fondamental dans la structure et les fonctions cellulaires et c'est à travers ces molécules que l'information génétique est exprimée. Elles sont intimement liées à tous les phénomènes physiologiques.

Les protéines alimentaires sont sujettes à diverses modifications soit après leur biosynthèse et là on parle des modifications post traductionnelles (glycosylation, oxydation, phosphorylation...etc.) ou au cours des procédés de transformations et de traitements.

Ces modifications chimiques des chaînes latérales des protéines peuvent être à l'origine du changement de la nature chimique des résidus d'acides aminés ainsi que le comportement et l'activité des protéines.

Parmi les modifications chimiques, il y a la désamidation enzymatique du résidu glutamyle (Gln) qui est à l'origine de l'amélioration de diverses propriétés technologiques des protéines, telle que la solubilité, le pouvoir moussant et l'émulsification et même l'amélioration de la texture et de la digestibilité. Cette désamidation peut être également à l'origine de certaines maladies telles que la maladie cœliaque.

Un autre type de désamidation ; il s'agit de la désamidation non enzymatique (DNE) du résidu asparaginyle (Asn) qui génère de nombreux effets indésirables, par exemple une diminution de l'activité biologique, une réduction de la stabilité ou encore une augmentation de l'immunogénicité des protéines. Cette DNE peut aussi être à l'origine des maladies comme les protéinopathies dégénératives ; la cataracte, la maladie d'Alzheimer (AD), la maladie de Parkinson (PD), la démence vasculaire et le vieillissement.



Synthèse bibliographique

1.1. Rappel sur les protéines

1.1.1. Définition

Les protéines, nommées aussi biopolymères, sont des macromolécules complexes constituées d'unités d'acides aminés de formule chimique $\text{NH}_2\text{-RCH-COOH}$. Elles représentent 15% de la masse corporelle totale et 50% du poids sec des êtres vivants. Ce sont des molécules renouvelables, synthétisées par l'organisme grâce à un apport quotidien en acides aminés (CUQ, 2006).

Elles jouent un rôle fondamental dans la structure et les fonctions cellulaires et c'est à travers ces molécules que l'information génétique est exprimée. Elles sont intimement liées à tous les phénomènes physiologiques.

Les protéines sont considérées comme des biomolécules de première importance vue :

- Leur présence universelle dans le monde vivant ;
- leur abondance cellulaire : c'est les premiers constituants après l'eau (10 fois plus que les glucides) ;
- leur extrême diversité : elles assurent des fonctions vitales tant structurales que dynamiques et de plus elles sont le support de la spécificité des espèces (CHEVALLIER, 2009).

La structure des protéines se présente sous forme d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques ; qui sont des polymères d'environ une centaine ou plus d'acides aminés appartenant à la série L. Ces acides aminés sont liés entre eux par des liaisons peptidiques ou des liaisons amides.

Les acides aminés sont au nombre de vingt : huit acides aminés sont dits essentiels, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent pas être produits par le corps et doivent donc être directement apportés par l'alimentation, douze sont non essentiels, ils peuvent être soit apportés par l'alimentation, soit produits par le corps à partir d'autres acides aminés.

Les protéines sont sujettes à plusieurs types de classification qui reposent soit sur leur composition soit sur leurs propriétés (fonctionnelles ou physicochimiques) soit sur leur forme tridimensionnelle (VOET D et VOET J.G, 2005).

1.1.2. Classification des protéines

Selon CUQ (2006) les protéines peuvent être classées en trois principales catégories:

- les protéines de structure ;
- les protéines à activités biologiques ;
- les protéines alimentaires.

1.1.2.1. Les protéines de structure :

Parmi les protéines citer : la kératine, le collagène, l'elastine, qui sont présentes dans tous les tissus comme le muscle, l'os, la peau, les organes internes, les membranes cellulaires et les organites intracellulaires.

La fonction de ces protéines dépend de leur structure. Ce sont des protéines fibreuses qui sont souvent oligomériques, composées de chaînes polypeptidiques assemblées le long d'un axe commun, ce qui conduisent à la formation de fibres, de ce fait, elles sont insolubles dans l'eau.

Ces protéines sont localisées dans les tissus de soutiens et de protection. Certains de ces protéines sont très résistants aux enzymes protéolytiques, elles sont utilisées comme des fibres textiles (soie, laine).

1.1.2.2. Les protéines à activités biologiques

Parmi ces protéines les plus citées sont :

- **Les enzymes:** plus de 2000 enzymes sont décrites. Ce sont des protéines dotées de propriétés catalytiques. Les enzymes agissent en abaissant l'énergie d'activation d'une réaction chimique, ce qui accroît la vitesse de la réaction. Presque tous les processus métaboliques de la cellule ont besoin d'enzymes pour se dérouler à une vitesse suffisante pour le maintien de la vie.
- **Les hormones:** Une hormone est une substance chimique biologiquement active, sécrétée par une glande endocrine, agissant à distance et par voie sanguine sur des récepteurs spécifiques d'une cellule cible. Elles transmettent un message sous forme chimique et joue donc un rôle de messenger dans l'organisme.

L'exemple de l'insuline, une hormone protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas, est la première hormone polypeptidique dont la structure a été

connue. La molécule d'insuline est constituée de deux chaînes polypeptidiques : une d'une vingtaine d'acides aminés (chaîne A) et l'autre d'une trentaine d'acides aminés (chaîne B).

Elle joue un rôle important dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines en favorisant l'absorption du glucose depuis le sang vers les cellules adipeuses, les cellules du foie et celles des muscles squelettiques (CLAVERIE *et al*, 2008 ; CHEVALLIER, 2009).

- **Les protéines contractiles et du mouvement** : Les protéines contractiles sont des protéines dont la déformation spatiale est responsable d'un mouvement de la cellule, parmi ces protéines les plus citées : la myosine, la tubuline, et la tubuline, etc. La structure de la myosine se présente sous forme de deux longues chaînes hydrophobes en hélice, enroulées l'une autour de l'autre. Ces chaînes fibreuses se prolongent par deux têtes globulaires, donnant un aspect de cannes de hockey (CLAVERIE *et al*, 2008).
- **Les protéines de transport** : Elles assurent le transfert des différentes molécules dans et en dehors des cellules, c'est l'exemple de la transferrine, de l'hémoglobine, de la myoglobine et du glutathion (LODISH *et al*, 2005).
- L'hémoglobine permet le transport de l'oxygène du dioxyde de carbone et du monoxyde de carbone tandis que le glutathion assure le transport des hydrogènes. Il passe facilement et de façon réversible de sa forme oxydée à sa forme réduite. Comme il assure également un autre rôle plus important dans le métabolisme du paracétamol par le foie. Sa carence mène à un métabolite hématotoxique (CLAVERIE *et al*, 2008).
- **Les protéines protectrices**: c'est l'exemple des anticorps ou immunoglobulines, du fibrinogène et de la thrombine.

Les anticorps sont des protéines complexes utilisés par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B ; appelées les plasmocytes. Ils constituent l'immunoglobuline principale du sang (CLAVERIE *et al*, 2008).

1.1.2.3. Les protéines alimentaires

Il ne s'agit pas d'un groupe unique mais d'un groupe composé de protéines de structure, et de protéines biologiquement actives. Il s'agit de protéines savoureuses, digestibles, non toxiques, économiquement utilisables. Elles permettent de satisfaire les besoins en acides aminés essentiels qui varient en fonction de l'âge et de l'état physiologique.

- **Les protéines végétales :** Les gluténines et les prolamines, sont des protéines riches en proline et en glutamine, elles représentent plus de 90% des protéines du blé. La présence d'une longue séquence de la glutamine est à l'origine de l'intolérance au gluten (CLAVERBE *et al*, 2008 ; CHEVALLIE, 2009).

Au cours de ces dernières années, plusieurs autres sources végétales ont été proposées comme matière première possible pour la production d'ingrédients protéiques, telles que le soja, le maïs, le pois, le lupin, le riz et le tournesol. Particulièrement, les protéines de pois constituent une bonne alternative aux protéines de soja (CHEVALLIER, 2009).

Parmi d'autres types de protéine, il existe :

- Les protéines de réserve telle que l'ovalbumine, la gliadine ou autre ;
- Les protéines toxiques pour l'homme (toxines botuliniques, staphylococciques) ou pour les microorganismes (bactériocines et antibiotiques) ;
- Les protéines anti-nutritionnelles comme l'inhibiteur trypsique du soja ;
- Les protéines allergènes : l'allergène qui est une substance, une particule, ou un corps organique (protéine) capable de provoquer une réaction allergique chez un sujet préalablement sensibilisé lorsqu'il est à son contact (CUQ, 2006).

1.1.3. Les modification chimiques des protéines

Les modifications chimiques sont des modifications qui interviennent soit sur les groupes fonctionnels de la chaîne latérale des protéines, soit aux extrémités amino- et carboxy-terminales (VOET D et VOET J.G, 2016).

Toutes les protéines, subissent des modifications chimiques, soit après leur biosynthèse et là c'est la modification post traductionnelle (PTM) qui touche généralement les protéines cellulaires ou au cours des procédés de transformations et de traitements, pour les protéines alimentaires et non alimentaires.

Ces modifications peuvent changer l'activité, la durée de vie et la position cellulaire de ces protéines et améliorer certaines propriétés fonctionnelles ou leur conférer d'autres (VIDAL *et al*, 2003 ; LODISH *et al*, 2005).

Plus de 150 types de modifications des chaînes latérales sont connues, touchant toutes les chaînes latérales exceptées celles des résidus Ala, Gly, Ile, Leu, Met et Val. Parmi elles, citant ; l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, la glycosylation, l'oxydation, la désamidation et la transamidation ainsi que d'autres qui sont résumées dans le tableau I.

Tableau I : Résumé de l'ensemble des modifications post-traductionnelles (VOET D et VOET J.G, 2016).

Modifications post-traductionnelles	Sites totaux	Protéines totales	Sites humaine	Protéines humaines
Phosphorylation	62,269	17,116	30,838	8,428
N-glycosylation	4,971	2,257	2,181	906
O-glycosylation	2,853	367	295	93
Acétylation	2,600	1,896	1,024	677
Amidation	2,163	1,339	44	30
Hydroxylation	1,301	251	211	29
Méthylation	911	407	430	143
Ubiquitination	516	353	266	196
Carboxylation	447	122	88	15

Toutes les modifications ont été extraites de Swiss-Prot et HPRD. Les sites de glycosylation ont également été extraits d'O-GlycBase et PDB. Les sites de phosphorylation ont en outre été extraits de PDB, phospho ELM, Phospho Site et phospho POINT.

1.1.3.1. La phosphorylation

L'exemple le plus couramment observé est la phosphorylation des protéines, qui peut avoir lieu sur les résidus sérine, thréonine et tyrosine. Ces derniers portent tous une fonction hydroxyle susceptible d'être estérifiée par un acide phosphorique, apporté par une molécule d'ATP dont le phosphate est transféré sur un acide aminé porteur d'une fonction hydroxyle.

La phosphorylation des protéines représente un mécanisme de régulation qui contrôle pratiquement tous les aspects de la vie cellulaire. Cette réaction covalente (Figure 1), assurée par des protéines kinases, induit des changements conformationnels qui peuvent affecter la fonction d'une protéine de diverses manières: en stimulant ou en supprimant son activité, en contrôlant sa localisation intracellulaire ou sa destruction, ou encore en lui permettant d'interagir avec d'autres protéines.

La simplicité de cette modification post-traductionnelle, et sa réversibilité grâce à l'action de la protéine phosphatase, expliquent probablement pourquoi elle a été adoptée avec succès pour régler la plupart des fonctions cellulaires (SCHÖNICHEN *et al*, 2013).

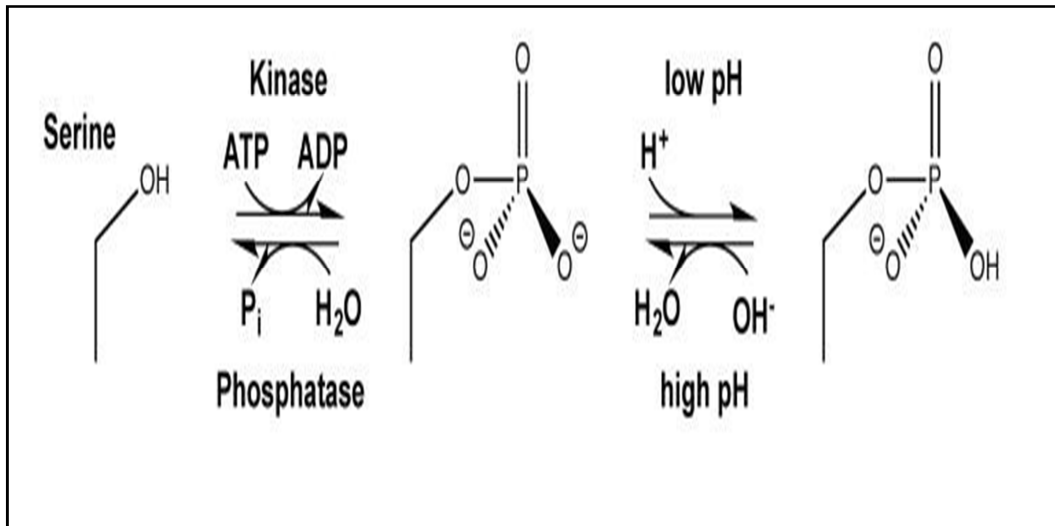


Figure 1 : Exemple de la phosphorylation de la serine ; addition d'une charge négative à des conditions faiblement basiques (SCHÔNICHEN *et al*, 2013).

Par exemple, chez *Bacillus subtilis*, l'arginine de certaines protéines est phosphorylée (formation d'une N(ω)-phospho-L-Arg) par la McsB-kinase. Cette modification de résidu Arg indique que la protéine est destinée à la dégradation par le complexe ClpCP (constitué de la protéase ClpP et de la protéine "unfoldase" ClpC - complexe caractéristique des bactéries Gram +) (TRENTINI *et al*, 2016).

Selon HUTTERER *et al* (2017) la phosphorylation des résidus serine et thréonine par la protéine kinase 1A (DYRK1A) semble être un régulateur clé dans la réplication du génome viral de cytomégalovirus (HCMV). Ils ont conclu que la réplication de HCMV est bloquée par l'inhibition de DYRK1A.

1.1.3.2. L'acétylation ou la méthylation

L'acétylation ou la méthylation des protéines a lieu sur les résidus lysine et arginine qui consiste à l'addition d'un groupement acétyle ou méthyle. Ces modifications post-traductionnelles touchent les propriétés physico-chimiques de la chaîne latérale d'une manière très significative ; par modification de la charge de la chaîne latérale de la lysine.

Cette dernière possède, en effet, un groupement NH_2 qui est constitutivement chargé positivement à pH physiologique. Si cette fonction amine est acétylée avec formation d'un groupement $NH-CO-CH_3$, la chaîne latérale de la lysine ne peut plus porter de charge.

Ce mécanisme cité pour la modification de la lysine est fondamental dans la régulation de l'interaction des histones avec l'ADN ; l'acétylation des histones au niveau de la chaîne

latérale de la lysine constitue un mécanisme central de régulation de la compaction de l'ADN sur les histones : quand la chaîne latérale n'est pas acétylée, sa charge positive renforce l'interaction de la protéine avec les groupements phosphodiester négativement chargés de l'ADN. S'il faut réduire l'interaction intime entre histone et ADN, les histones sont alors neutralisées par acétylation (RUSCONI, 2011).

D'après BLANC et RICHARD (2017) la méthylation de l'arginine par la protéine arginine méthyltransférase (PRMT) est essentielle pour une régénération correcte des muscles squelettiques *in vitro*. Cependant, les mécanismes déclenchant l'événement de méthylation, ainsi que la façon dont les substrats méthylés régulent la fonction des cellules souches musculaires et la décision sur le devenir restent à déterminer.

1.1.3.3. La glycosylation

La glycosylation est une modification chimique stable qui consiste à l'ajout d'un glucide sur les groupements hydroxyles de la sérine et de la thréonine ou à l'amide de l'asparagine.

De nombreuses protéines sécrétées ainsi que des protéines membranaires contiennent des résidus glycosylés. La glycosylation a lieu généralement au niveau du réticulum endoplasmique (RE), puis la modification de la chaîne oligosaccharidique, a lieu soit dans le RE ou dans le Golgi. Les chaînes d'oses sont liées aux protéines par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques selon leur site d'ancrage. Les chaînes liées par des liaisons O-glycosidiques (sérine/thréonine) sont plus courtes (1 à 3 résidus d'osés) et plus variables que celles liées par des liaisons N-glycosidiques (asparagine) qui peuvent former des arborescences (LODISH *et al*, 2005).

Selon les travaux d'ISSAD et PAGESY (2014) un autre type de glycosylation, l'O-Acétyl-glucosaminylation (O-GlcNAcylation), qui correspond à l'addition de N-acétyl-glucosamine sur le groupement hydroxyle des acides aminés ; sérine et thréonine. Contrairement aux glycosylations complexes, qui se font dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, la O-GlcNAcylation concerne essentiellement les protéines cytosoliques et nucléaires et elle est considérée comme étant une modification dynamique et réversible qui contrôle l'activité des protéines, leur localisations intracellulaires et les interactions entre protéines. Cette modification est assurée par deux enzymes ; O-linked N

acetylglucosaminyltransferase (l'OGT) et la N-acétyl- β -D glucosaminidase (O-GlcNAcase ou OGA) et elle dépend étroitement de la disponibilité en glucose.

L'O-GlcNAcylation pourrait jouer un rôle dans certaines maladies neurodégénératives. Alors que le gène codant pour l'OGT est un candidat pour la dystonie-parkinsonisme liée à l'X, le gène codant pour l'OGA est proche d'une région candidate pour la maladie d'Alzheimer. Des altérations de l'O-GlcNAcylation semblent en effet contribuer à la toxicité des protéines impliquées dans la maladie d'Alzheimer. Une diminution d'O-GlcNAcylation de la protéine Tau a été observée dans le cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Il a été suggéré que cette diminution d'O-GlcNAcylation, probablement due à une réduction de l'utilisation de glucose par le cerveau vieillissant, favorise l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau, la déstabilisation des microtubules et les altérations neuronales (LEFEBVRE *et al*, 2005).

1.1.3.4. L'oxydation

L'oxydation correspond à une attaque de la protéine par les espèces réactives d'oxygène (ERO) et les espèces réactives d'azote (ERN), qui peut avoir lieu sur plusieurs sites d'attaques comme par exemple, son squelette constitué d'enchaînement de liaisons peptidiques ou les chaînes latérales de ses acides aminés. Cette modification peut entraîner une hydrophilie accrue et une fragmentation de la chaîne latérale, l'agrégation via une liaison croisée covalente ou des interactions hydrophobes, un déploiement des protéines et une conformation modifiée, des interactions altérées avec des partenaires biologiques et un renouvellement modifié (DAVIES, 2016).

Parmi les acides aminés les plus touchés par l'oxydation ; la cystéine et la méthionine, tous les deux portent un atome de soufre ce qui fait d'eux un site majeur de l'oxydation qui génère la formation de pont disulfure qui rend les protéines plus sensibles aux attaques radicalaires. C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et les protéines de transport qui, après oxydation, deviennent inactives et beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (GUEYE, 2007 ; SJÖBERG, 2013).

L'oxydation peut être un mécanisme important de régulation pour de nombreuses protéines, par exemple les résidus réactifs de cystéine qui sont des composants critiques dans la signalisation redox. Une forme particulièrement oxydée de cystéine, l'acide sulfénique (Cys-SOH), qui a un rôle important en tant que capteur de stress oxydatif et nitrosant dans les enzymes et les régulateurs transcriptionnels (DEFELIPE *et al*, 2015).

1.1.3.5. La désamidation

La désamidation est l'une des modifications post traductionnelles les plus importantes, cette modification touche les résidus asparaginylyle et glutaminyle. Typiquement, l'asparagine est convertie en acide aspartique ou en acide iso-aspartique. La glutamine est convertie en acide glutamique ou en acide pyroglutamique (5-oxoproline).

La désamidation a été utilisée pour améliorer la solubilité et les propriétés fonctionnelles des protéines, en convertissant les groupes amides des deux acides aminés cités en résidus acides (groupes carboxyles et hydroxyles) par libération d'ammoniac. La conversion de groupe amide en groupe carboxyle conduit à une diminution du point isoélectrique (pI) de la protéine due à l'augmentation du nombre des groupes carboxyles chargés négativement. Ainsi, les protéines désamidées seront plus solubles dans des conditions faiblement acides (SERRA *et al*, 2016).

Il existe deux types de désamidation ; la désamidation enzymatique et la désamidation non enzymatique.

1.2. Désamidation enzymatique des protéines

De nombreuses recherches ont été menées sur la désamidation de différentes protéines par des acides, des bases et des enzymes. Les méthodes enzymatiques, en particulier, ont été souhaitées car elles utilisent des conditions réactionnelles douces (des températures entre 30 - 40°C) et un pH neutre, elles possèdent une spécificité élevée, malgré quelques réactions secondaires inévitables (MIWA *et al*, 2013).

La désamidation enzymatique pourrait être une alternative viable à la désamidation chimique, car les enzymes sont spécifiques au substrat, c'est-à-dire qu'aucune de ces enzymes n'hydrolysent les liaisons peptidiques.

Cette modification enzymatique a lieu sur les résidus glutaminyle (Gln) et elle a été caractérisée dans certaines protéines alimentaires.

Alors que la désamidation enzymatique de Gln est largement observée et a été impliquée dans plusieurs processus ordinaires et pathologiques, il n'existe aucun exemple connu d'une enzyme naturelle qui désamide le résidu Asparaginylyle dans un peptide ou une protéine (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

1.2.1. Désamidation enzymatique du résidu glutamyle

La désamidation enzymatique du résidu Gln a été décrite en 1959 par WAELSCH *et al.*, (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004). Cette réaction consiste à la transformation des résidus Gln en acide glutamique (Glu) (Figure 2) avec libération d'ammoniac. Elle est significativement impliquée dans l'amélioration des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles de certaines protéines alimentaires (les protéines du soja, les protéines du maïs, les protéines du blé...etc.) (SERRA *et al.*, 2016).

La transglutaminase (TG), la protéine glutaminase (PG) et la peptidoglutaminase sont des enzymes qui catalysent cette réaction de désamidation. Bien que le mécanisme d'action de ces enzymes soit identique, ils présentent une spécificité différente vis-à-vis des substrats (JOYCE, 2015).

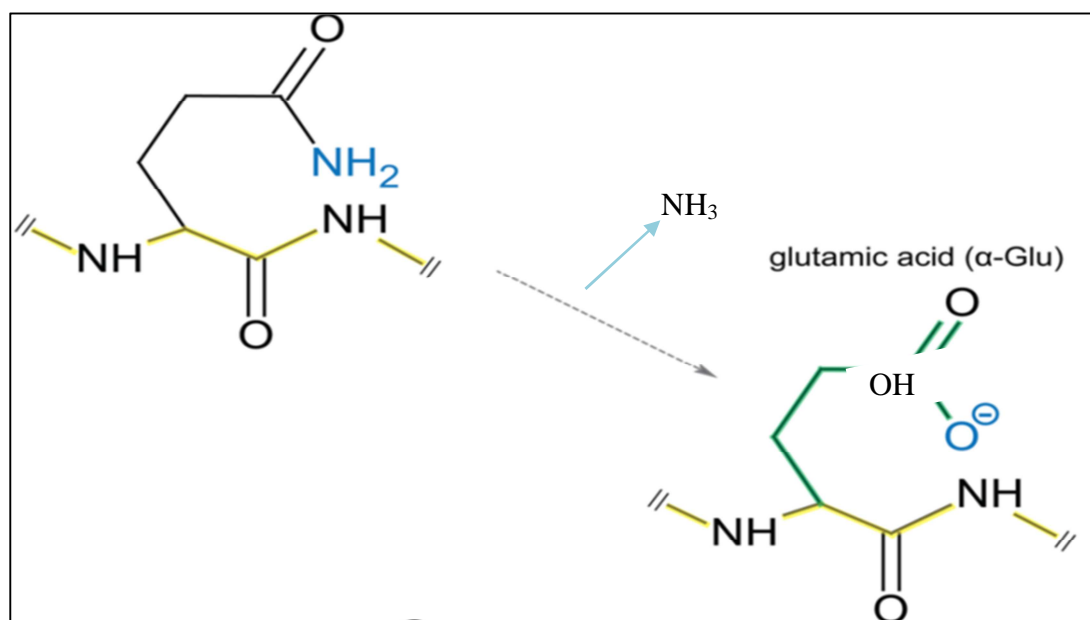


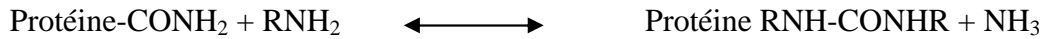
Figure 2: La désamidation enzymatique de résidu glutamine en acide glutamique avec libération d'ammonium (SERRA *et al.*, 2016).

1.2.1.1. Mécanismes d'action des désamidases

1.2.1.1.1. Les Transglutaminases

En 1950, Borsook *et al.*, ont découvert une transamidase du foie de cochon d'inde avec une activité enzymatique régulée par des niveaux intracellulaires de Ca^{++} et de GTP *in vivo* (NARKYUN, 2013).

La transglutaminase tissulaire, nommée TG2 (EC 2.3.2.13), catalyse l'incorporation d'amine primaire dans des substrats protéiques par une réaction de remplacement pour produire une protéine modifiée et de l'ammoniac (HETTIARACHCHY *et al*, 2012).



Cette enzyme est spécifique à Gln lié au polypeptide, elle est largement répandue chez les mammifères, mais elle a été également identifiée dans des formes de vie inférieures y compris les archées, les bactéries, les plantes, les vers et les insectes (HLTOMI *et al*, 2015).

La TG2 catalyse la réaction de transfert d'acyle dans laquelle le groupe γ -carboxamide du résidu Gln agit comme donneur d'acyle qui formera une liaison avec des groupes amino primaires (libre ou lié au polypeptide) de petit poids moléculaire, par exemple le groupe ϵ -amine des résidus lysine, qui agit comme un accepteur d'acyle. La réaction forme des γ -amides monosubstitués d'acide glutamique.

Si aucune fonction aminé primaire n'est présente, ou si elle est présent mais bloquée et dans des conditions légèrement acides, l'eau peut agir comme un accepteur d'acyle et une désamidation se produit avec la libération d'ammoniac pour donner de l'acide glutamique lié aux peptides (BHATNAGAR et CLEVELAND, 1992 ; NARKYUN, 2013).

Lorsque la réaction de désamidation est méditée par TG et que des résidus lysine sont disponibles, la désamidation enzymatique des résidus Gln est suivie d'une transamidation qui nécessite la présence de Ca^{++} pour lier de manière covalente les amines primaires à un résidu de glutamine de la protéine. Cette réaction conduit à la formation d'une liaison isopeptide N^ϵ - (γ -glutamyl) lysine (Figure 3) (ECKERT *et al*, 2014 ; SERRA *et al*, 2016).

TG2 joue un rôle principale dans la maladie coeliaque : en effet cette enzyme est capable de désamider les peptides de gliadine dérivés du gluten, ce qui augmente leur affinités de liaison avec les molécules de DQ2 et DQ8 spécifiques de l'antigène du leucocyte humain (HLA) et de la maladie coeliaque et qui sont exprimées sur différents types de cellules présentatrices d'antigène (APC), ce qui permet de lancer une forte réponse immunitaire.

Le blocage de l'activité enzymatique du TG2 a donc été suggéré comme une approche pharmacologique nouvelle et appropriée pour traiter la maladie cœliaque (RAUHAVIRTA *et al*, 2016).

Une découverte inattendue a permis de progresser à cet égard, il s'agit de la présence d'un pont disulfure allostérique qui maintient la TG2 extracellulaire dans un état catalytiquement inactif dans l'intestin (KHOSLA, 2017).

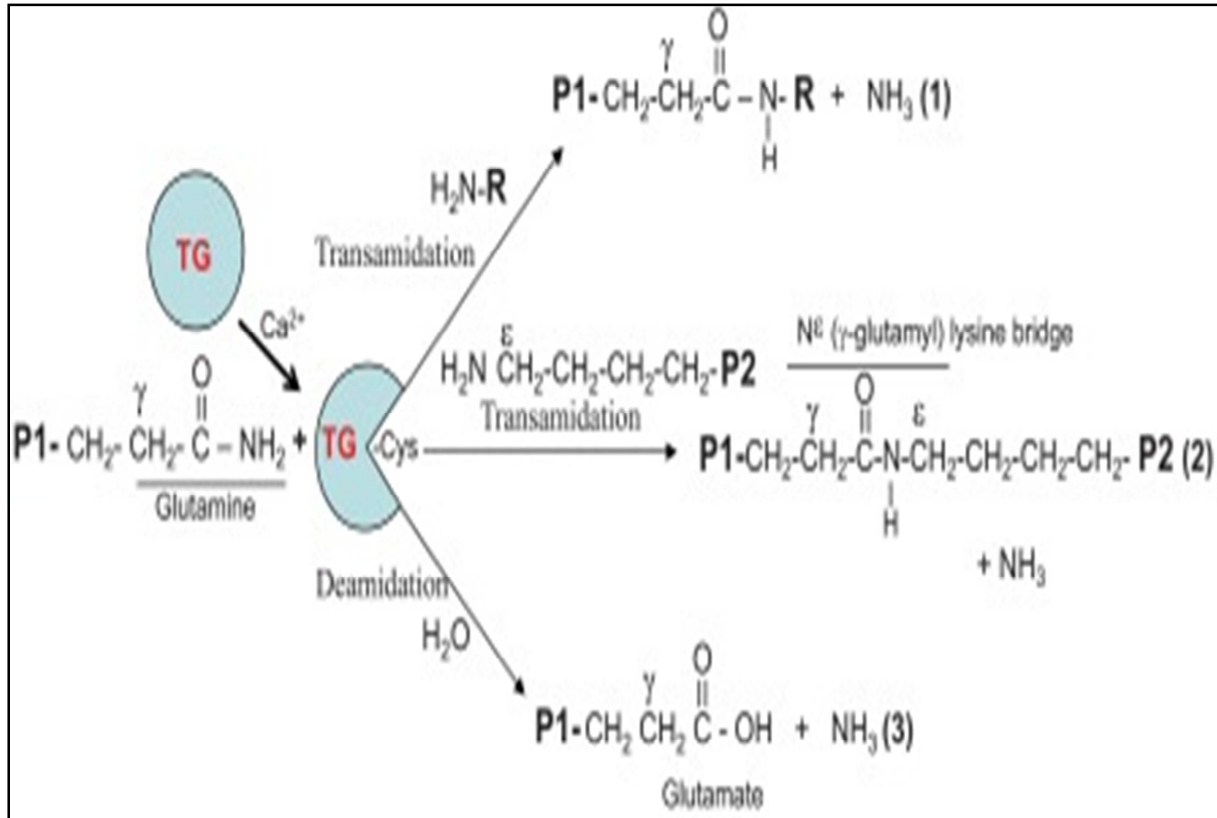


Figure 3 : Réactions enzymatiques catalysées par les transglutaminases (ECKERT *et al*, 2014).

Réactions 1 et 2 c'est la transamidation et 3 c'est la réaction désamidation là où l'eau est utilisée comme accepteur d'acyle.

1.2.1.1.2. Les peptidoglutaminases

KIKUCHI *et al*, (1971) ont découvert la peptidoglutaminase de *Bacillus circulans*, enzyme qui fait partie des L-glutamine amidohydrolases (EC 3.5.1.2). Cette enzyme n'est pas active sur des peptides de poids moléculaire élevé, c'est-à-dire les protéines telles que les caséines et les protéines du lactosérum même après leur dénaturation mais elle est uniquement active contre les résidus de glutamyle dans des peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 5000.

Deux peptidoglutaminases qui catalysent cette réaction ont été trouvées; la peptidoglutaminase I (EC 3.5.1.43), qui désamide le groupe γ-carboxamide du résidu Gln C-terminal et la peptidoglutaminase II (EC 3.5.1.44), qui désamide le groupe γ-carboxamide des résidus de Gln N-terminaux et internes (NARKYUN, 2013).

HAMADA *et al*(1988) ont signalé de légères améliorations de la désamidation des protéines catalysées par cette enzyme à l'aide des protéines traitées à la chaleur et /ou alcalines, mais les degrés de désamidation étaient très faibles (0,8 à 3,0% pour les caséines) par rapport à ceux des préparations traitées par les combinaisons avec une protéolyse (environ 38%).

HAMADA et MARCHALL (1992) ont constaté qu'en plus de la protéolyse, le chauffage des solutions de protéine du soja, la désamidation par la peptidoglutaminase a amélioré les propriétés fonctionnelles des protéines de soja.

La solubilité de ces protéines a augmenté à pH 4-7 ainsi que dans des conditions alcalines. La désamidation a également augmenté l'activité émulsifiante, la stabilité de l'émulsion et le pouvoir moussant, mais n'a eu aucun effet apparent sur la stabilité de la mousse.

Les propriétés fonctionnelles améliorées des protéines de soja désamidées a amenés à envisager d'utiliser les peptidoglutaminases comme un réacteur enzymatique pour la désamidation continue des protéines alimentaires (HAMADA et MARCHALL, 1992).

1.2.1.1.3. Les protéines- glutaminases

La protéine-glutaminase (PG), (EC 3.5.1.44), isolée pour la première fois en 2001, dans le surnageant de culture de *Chryseobacterium proteolyticum* (YAMAGUCHI *et al*, 2001).

La PG désamide uniquement le groupe amide de la chaîne latérale de résidu Gln lié aux protéines pour libérer de l'ammoniac sans catalyser la glutamine libre et sans produire des changements indésirables dans la structure des protéines.

L'action de PG a été étudiée pour plusieurs protéines alimentaires telles que la protéine de soja, le gluten de blé, la zéine du maïs et les protéines du lait (les caséines et les protéines de lactosérum) (YONG *et al*, 2004 ; MIWA *et al*, 2013 ; NARKYUN, 2013).

MIWA *et al*(2013) ont montré que l'isolât de protéine de lactosérum (WPI) traité par PG n'était pas susceptible de se polymériser même après chauffage, ce qui est dû à une augmentation des répulsions électrostatiques entre les groupes acidescarboxyliques et à une diminution de la formation de liaison disulfure, ce qui entraîne une diminution de l'agrégation provoquée par la chaleur (Figure 4).

Les propriétés des gels WPI induits par la chaleur ont été modifiées par désamidation, ces gels traités par PG ont une texture môle et une capacité de rétention d'eau élevée même en présence de sel en quantité élevée.

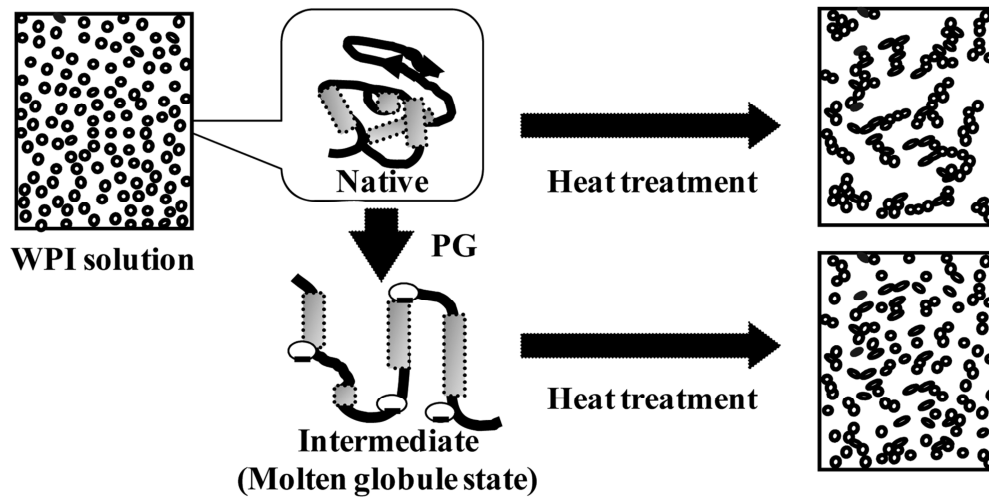


Figure 4 : Effet de la protéine glutaminase sur l'isolât de protéines de lactosérum (MIWA *et al*, 2013).

Selon SUPPAVORASATIT *et al* (2013) la désamidation partielle du lait de soja par PG, améliore la solubilité de la protéine dans des conditions acides (pH 5,0) et diminue le potentiel de liaison de la protéine à la vanilline et au maltol (des composés aromatiques) c'est-à-dire l'élimination des saveurs indésirables du lait de soja ; ces améliorations sont réalisables grâce à la conversion des résidus Gln en Glu ce qui provoque une augmentation du nombre de groupes carboxyles chargés négativement, qui provoque une diminution du pI de la protéine.

1.2.2. Impact de la désamidation enzymatique sur les protéines alimentaires.

Du point de vue chimique, la perte d'un groupe amide et le remplacer par un groupe hydroxyle augmentent les charges électrostatiques de la protéine, ce qui entraînera un déploiement partiel de protéine et une moindre agrégation, améliorant ainsi les propriétés fonctionnelles des protéines (JOYCE, 2015).

Comme les protéines de pouls et de graines, les protéines oléagineuses, protéines de canola et les protéines d'avoine sont principalement désamidées pour améliorer leurs fonctionnalités ; les propriétés de solubilité, moussage et émulsification.

Selon HETTIARACHCHY *et al* (2012) la protéine de soja désamidée améliore l'absorption du calcium de l'intestin grêle et favorise la formation des os lorsque le phytate, un inhibiteur d'absorption du calcium est éliminé.

La solubilité et les propriétés d'émulsification de la α -zéine de maïs qui est une protéine peut soluble mais avec des valeurs nutritionnelles élevé, ont été remarquablement améliorées après la désamidation en particulier à pH 7, par l'introduction d'une charge négative issu de la conversion du Gln en Glu. Cependant des études ont montré que la α -zéine désamidée sous forme de poudre présentait une propriété antioxydante inférieure par rapport à celle non désamidée. (YONG *et al*, 2004).

D'après YAO et ZHAO (2015) la désamidation des isolats de protéine de soja (SPI) diminue la glycation et la réticulation, et donne aux produits une digestibilité plus élevée, une hydratation moins élevée, une stabilité thermique plus faible et une structure secondaire plus ouverte.

Selon LIU *et al* (2016) le traitement des hydrolysats de gluten de blé (WGH) qui présente un goût amer, par la glutaminase pendant 180 min a permet l'amélioration du goût par la diminution de l'amertume et l'augmentation de goûtumami. En effet l'oligopeptide riche en acide glutamique et l'acide glutamique libre avait généralement non seulement les caractéristiques de l'umami, mais aussi l'activité de masqué le goût amer.

1.3. Désamination non enzymatique des protéines

1.3.1. Définition et conditions de réalisation

Les réactions de désamidation des chaînes latérales de l'asparagine et de la glutamine sont parmi les modifications covalentes non-enzymatiques les plus étudiées pour les protéines et les peptides. Des efforts considérables de recherche ont été étendus pour élucider les détails de la réaction de désamidation dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*, et un certain nombre d'examen bien écrits sont disponibles (MCNALLY et HASTEDT, 2007).

La désamidation des protéines est décrite comme la perte de la fonction amide d'un résidu Gln ou Asn accompagné d'une libération d'ammoniac et la transformation de ces deux acides aminés en acides glutamique et aspartique (SHLOMO, 1996).

Les résidus asparaginylyle et glutaminyle, dans les peptides et les protéines sont intrinsèquement instables dans des conditions physiologiques, avec des demi-vies allant de quelques heures à plus de 100 ans, elles se désamident non enzymatiquement en résidus L et D aspartyle et glutamyle ou en L et D iso-Asp et iso-Glu. L'Asn réagit généralement beaucoup plus rapidement que Gln, bien que les mécanismes de désamidation sont essentiellement les mêmes (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

La réaction de désamidation d'Asn, se produit non-enzymatiquement ou spontanément dans les peptides et les protéines, elle été largement étudiée dans de nombreux domaines des sciences chimiques et pharmaceutiques (NORIYOSHI *et al*, 2015).

1.3.2. Mécanisme de la désamidation non enzymatique

Le mécanisme de la désamidation non enzymatique consiste en la formation d'un cycle imide (L-succinimide), qui résulte de l'attaque nucléophile du doublet électronique d'un atome d'azote de la chaîne carbonée principale sur l'atome de carbone du groupement amide de la chaîne latérale du résidu Asn. La formation du succinimide, molécule intermédiaire cyclique à cinq atomes, implique la chaîne latérale et le groupement carboxyle du résidu Asp ou Asn et l'azote du groupement amide du résidu suivant (GEIGER et CLARKE, 1987 ; STEPHENSON et CLARKE, 1989). Le succinimide, ainsi formé, est un intermédiaire stable qui peut être observé dans une zone du pH variant de 4,0 à 4,5, mais qui se décompose aussi vite qu'il s'est formé pour des valeurs de pH plus élevés.

Ensuite le cycle imide formé est soumis à une hydrolyse, ce qui génère au sein de la chaîne peptidique la formation d'un résidu L-iso-Asp ou L-Asp (XIE et SCHOWEN, 1999). L'apparition d'un résidu iso-Asp introduit une liaison β -amide attaché sur le groupement β -carboxylique du résidu iso-Asp. Ce qui provoque un changement dans la structure des peptides et des protéines qui subissent une désamidation (Figure 5).

L'isoaspartate est un résidu d'acide aminé apparaissant dans certaines protéines suite à une réaction intramoléculaire entre un résidu Asn ou Asp et le résidu d'acide aminé suivant dans la séquence protéique (GEIGER et CLARKE, 1987).

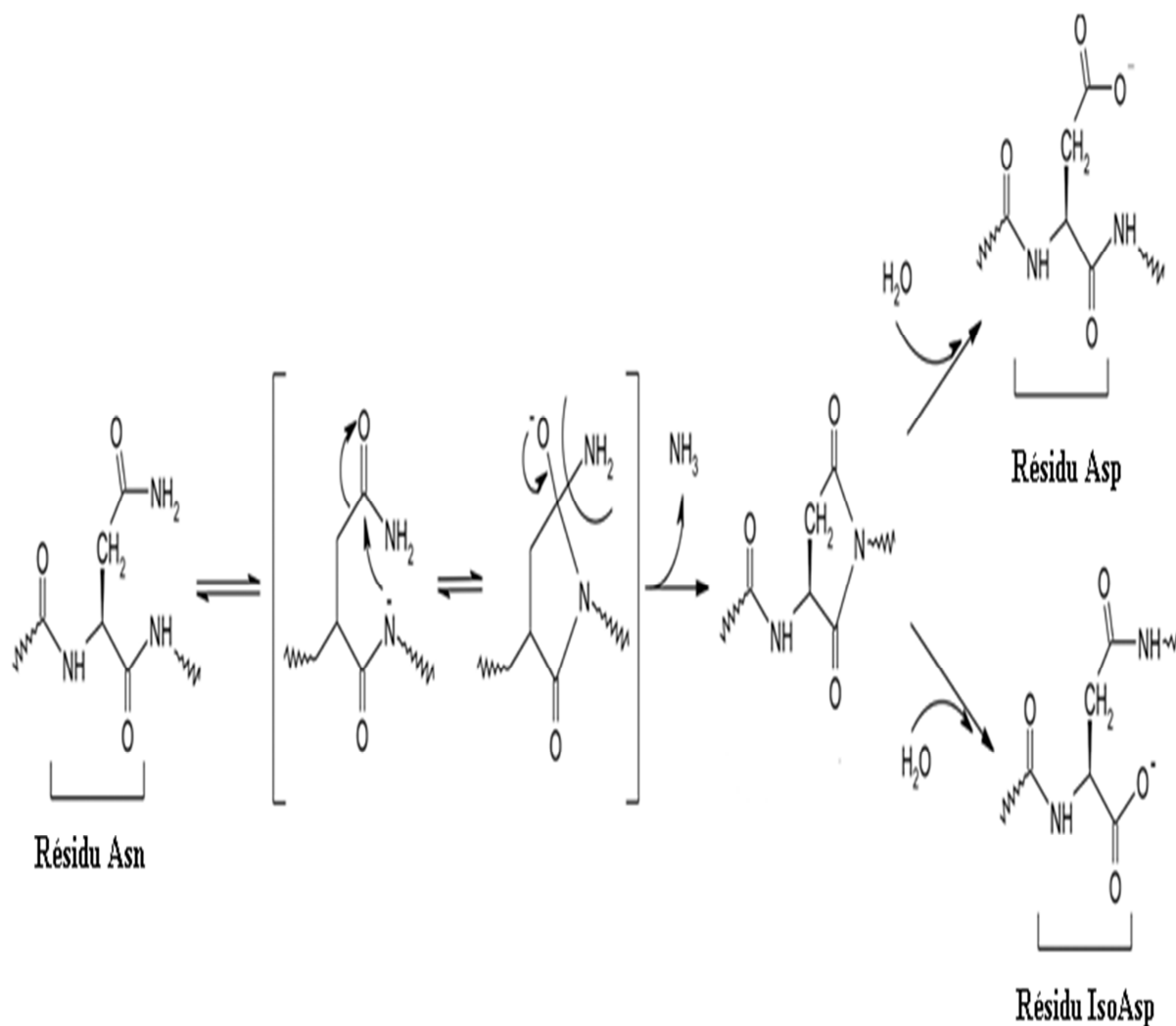


Figure 5: Mécanisme de la désamidation non enzymatique du résidu asparagine à pH>5 (NORIYOSHI *et al*, 2015).

1.3.3. Importance de la réaction de désamidation non enzymatique

Dans la nature, la désamidation des protéines joue un rôle important dans la régulation biologique, probablement comme une horloge biologique dans la détermination de la fonction et du catabolisme des protéines ou un signal pour la dégradation des enzymes et des hormones. L'hypothèse selon laquelle les désamidations d'Asn et Gln peuvent servir d'horloge biomoléculaire ont initié une série d'études visant à déterminer les paramètres disponibles pour ces horloges dans des conditions solvables physiologiquement pertinentes (SHLOMO, 1996). Pour certaines protéines, il peut s'agir d'une horloge moléculaire pour faciliter le renouvellement rapide des composants fonctionnels biologiquement importants de la cellule (NARKHYUN, 2013).

Au cours du processus de vieillissement, la désamidation non enzymatique peut nuire à de nombreuses protéines. Et donc, il est possible que la désamidation spontanée puisse avoir une fonction biologique importante dans la pathogenèse de nombreux troubles humains impliqués dans des tissus vieillis (NARKHYUN, 2013).

La désamination des asparagines et l'isomérisation des acides aspartiques sont de bons exemples de modifications non enzymatiques qui affectent les fonctions des protéines, en formant des résidus L-isoaspartates anormaux. Effectivement, lors du vieillissement, la formation des résidus aspartates anormaux, tels que L-isoaspartates, est considérée comme une des principales sources de dommages aux protéines (ASWARD *et al*, 2000).

Dans la modification des protéines alimentaires, les scientifiques de l'alimentation commencent tout juste à reconnaître son potentiel comme alternative viable à l'hydrolyse des protéines (SHLOMO, 1996).

La désamidation non enzymatique des résidus asparaginyne peut se produire spontanément dans des conditions physiologiques. Cette modification peut modifier l'activité biologique des protéines ou des peptides et déclencher ainsi une réponse auto-immune.

D'autre part, la désamidation non enzymatique de l'Asn peut également affecter la reconnaissance immunitaire des protéines et des peptides. Par exemple, les lymphocytes T reconnaissent spécifiquement les peptides contenant des résidus Asn qui ont été soit transformés en succinimide (CHEN *et al*, 1996), soit sont désamidés pour former un résidu Asp ou iso-Asp (CIRRITO *et al*, 2001).

La désamidation non enzymatique est supposée être une voie importante pour la dégradation chimique des anticorps monoclonaux utilisés principalement comme traitements en oncologie et immunologie (PACE *et al*, 2013).

Plus récemment, selon NORIYOSHI *et al* (2015) il a rendu possible une telle compréhension quantitative approfondie de la dépendance structurelle de la désamidation que les vitesses de désamidation des résidus asparaginyne dans les protéines peuvent être prédites à partir de structures protéiques tridimensionnelles avec un degré élevé de fiabilité. Ceci, à son tour, a conduit à la découverte que les résidus amides servent d'horloges moléculaires dans de nombreux systèmes biologiques et la démonstration d'exemples supplémentaires.

En 1966, il a été prouvé que la désamidation se produit *in vivo* dans le cytochrome C. En 1970, il est émis l'hypothèse que la désamidation est une horloge moléculaire. Une condition nécessaire de cette hypothèse est que les taux de désamidation sont soumis à une modulation génétique au moyen de la structure des peptides et des protéines (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

1.3.4. Influence de divers facteurs sur la cinétique de désamidation

L'événement de la désamidation est très fréquent et survient spontanément à l'intérieur des cellules. Toutefois, des facteurs comme la température, le pH environnant, la structure et le temps de demi-vie de la protéine peuvent influencer ce processus (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004).

1.3.4.1. Effet du pH

Les résultats obtenus par l'étude du pH sur la dégradation des résidus Asn et Asp dans un intervalle du pH variant de 1 à 12, montrent que la désamidation spontanée dépend des valeurs du pH allant de 5 à 8. Au-delà de cet intervalle, la protéine est totalement dénaturée et ne peut résister à des valeurs de pH extrêmes. La désamidation des protéines et des peptides se produit à pH neutre ou proche de la neutralité mais elle est plus rapide à pH basique (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

En particulier, le pH semble exercer un contrôle majeur sur la désamidation non enzymatique des résidus asparaginyloxy dans les polypeptides. À pH alcalin et neutre, il est signalé que la désamidation des résidus d'asparagine implique la formation d'un cycle imide intramoléculaire intermédiaire. Dans des conditions acides, on a signalé que la réaction se fait par hydrolyse directe des résidus d'Asn dans des résidus Asp sans formation d'intermédiaire cyclique imide (SHLOMO, 1996). A pH physiologique, la désamidation entraîne l'introduction d'une charge négative au résidu désamidant et une certaine isomérisation (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2007).

1.3.4.2. Effet de la température

Le taux de désamidation des protéines montre également la dépendance à la température sous un pH neutre. Pour les réactions de désamidation seules, l'accélération de la fréquence associée à la température dans les protéines peut être due à une flexibilité accrue de la molécule, permettant une formation plus rapide de l'imide cyclique, ou peut se produire par catalyse des chaînes latérales amenées au voisinage du site de désamidation. La disponibilité

de l'eau semble être un déterminant important des effets associés à la température (MCNALLY et HASTEDT, 2007).

1.3.4.4. Effet de la structure de la protéine

Les taux de désamidation dépendent de la séquence primaire et de la conformation des protéines. Il a été démontré que la séquence d'acides aminés primaire, ainsi que la structure tridimensionnelle de la protéine, peuvent affecter le taux de désamidation. Cette modification introduit une charge négative dans la protéine qui peut changer la structure et la fonction de la protéine.

Des études antérieures ont également montré que la structure des acides aminés qui flottent Asn a un effet significatif sur le taux de désamidation. Un résidu Asn suivi d'un résidu Glycine (Gly) dans les protéines est particulièrement sensible à la désamidation, même si d'autres séquences telles que Asn-Ser, Asn-Asn et Asn-Ala ont été observées pour subir une désamidation dans les protéines (NARKHYUN, 2013).

Dans les études utilisant des modèles peptidiques, le résidu d'acide aminé sur le groupe carboxyle de l'Asn a montré une grande influence sur la vitesse de réaction, en particulier lorsque le résidu carboxyle adjacent de Asn est Gly (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004).

1.3.5. Système de réparation de la désamidation non enzymatique

Dans la plupart des organismes vivants, les protéines et les peptides peuvent être assujettis à diverses modifications post-traductionnelles spontanées dommageables lors du vieillissement normal. D'ailleurs, ces différentes modifications entraînent normalement un changement conformationnel qui peut provoquer une altération néfaste pour la fonction de la protéine (ROBINSON N.E et ROBINSON A.B, 2004).

La désamination des asparagines est un bon exemple de modifications non enzymatiques qui affectent les fonctions des protéines, en formant des résidus L-isoaspartates anormaux.

Effectivement, lors du vieillissement, la formation de ces résidus, est considérée comme une des principales sources de dommages aux protéines.

La L-isoaspartyl-méthyltransférase (PIMT) a été considérée comme une enzyme de réparation des protéines en raison de sa capacité à méditer la méthylation du groupe a-carbonyl des résidus iso-Asp (Figure 6). Cette modification permet la formation d'un

intermédiaire succinimide qui peut être hydrolysé spontanément, Asp et iso-Asp. Certaines études ont associé la présence d'un rapport *m vivo* iso-Asp / Asp inversé avec le mécanisme d'action de l'enzyme de réparation de la protéine PIMT (SERRA *et al*, 2016).

L'identification de nouveaux substrats PIMT dans le contexte de la pathologie est importante et particulièrement impérative dans l'étude du cerveau des mammifères; tissu où cette enzyme est plus clairement exprimée et impliquée dans la pathophysiologie de plusieurs maladies neurodégénératives associées au vieillissement (SERRA *et al*, 2016).

La PIMT est une enzyme ubiquitaire d'environ 24500 daltons qui a été identifiée chez plusieurs organismes comme les bactéries, les plantes, les champignons et les mammifères. Plusieurs études depuis sa découverte ont permis de caractériser cette protéine. En plus de se retrouver dans quatre des cinq règnes du monde vivant, la PIMT est également exprimée dans tous les tissus. Par contre, c'est dans le cerveau que son expression est la plus élevée, suivi des testicules et du cœur.

Le gène qui code pour la PIMT chez l'humain, composé de 8 exons séparés de 7 introns, est situé sur le chromosome 6, il existe majoritairement deux isoformes de la PIMT résultant de l'épissage alternatif d'un gène situé sur le chromosome 6. L'isoforme I a un pHi de 6,5 et une séquence Ct Arg-Trp-Lys tandis que l'isoforme II se distingue par un pHi de 5,5 avec une séquence Ct Arg-Asp-Glu-Leu (COURNOYER, 2008).

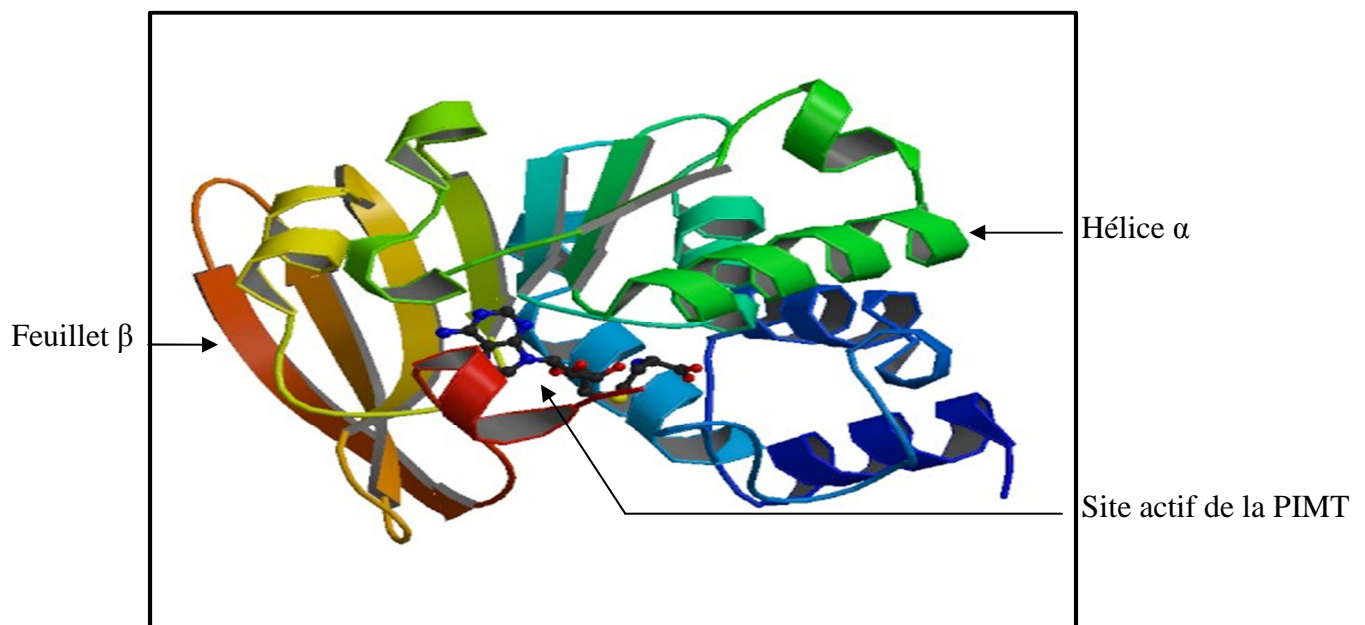


Figure 6: Vue d'ensemble de la structure cristalline de la L-isoaspartyl-méthyltransférase humaine (RYTTERSGAARD *et al*, 2002).



Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Le lait qui est un produit alimentaire important est considéré comme la principale source des nutriments pour les personnes de tout âge, connu pour ses valeurs nutritionnelles et sa teneur en protéine élevée surtout dans le cas du lait de vache. Afin de mieux caractérisé ce lait nous avons effectués certains analyses tels que les analyses physico-chimiques (dosage des protéines, des glucides et de la vitamine C) et des contrôles électrophorétiques (PAGE-SDS et PAGE-Native) et chromatographiques (de permeation) dans le but de séparer et de purifier les protéines du lait bovin.

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biochimie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie.

2.1. Matériel

2.1.1. Appareillages

- Spectrophotomètre UV-Visible
- Unité de chromatographie liquide basse pression ;
- Unité d'électrophorèse ;
- Lyophilisateur à plateaux (Telstar LoyQuest) ;
- Autres matériels d'analyses usuelles (bain-marie, vortex, centrifugeuse, agitateur, balance de précision, pH mètre...etc).

2.1.2. Le petit matériel

Un certain nombre de petit matériel a été utilisé au cours de cette étude comme les micropipettes, différents types de verrerie (bicher, pipettes gradué, fiole, éprouvette...etc).

2.1.3. Matériel biologique

2.1.3.1. Echantillons du lait

Nous avons utilisés trois échantillons du lait de vache ;

- Le lait de vache cru ;
- Le lait de vache reconstitué ;
- Le lait de vache à Ultra Haute Température (UHT).

2.1.3.2. Enzymes et protéines étalon

Nous avons utilisés pour l'hydrolyse des protéines du lait :

- la trypsine (EC.3.4.21.4), extraite de pancréas bovin ;

Pour les protéines étalon d'électrophorèse PAGE-SDS et PAGE-Native, nous avons utilisés un kit préparé au niveau de laboratoire de Biochimie qui comprend 5 protéines de PM connu: l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline, le chymotrypsinogène A, l'ovalbumine, l'albumine sérique bovine (BSA).

2.1.4. Produits et réactifs

- Colorants et réactifs : acrylamide, bleu de bromophénol, dodécyl sulfate de sodium, 2-mercaptoéthanol, bisacrylamide, persulfate d'ammonium, réactif de Folin-Ciocalteu, TEMED....
- Support chromatographique : Sephacryl S100.

2.2. Méthodes

2.2.1. Méthodes chimiques

L'analyse physico-chimique des échantillons a porté sur la mesure de certains paramètres (la teneur en protéine, en lactose et la vitamine C). Toutes les mesures sont réalisées sur les trois laits en deux essais. La moyenne et les écarts type sont calculés.

2.2.1.1. Dosage des protéines

La détermination de la concentration en protéines des échantillons se fait par un dosage colorimétrique selon la méthode de Lowry *et al*, (1951) (Annexe 1). Il s'agit d'une méthode de dosage colorimétrique des protéines basée sur la méthode du biuret. En effet, la protéine réagit tout d'abord avec un réactif cuivrique alcalin (la méthode du biuret) puis un second réactif, dit réactif de Folin-Ciocalteu (tungsto-phospho-molybdique), est ajouté. Il est composé d'un mélange de tungstate de sodium et de molybdate de sodium en solution dans de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique. Ce réactif permet la réduction des acides aminés aromatiques ; tyrosine et tryptophane conduisant à la formation d'un complexe coloré bleu foncé.

Les intensités de la coloration sont proportionnelles à la concentration dont on mesurera l'absorbance par spectrophotométrie à 750 nm. La détermination de la concentration des échantillons (deux essais ont été réalisés) se fait par une courbe d'étalonnage on utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard (Figure 7).

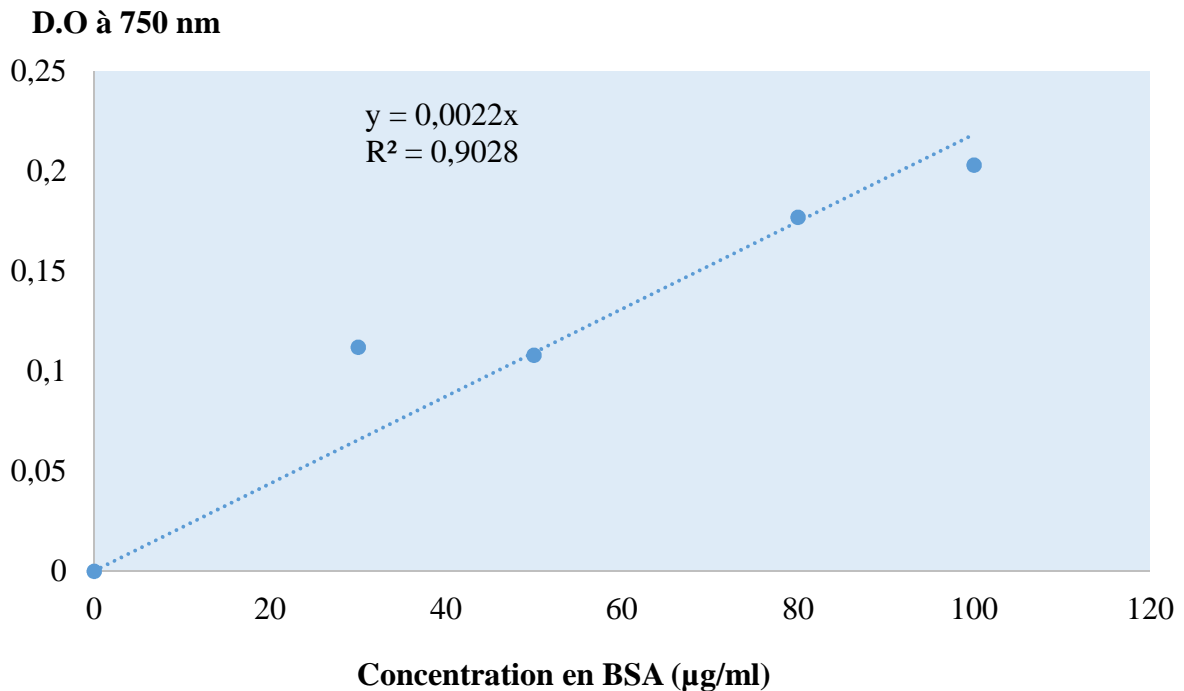


Figure 7: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al*, (1951).

L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine étalon ; R= coefficient de corrélation.

2.2.1.2. Dosage des glucides

La détermination de la concentration en glucides des échantillons se fait par un dosage colorimétrique par l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS), aussi appelé acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque (Annexe 2).

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence des sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. Il peut être dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 530\text{nm}$). La détermination de la concentration des échantillons se fait par une courbe d'étalonnage qu'on a tracé $\text{DO} = f(\text{concentration en lactose})$ (Figure 8).

L'intensité de la coloration rouge est proportionnelle à la concentration de lactose si on opère dans des conditions physico-chimiques constantes.

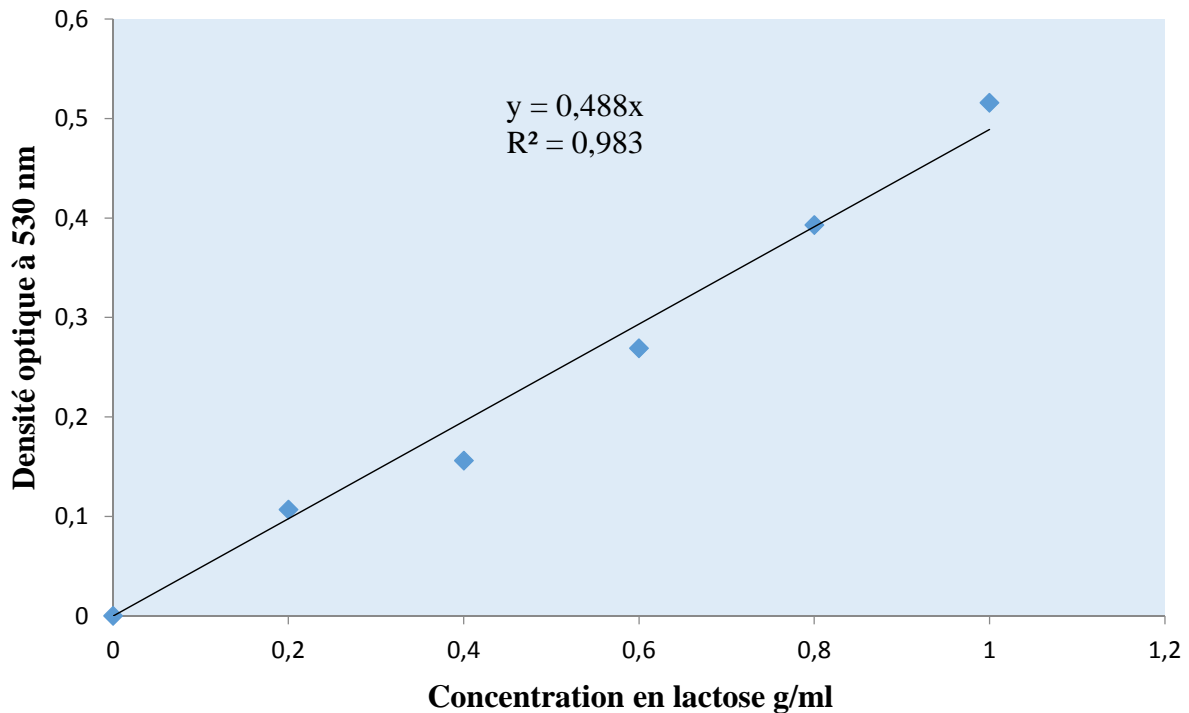


Figure 8 : Courbe étalon du dosage du lactose par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).

2.2.1.3. Dosage de la vitamine C dans le lait

Le dosage de la vitamine C est basé sur la réduction stœchiométrique par l'acide ascorbique d'un colorant : le 2,6 dichlorophénol-indophénol (2,6 DCPIP), qui est coloré en bleu sous sa forme oxydée et incolore sous sa forme réduite. Le DCPIP peut être réduit par d'autres substances mais la spécificité de la réaction est améliorée en opérant en milieu acide, les substances qui peuvent interférer réagissent alors lentement.

Les conditions utilisées sont celles recommandées par AUDIGIE *et al*, (1978), (annexe3).

La solution du 2,6 DCPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue.

2-2-2. Préparation des échantillons

Les grands groupes des protéines bovines sont séparées à partir du lait en suivant les étapes illustrées dans la figure (9).

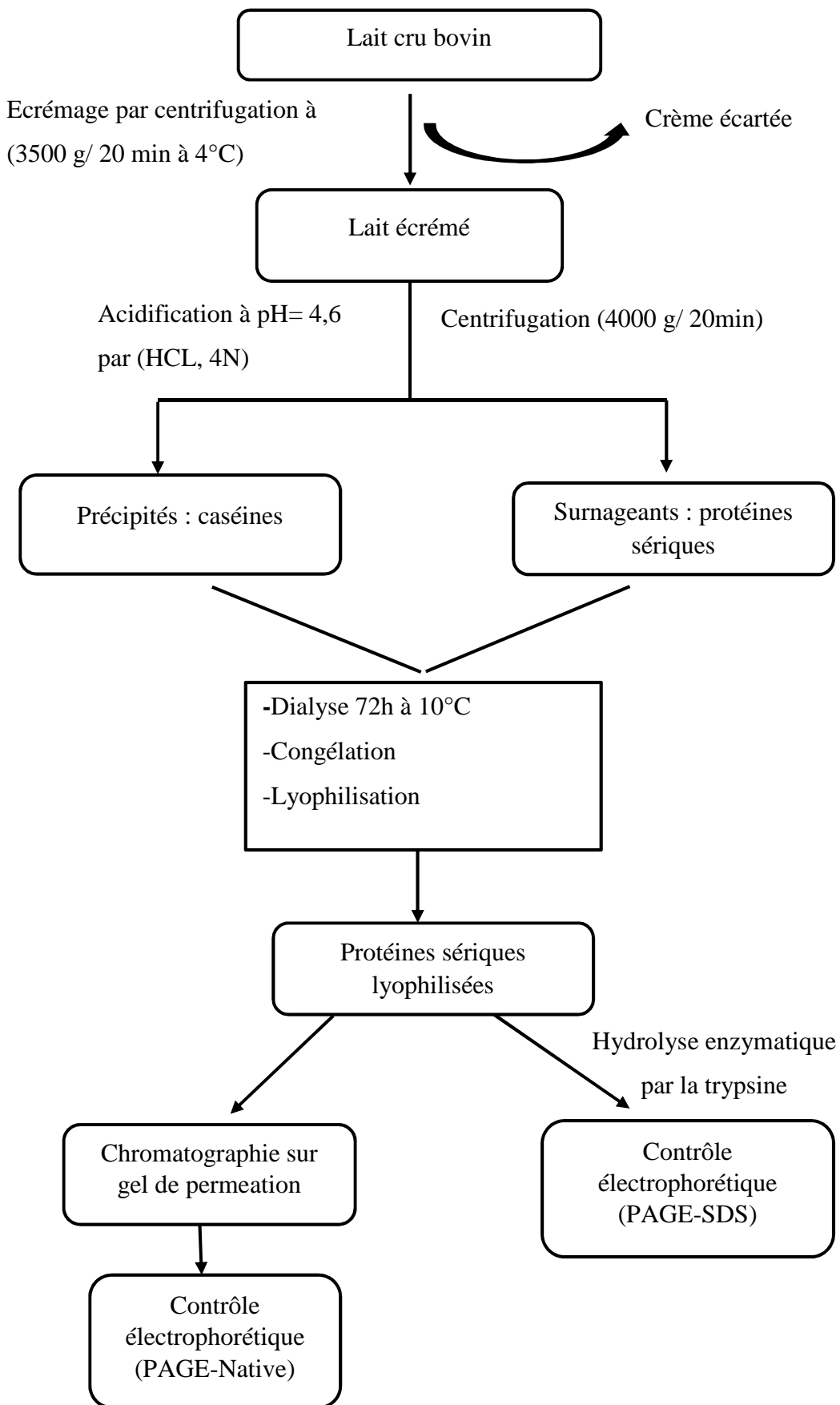


Figure 9 : Etapes de séparation des protéines du lait bovin.

2.2.2.1. Ecrémage

L'écémage du lait entier est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 20 min. la crème qui apparaît en surface est écartée, alors que le lait écrémé est filtré afin d'éliminer totalement la matière grasse.

2.2.2.2. Séparation par précipitation acide des protéines bovines

Le principe de cette séparation repose sur l'acidification du lait écrémé jusqu'au pH 4,6, qui permet la précipitation des caséines. Cette opération est réalisable par addition de HCL 4N, en suite le lait est centrifuger 4000 g pendant 20 min.

Le culot récupéré contient les caséines et le surnagent contient les protéines sériques.

Ensuite nous avons remplis des boudins de dialyse avec les protéines sériques, et nous avons effectués une dialyse pendant 72 h à 10°C avec renouvellement constant d'eau de dialyse. Les protéines récupérer après dialyse sont congeler pendant une nuit et lyophiliser pendant 24 h.

2.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques par la trypsine

La trypsine (EC.3.4.21.4), qui est une enzyme extraite de pancréas bovin, elle possède une structure (environ 230 acides aminés) et un poids moléculaire environ 24 kDa. Son pH optimal se situe entre 7 et 8. A pH plus élevé, elle devient sensible à sa propre action autolytique, et à pH plus bas que 6, elle perd son activité. Cette enzyme pancréatique est activée à température proche du corps humain, soit entre 37 et 40°C. La trypsine catalyse l'hydrolyse de substrat peptidyl amide où du côté carbonyle des résidus arginine ou lysine qui sont des acides aminés basiques.

Dans ce travail nous avons utilisé la trypsine pour l'hydrolyse des protéines sériques du lait de vache (Annexe 4). Les différentes étapes de cette hydrolyse sont schématisées dans la figure 10.

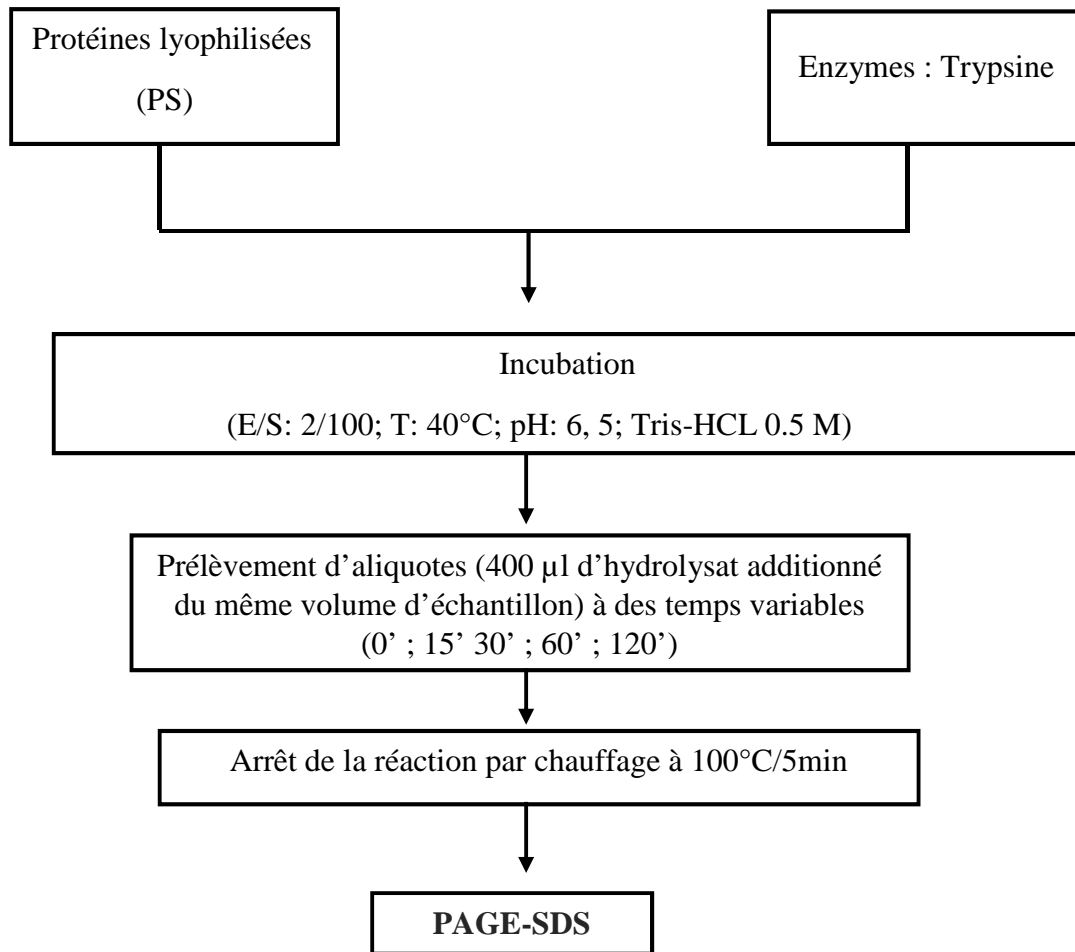


Figure 10 : Etapes de l'hydrolyse enzymatique par la trypsine des protéines du lait.

2.2.4. Chromatographie de perméation sur gel de Sephacryl S100

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

Cette technique a été utilisée efficacement pour la séparation des protéines sériques du lait bovin (YOSHIDA, 1990), humain (KUNZ et LONNERDAL, 1999) et camelin (LEVIEUX *et al*, 2006).

Dans le présent travail, la phase stationnaire est constituée du gel sephacry S100 qui est préparé par réticulation covalente d'un alkyle de dextrane avec du N, N' méthylène bisacrylamide. Ce gel ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2.5.10^5$ Da.

Le gel de sephacry (environ 5g) prêt à l'emploi, est mis en contact du tampon de départ ; chlorure de tris hydroxyméthyl aminométhane (Tris-HCL), 0.02 M, pH 8.4) pendant 30 min. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (20 × 1cm) en une seule fois.

Après équilibrage de la colonne par l'éluant et stabilisation du débit à 0.46 ml/min, le volume mort de la colonne a été déterminé (V_0) par injection de bleu dextrane à la concentration de 1mg/ml.

Les protéines sériques lyophilisées (50 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon Tris-HCL (0.02 M, pH 8.4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 2 ml sont recueillies et caractérisées (électrophorèse PAGE-Native).

2.2.5. Méthode électrophorétique

2.2.5.1. Principe général

Les protéines qui sont des macromolécules amphotères, peuvent se déplacer dans un champ électrique en fonction de leur charge nette, de leur poids moléculaire et des conditions du milieu. Ce déplacement différentiel est mis à profit en électrophorèse pour pouvoir les séparer et les identifier, car les niveaux de migration atteints constituent une caractéristique intrinsèque de chaque entité protéique.

Les séparations électrophorétiques ont été réalisées sur des gels de polyacrylamide qui est le produit de polymérisation des monomères d'acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et d'un agent de pontage habituellement le N, N'méthylène bis-acrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), en présence de persulfate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$) et N,N,N', N'tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED) comme catalyseurs de la réaction (Figure 11).

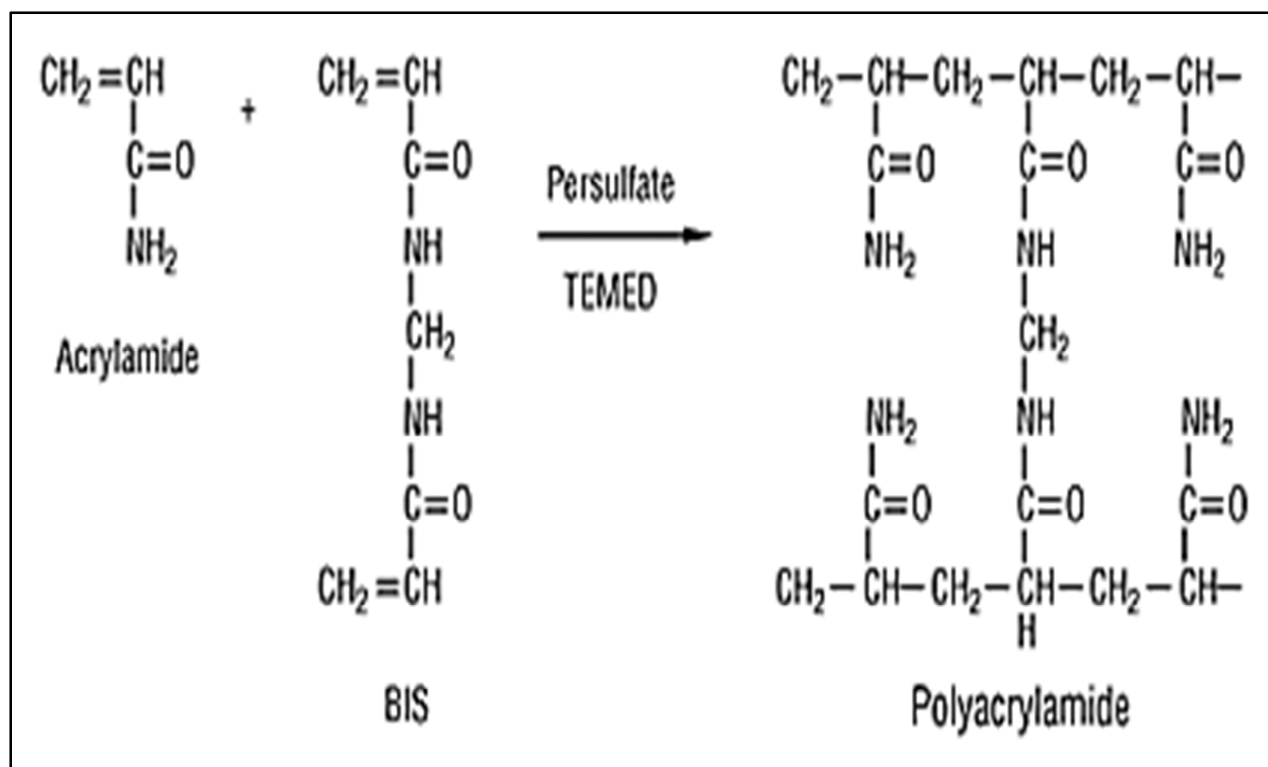


Figure 11 : Réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bis acrylamide.

Cette polymérisation conduit à la formation de nombreuses chaînes enroulées qui déterminent un ensemble de micro-canaux de pores dans lesquels les molécules protéiniques se déplacent sous l'effet de tamisage moléculaire. 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 de tampon (ml) ; T: pourcentage de la concentration total en (acrylamide + bis-acrylamide) ; C: pourcentage de la concentration en (bis-acrylamide) par rapport au total (acrylamide et bis-acrylamide).

2.2.5.2. Réalisation de l'électrophorèse

Après avoir coulé le gel délicatement entre deux plaques de verre, les échantillons préparés et solubilisés dans le tampon approprié sont déposés dans les puits à raison de 10 à 20 μ l.

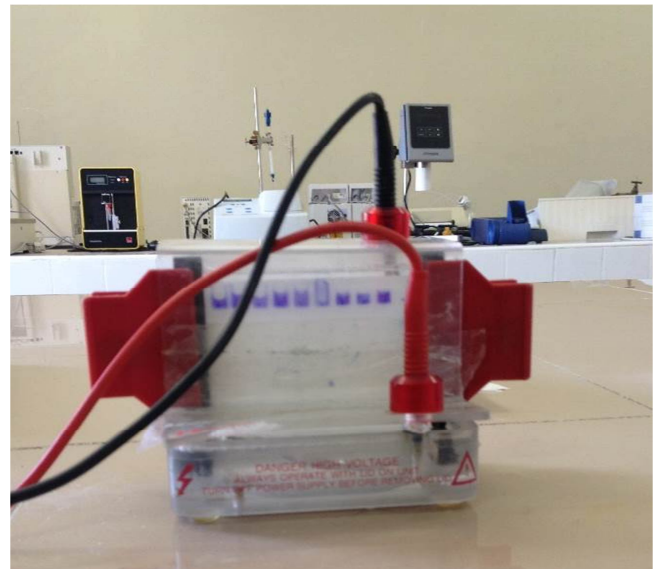
Le tampon d'échantillon contient le bleu de bromophénol pour suivre la progression de migration électrophorétique qui a lieu sous voltage et ampérage constant (20 mA, 250V).

2.2.5.3. Révélation des bandes de migration

A la fin de la migration, les protéines sont fixées dans l'acide trichloroacétique (TCA) 12 % (p/v) pendant 45 minutes puis colorées pendant 1 heure avec une solution de bleu de coomassie R250, 0.5 % (p/v). La décoloration du gel s'effectue, sous agitation douce pendant 1 à 2 jours dans des solutions de décoloration renouvelées plusieurs fois contenant le mélange : acide acétique, eau, méthanol.



A



B

Figure 12 : Photographie d'une unité d'électrophorèse.

A : Générateur du courant ; B : Cuve de migration

2.2.5.4. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-Native)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-Native) est une méthode particulièrement résolutive pour les protéines sériques du lait. Celles-ci migrent dans ce cas selon leur charge nette et leur poids moléculaire.

En nous basant sur la méthode de HILLER (1976) (Annexe 5), nous avons utilisés un gel de polyacrylamide à T=12% et C=2.7%. Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0.75 M, pH 8.9). Le tampon d'électrode est constitué de (TRIS, 5mM ; glycine, 77 mM ; pH 8.3).

Les échantillons protéiques ; les fractions des pics chromatographiques des protéines sériques sont préparés à raison de 2 mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel (1/10 V/V), de l'eau distillée (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V).

2.2.5.5. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide dans des conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS)

Les électrophorèses sont réalisées selon la méthode de LAEMMLI et FAVRE (1973) en conditions dissociantes et dénaturantes (Annexe 6).

Le dodécyle sulfate de sodium « SDS » ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_4, \text{Na}$), 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 dernières (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 est basé sur un système biphasique, comprenant deux types de 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 leurs poids moléculaire.

Pour cela, nous avons utilisés un gel de concentration (T= 4% et C= 2,7%) en tampon (TRIS-HCl ; pH 6,8) et un gel de séparation (T= 17 % et C= 2,7 %) en tampon (TRIS-HCl ; pH 8,8). Le tampon d'électrode est composé de (TRIS, glycine, SDS, eau distillée).



Résultats et discussion

3.1. La caractérisation des protéines du lait de vache

Tableau II : Résultats de la caractérisation physico-chimique des 3 échantillons du lait de vache.

Echantillons	Lait de vache	Lait reconstitué	Lait UHT
Teneur en protéines (g/l)	37,98 ±0.11	22,98 ± 0.01	20,91 ±0.01
Teneur en glucose (g/l)	39,84 g/l	33,81 g/l	16,39 g/l
Teneur en vitamine C (mg/l)	32,2 mg/l	16,12 mg/l	16,12 mg/l

3.1.1. Teneur en protéines

Nous avons calculés cette teneur par la méthode de Lowry *et al*, (1951) en recourant à une courbe étalon de la fonction D.O= f (Concentration de la BSA) (Figure 10). La teneur en protéines des 3 laits étudié est mentionnée dans le tableau II. La teneur en protéine du lait de vache cru est de 37,98 g/l ± 0.11, cette teneur répond bien à la norme requise (32 g/l) et varie légèrement dans le lait reconstitué (LR) (22,98 g/l) et le lait UHT (20,91 g/l).

Ces résultats sont comparables à ceux rapportées par d'autres études même si les valeurs mentionnées étaient plus faible ; 34 g/l (ALIAS et LINDEN, 2004), 36 g/l (MALACARNE *et al*, 2002) et 32 g/l (HAUG *et al*, 2007 ; COURTET, 2007).

La teneur en protéines obtenue dans d'autres espèces, tel que le lait caprin MAHIEU *et al* (1977) avec 27,8 g/l, DECANDIA *et al* (2007) avec 35,4 g/l, ZAHRAADDENN *et al* (2007) avec 38,4 g/l et le lait camelin ATTIA *et al* (2001) 30,72 g/l ; SHAMSIA (2009) 34,6 g/l ; ELAMINE et WILCOX (1992) 28,0 g/l.

La variation de la teneur en protéine entre les 3 échantillons peut être expliqué par l'effet du traitement thermique sur le lait, on remarque que plus la température du traitement thermique est élevé, la teneur en protéine diminue : dans le LR qui a subit la pasteurisation (63 °C pendant 30 minutes) la teneur été de 22,98 g/l et dans le lait UHT (130 °C à 150 °C pendant 2,3 secondes) la teneur est encore plus faible 20,91 g/l.

L'effet du traitement thermique sur le lait a été étudié par plusieurs auteurs (HILLIER et LYSTER, 1979 ; DAMICZ *et al*, 1965 ; MCMAHON et YOUSIF, 1993) aboutissant à une seule conclusion, que le traitement thermique cause la dénaturation des protéines surtout pour les protéines solubles.

3.1.2. Teneur en lactose

Nous avons fait le dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) dans les 3 échantillons du lait, puis on a comparé les concentrations en lactose trouvés dans ces échantillons. Les résultats de la teneur en lactose diffèrent dans les 3 échantillons analysés, ces résultats sont donnés dans le tableau II.

La quantité en lactose présente dans nos solutions (LV, LR, UHT), a été déterminée à travers la courbe étalon qu'on a tracé $DO = f(\text{concentration en lactose})$ (Figure 11). La teneur en lactose trouvé pour le LV est de 39,84 g/l, qui est une valeur comparable aux travaux de SIBOUKEUR (2007) 44,13 g/l, ALIAS et LINDEN (2004) 49 g/l et MALACARNE *et al* (2002) 48,8 g/l. Par contre pour le LR et le lait UHT ces valeurs sont un peu plus faible et sont respectivement : 33,81 g/l, 16,39 g/l.

La diminution de la teneur en lactose dans les deux échantillons qui ont subit un traitement thermique peut être expliqué par le chauffage du lait. Ce chauffage la caramélisation du lactose, ce qui est un traceur de mise en évidence de l'intensité du traitement thermique appliqué et confère au lait un goût cuit qui est désagréable dans certains cas (POUGHEON, 2001).

Cette diminution peut être également expliqué par le stade de lactation, car comme pour le lait camelin, la teneur en lactose est faible durant les premiers jours de lactation puis elle augmente jusqu'à se stabiliser à partir de 5^{ème} jour (KAMAL *et al*, 2007).

3.1.3. Teneur en vitamine C

La Vitamine C est une substance chimique à caractère acide connue aussi sous le nom d'acide ascorbique, nom dérivant de l'activité antiscorbutique qu'elle présente dans l'organisme, est la vitamine quantitativement la plus importante dans la plupart des laits et particulièrement dans le lait de chamelle.

La teneur en vitamine C, dont il est rapporté à travers la littérature que nous avons consultée est de 19 mg/l pour un lait de vache qui provient des races étranger (POLONOVSKY *et al*, 1971 ; MEHAIA, 1994).

Les teneurs en vitamine C pour les 2 échantillons (LR et UHT) sont très proches ou même identiques (16,12 mg/1) et sont comparables à la norme, alors que celle de LV (32,2 mg/1) est la plus élevée, cela peut être expliqué par la non fiabilité de la technique de titration, car elle est considérée comme une méthode peu sensible.

Dans d'autres espèces comme le lait camelin par exemple, le taux moyen de cette vitamine est de 44,28 mg/1, cette valeur s'élève à 2 fois la valeur mesurée pour le lait de vache.

Les résultats de cette étude sont concordants avec ceux cités dans la littérature : 41,4 mg/1 (SIBOUKEUR, 2005), 46 mg/1 (SHAMSIA, 2009). Toutefois, certains auteurs ont enregistré des taux plus faibles : 24,9 mg/1 (MEHAIA, 1964) ; 3 à 36 mg/1 (ZHANG *et al*, 2005).

Les valeurs rapportées par KON (1959) et JAUBERT (1997) donnent la moyenne en vitamine C pour le lait de chèvre à 20 mg/1.

3.2. Fractionnement des protéines sériques et des caséines du lait de vache

Afin de séparer entre les protéines sériques et les caséines nous avons procédé par une précipitation acide à pH=4,6 comme le montre la Figure 8, à cette valeur de pH on aura une précipitation totale des caséines du lait de vache (ALIAS et LINDEN, 1997), tandis que les protéines sériques restent solubles à cette valeur de pH.

3.2.1. Chromatographie de perméation sur gel

Vu le grand intérêt que présente les protéines du lactosérum sur le plan biologique et fonctionnel, la mise en œuvre de méthode facile et peu coûteuse pour leur séparation et purification est toujours un objectif analytique qui suscite de l'intérêt. Pour cela plusieurs protocoles de purification ont été développés sur les protéines sériques bovines.

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

Dans notre travail afin d'identifier et de séparer les protéines sériques bovines, nous avons réalisés une séparation par chromatographie sur une colonne Séphacryl S100. Le chromatogramme obtenu montre l'existence de trois fractions nommées F1, F2 et F3, (Figure 13A).

Ces fractions ont été contrôlées par électrophorèse en PAGE-Native (Figure 13B). On s'appuyant sur les données bibliographiques (SHIMAZAKI et SUKEGAWA, 1982) on a constaté que dans ces conditions non dissociantes et non dénaturantes les protéines sériques bovines migrent en cinq bandes, selon l'ordre croissant de leurs mobilités électrophorétique : Igs < BSA < α -La < β -Lg.

Les Igs ont une mobilité faible, vu leur PM élevé qui ne leur permet pas de migré plus loin. Une bande bien focalisée constituant la BSA, suivi de l' α -La, enfin 2 autres bandes intenses correspondent aux deux variantes génétiques de la β -Lg.

L'électrophorégramme obtenu de nos échantillons élués montre la présence d'une seule bande (A) visible au niveau de la fraction F2, qui peut correspond à la β -lactoglobuline de PM 18 kDa selon les travaux de : SI AHMED ZENIA *et al* (2013) ; NAQVI *et al* (2010) ; LIN *et al* (2010), tandis que dans la fraction F1 on a une élution de plusieurs protéines au même temps ce qui peut être expliqué par la largeur du pique F1. La fraction F3 ne nous révèle aucune présence de protéines sériques.

FELIPE et LAW (1997) ont réalisés une séparation des protéines sériques bovines sur gel de Superdex 75. Les profils obtenus montrent la présence de trois pics majeurs, la première fraction y a eu élution des Igs et la BSA, la seconde contient la β -Lg et la dernière contient l' α -La avec un haut degré de pureté.

Ces résultats sont comparables à ceux d'autres travaux réalisés sur d'autres supports tels que ARMSTRONG *et al* (1970) sur Sephadex G75, YOSHIDA (1990) sur Sephacryl S100 et NEYSTANI *et al* (2003) sur le Sephadex G50.

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

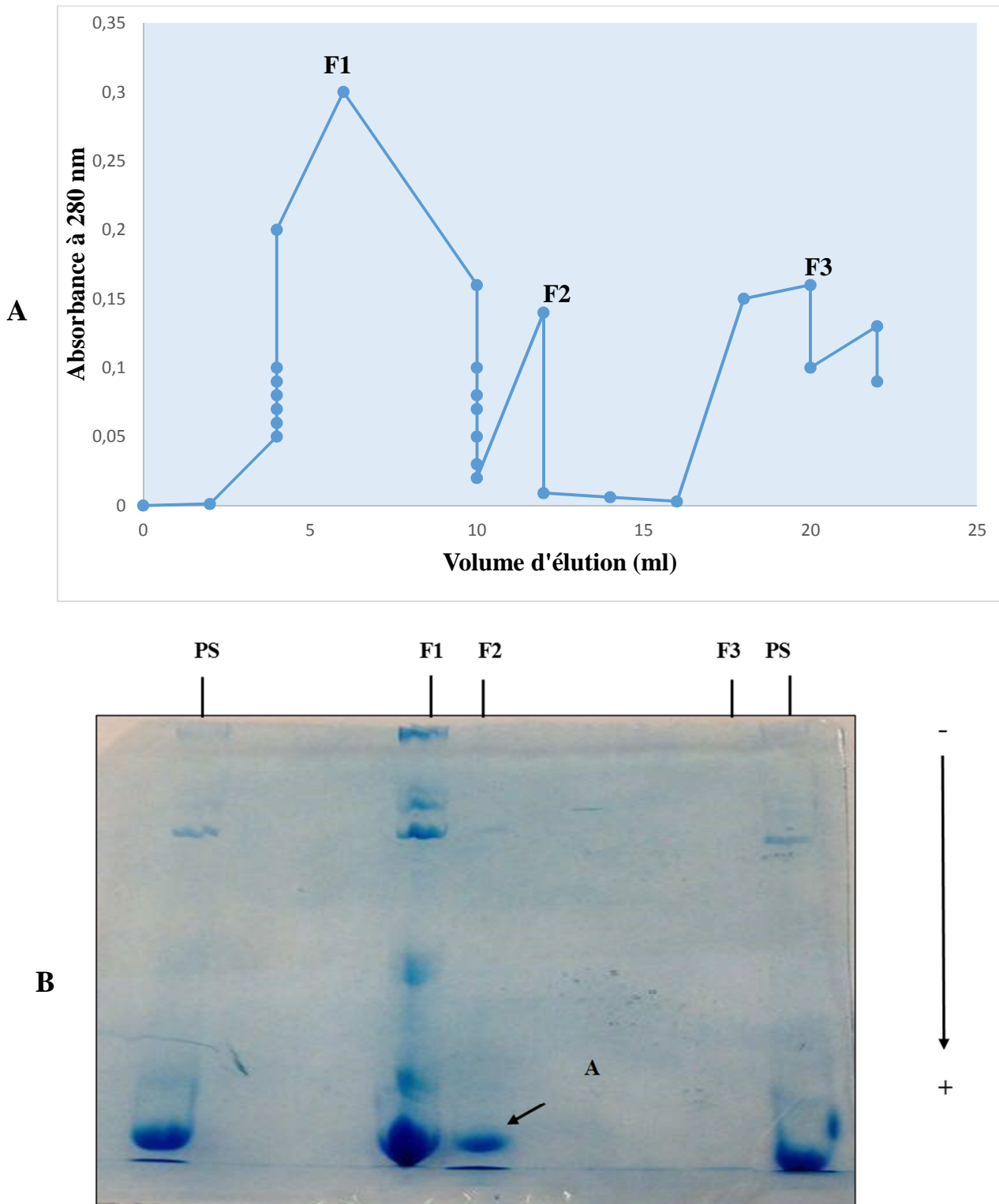


Figure 13 : Chromatographie Sur gel de permeation des protéines sériques bovines sur Sephacryl S100 ; colonne (20 x 1Cm) ; Tampon Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4 ; Dépôt 50 mg de protéines ; Débit d'élution 0.46/ml in. A : Chromatogramme obtenu B : Profils électrophorétique (PAGE-NATTVE) des fractions élues (T = 12%, C = 2,7%).

PS : Les protéines sérique totales ; F1, F2 et F3 : Les Fractions des pics de Chromatographie.

Après précipitation nous avons récupérés les protéines sériques est effectués une hydrolyse enzymatique par la trypsine.

3.3. Contrôle électrophorétique des hydrolysats enzymatiques des protéines sériques

Dans le but de déterminer l'effet de la trypsine sur les protéines sériques, nous avons effectués une électrophorèse en PAGE-SDS. Le profil électrophorétique est visualisé dans la figure 13, ce profil est comparable au travail de AICH *et al* (2015).

En PAGE-SDS, le profil électrophorétique obtenu, révèlent la présence de bandes bien focalisées, d'intensités variables. Ces bandes sont notées de I à III selon l'ordre de leur migration croissante. La distribution de ces bandes est légèrement hétérogène. On remarque que les bandes II et III sont communes dans tous les puits, alors que la bande I se trouve uniquement au niveau du premier puit.

La bande (I) est très fine avec une MM de 67 kDa, cette bande peut correspondre à la BSA, on remarque qu'au niveau des puis PS, T₀ et SI l'intensité de cette bande est presque la même, par contre au niveau des puis T₁₅, T₃₀, T₆₀, et T₁₂₀, qui correspond aux différents temps d'incubation des protéines sériques avec la trypsine à 40°C cette intensité diminue. Le puit 3 indique clairement la disparition presque totale de la bande caractéristique de la BSA après 15 min d'hydrolyse trypsique, cela peut être expliqué par la sensibilité de la BSA à la trypsine. On conclue alors que la BSA est une protéine très fragile à l'action enzymatique.

La bande II qui est très intense, elle correspond à la β -Lg avec une MM de 18 KDa, elle est considéré comme la protéine majeure du lactosérum bovin, elle constitue approximativement la moitié du totale de ses protéines (WAL, 2001 ; RYTKONEN, 2006). Des quatre variants génétiques connus de la β -Lg, les principaux sont le variant A et le variant B. En revanche, dans tous les puits, on note la persistance de la bande correspondant à la β -lg et l'absence des peptides, traduisant la forte résistance de cette protéine à l'hydrolyse enzymatique.

Par contre on remarque une légère diminution de l'intensité de la bande III qui correspond à l' α -Lac de PM 14 kDa dans les puits T₀ et T₁₅, mais cette diminution n'est pas vraiment importante. L' α -Lac est une métalloprotéine globulaire compacte, sa structure primaire est connue et stabilisée par 4 ponts disulfures formés par 8 résidus Cys. Deux variants génétiques A et B ont été décrits pour l' α -Lac, avec prédominance du variant B (PRIOULT, 2003). Pour cela la protéine α -Lac reste toujours résistante à l'effet de l'enzyme utilisé.

Les produits d'hydrolyse de la BSA ne sont pas visualiser puisque nous avons utilisés un gel de 12% ; qui est un gel très large, il présente des mailles très grandes, et peut être c'est à travers ces mailles que nos fragments ont été sortis.

On comparant les résultats obtenu dans le puit contenant les protéines sériques totales (PS) et celui qui contient les protéines sériques sans enzyme incubé pendant 120 min (SI), on remarque que l'intensité des bandes est pratiquement la même, alors on peu dire que le traitement thermique n'a pas d'effet sur nos protéines.

Il faut noter que l'effet de la trypsine sur les protéines sériques est similaire à celui qui se déroule dans le tube digestif des êtres humains. Une étude a été menée à ce propos par INGLINGSTAD *et al* (2010) ils ont conclu que L' α -lactalbumine de toutes les espèces y compris celle du lait bovin, apparaissait être très résistante à la fois à la digestion gastrique et duodénale. Une tendance similaire était observée pour la β -lactoglobuline bovine.

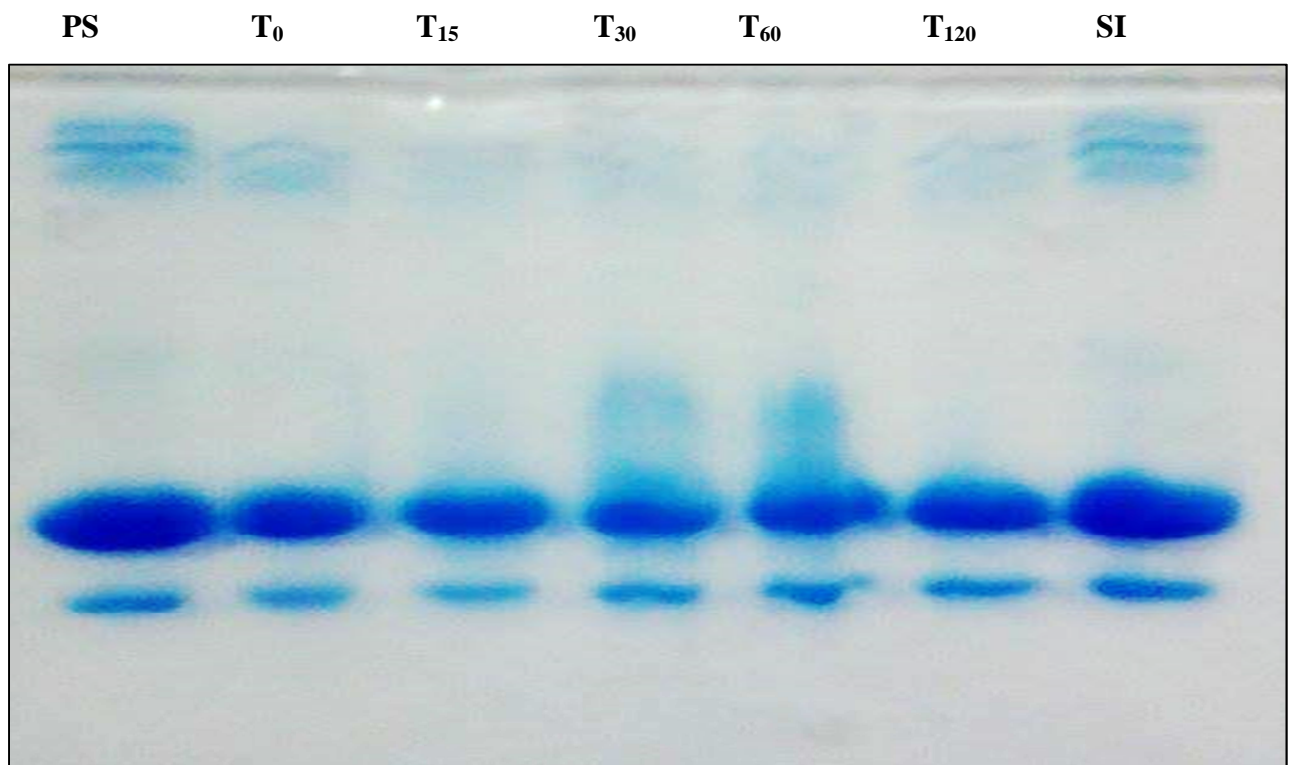


Figure 14 : Profil électrophorétique sur gel de Polyacrylamide en conditions dissociantes et dénaturantes (SDS-PAGE) des fractions de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines. (T = 12 % et C = 2,7%).

PS : Protéines sériques totales ; T₀, T₁₅, T₃₀, T₆₀, T₁₂₀ : Prélèvement des hydrolysats enzymatiques des protéines sériques à des temps différents ; 0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min ; SI : Protéines sériques sans enzyme incubé pendant 120 min.



Conclusion

Conclusion

La désamidation peut agir comme une horloge moléculaire pour le fonctionnement et le renouvellement des protéines et peut avoir lieu pendant la purification des protéines recombinantes et pendant le stockage des protéines thérapeutiques. Elle joue également un rôle de signal dans la programmation de l'apoptose cellulaire et elle serait impliquée dans le processus de sénescence.

Les résidus iso-Asp générés au cours de la désamidation ne sont pas néfastes pour la cellule, c'est plutôt l'accumulation au cours du vieillissement de ces protéines endommagées qui peut avoir des conséquences importantes aux niveaux de leur structures et de leur fonctions biologiques. C'est notamment le cas dans certaines maladies dont la maladie d'Alzheimer.

L'accumulation d'iso-Asp pourrait aussi induire une forte réponse auto-immunitaire des lymphocytes B et T chez des souris immunisées avec le peptide 90-104 du cytochrome C contenant en position 93 un résidu iso-Asp.

La PIMT, qui permet de limiter l'accumulation des résidus iso-Asp pourrait aussi induire une forte stimulation du système immunitaire. Ceci peut mener à l'apparition de maladies auto-immunes (des Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin comme la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique) lorsqu'il s'agit d'une molécule du soi qui est désamidée ou l'apparition d'allergies lorsqu'il s'agit d'une molécule étrangère (désamination excessive de la gliadine du blé). Cette accumulation d'iso-Asp peut aussi mener à l'apparition d'autres maladies auto-immunes comme la sclérose en plaques.

L'efficacité de la réaction de désamidation spontanée repose sur les conditions présentes dans le tractus gastro-intestinal (pH légèrement alcalin, température de 37°C, peptides facilement accessibles). La modification d'un peptide par désamidation spontanée induit nécessairement un changement de sa structure et de sa conformation, ce qui provoque des conséquences importantes sur ses propriétés bioactives et fonctionnelles.

Cette modification n'induit pas que des effets néfastes. Elle peut générer également des effets favorables tels que l'amélioration des propriétés techno-fonctionnelles des protéines, et son utilisation comme traitement dans certains domaines (en oncologie, en immunologie... etc.).



Références bibliographiques

Références bibliographiques

AICH R., BATABYALL R., JOARDAR S.N. (2015). Isolation and purification of beta-lactoglobulin from cow milk. *Veterinary World*, 8(5), 621-624.

ALAIS C., LINDEN G. (1997). Abrégé de Biochimie Alimentaire. Masson, 3^{ème}Ed, Paris.

ALAIS C., LINDEN G., MICLO L. (2004). Biochimie Alimentaire. 5^{ème} Ed; Lavoisier, Paris.

ARMSTRONG J. M.C.D., HOPPER K.E., MCKENZIE H.A., MURPHY W.H. (1970). On the column chromatography of bovine whey proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214(3), 419-426.

ASWAD D.W., PARANANDIML V., SCHURTER B.T. (2000). Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 21(6), 1129-1136.

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

BHATNAGAR D., CLEVELAND T.E. (1992). Molecular approaches to improving food quality and safety, Ed; An AVI Book, New York.

BLANC R.S., RICHARD S. (2017). Regenerating muscle with arginine methylation. *National Center for Biotechnology Information*.

BORSOOK H., DEASY E.X., HAAGEN-SMIT A.J., KEIGHLEY G., LOWRY P.H. (1950). *Journal of Biological Chemistry*, 184, 529.

CHEN W., EDE N.J., JACKSON D.C., McCLUSKEY J., PURCELL A.W. (1996). CTL recognition of an altered peptide associated with asparagine bond rearrangement. Implications for immunity and vaccine design. *Journal of Immunology*, 157(3), 1000-1005.

CHEVALLHER L. (2009). Nutrition : principe et conseils, 3^{ème} Ed; Masson, Paris.

CLAVERIE I., PANET M., BARBEAU S. (2008). Biochimie, 2^{ème} Ed ; Porphyre, France.

CIRRITO T.P., PU Z., DECK M. B., UNANUE E.K (2001). Deamidation of asparagines in a major histocompatibility complex-bound peptide affects T cell recognition but does not explain type B reactivity. *The Journal of Experimental Médecine*, 194(8), 1165-1169.

COURNOYER P. (2008). L'agent anticonvulsivant valproate stimule l'expression de la protéine L-isoaspartyl méthyltransférase via la voie de ERK. Mémoire. Université du Québec à Montréal. Canada.

COURTET L.F. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras : voie d'amélioration par l'alimentation. Thèse de doctorat. École Nationale Vétérinaire d'Alfort. France.

CUQ J.L. (2006). Biochimie des protéines, 147.

DAVIES M.J. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *Biochemical Journal*, 473(7), 805-825.

DAMICZ W., BUDSLAWSKI J., POGORZELSKI K. (1965). Influence du traitement thermique du lait sur la dénaturation des protéines du lactosérum. *Lait*, 441, 379-386.

DECANDIA M., CABIDDU A., MOLLE G., BRANCA A., EPIFANI G., PINTUS S., TRAVERA F., PIREDDA G., PINNA G., ADDIS M. (2007). Effect of different feeding Systems on fatty acid composition and volatile compound content in goat milk. *CIHEAM, Options Méditerranéennes*, 14, 129-134.

DEFELIPE L.A., LANZAROTTI E., GAUTO D., MARTI M.A., TURJANSKI A.G. (2015). Protein Topology Determines Cysteine Oxidation Fate: The Case of Sulfenyl Amide Formation among Protein Families. *FLOS Computational Biology*, 11 (3).

ECKERT R.L., KAARTINE M.T., NUMRMINSKAYA M., BELKIN A.M., COLAK G., JOHNSON G.V., MEHTA K. (2014). Transglutaminase regulation of cell function, *physiology review*, 94(2): 383-417.

ELAMINE F.M., WILCOX C.J. (1992). Milk composition of Majaheim camels. *Journal of dairy Science*, 75(11), 3155-3157.

FELIPE X., LAW A.J.R. (1997). Preparative-scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 459-464.

GEIGER T., CLARKE S. (1987). Deamidation, Isomerization, and Racemization at Asparaginy and Aspartyl Residues in Peptides. *Journal of Biology Chemistry*, 262(2), 785-794.

GUEYE P.M. (2007). Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse. Université Louis Pasteur, Strasbourg I. France.

HAMADA J.S., SHIH F.F., FRANK A.W., MARSHALL W.E. (1988). Deamidation of soy peptides and proteins by *Bacillus circulans* peptidoglutaminase. *Food science*, 53(3), 671-672.

HAMADA J.S., MARSHALL W.E. (1992). Enzymatic Deamidation of Proteins for Improved Food Uses, U.S. Patent N° 5, 082, 672.

HAUG A., HOSTMARK A.T., HARSTAD O.M. (2007). Bovine milk in human nutrition: a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25.

HETTIARACHCHY N.S., SATA K., MARSHALL M.R., KANNAN A. (2012). Food proteins and peptides: Chemistry, functionality, interactions, and Commercialization, Ed; CRC Press, London.

HILLIER R.M., LYSTER R.L.J. (1979). Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *Journal of Dairy Research*, 46(1), 95-102.

HITOMI K., KOJIMA S., FESUS L. (2015). Transglutaminases: Multiple functional modifiers and targets for new drug discovery, Ed; Springer, Japan.

HUTTERER C., MILBRADT J., HAMILTON S., ZAJA M., LEBAN J., HENRY C., VITT D., STEINGRUBER M., SONNTAG E., ZEITTRÄGER I., BASHIH., STAMMINGER T., RAWLINSON W., STROB S., MARSHALL M. (2017). Inhibitors of dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinases (DYRK) exert a strong anti-herpesviral activity. *Antiviral Research*, 143,113-121.

INGLINGSTAD R.A., DEVOLD T.G., ERIKSEN E.K., HOLM H., JACOBSEN M., LILAND K.H., RUKKE E.O., VEGARUD G.E. (2010). Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Science And Technology*. 90(5), 549-563.

ISSAD T., PAGESY P. (2014). O-GlcNAc glycosylation des protéines et régulation de la signalisation cellulaire : implication en physiopathologie. *Biologie Aujourd'hui*, 28(2), 109-117.

JAUBERT A. (1997). Les vitamines et les nucleotides du lait de chèvre. Intérêt nutritionnel et diététique du lait de chèvre. *INRA, Colloques*, 7 novembre, Paris, France.

JOYCE IRENE B. (2015). Nutraceutical and functional food processing technology, Ed; Wiley Blackwell, Canada.

KAMAL A.M., SALAM O.A., EL- SAIED K.M. (2007). Changes in amino acids profile camel milk protein during the early lactation. *International Journal of Dairy Science*, 2(3), 226-234.

KHOSLA C. (2017). Celiac Disease: Lessons for and from Chemical Biology. ACS Chemical Biology.

KIKUCHI M., HAYASHEDA H., NAKANO E., SAKAHUCHI K. (1971). Peptidoglutaminase: Enzymes for selective deamidation of r-amide of peptide-bound glutamine, *Biochemistry* 10(7), 1222-1229.

KON SK. (1959). Influence du traitement thermique et de la lumière sur la composition et la qualité du lait. *Lait*, 39, 381-382.

KUNZ C., LÖNNERDAL B. (1989). Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 49(3), 464-534.

LEFEBVRE T., GUINEZ C., DEHENNAUT V., BESEME-DEKEYSER O., MORELLE W., MICHALSKI J.C. (2005). Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases? *Expert Review of Proteomics*, 2(2), 265-275.

LEVIEUX D., LEVIEUX A., EL-HATMI H., RIGAUDIERE J.P. (2006). Immunochemical quantification of heat denaturation of camel (*Camelus dromedarius*) whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 73(1), 1-9.

LIN S., SUN J., CAO D., CAO J., JIANG W. (2010). Distinction of different heat treated bovine milks by native PAGE finger printing of their whey proteins. *Food Chemistry*, 121(3), 803-808.

- LIU B. Y., ZHU K.X., GUO X.N., PENG W., ZHOU H. M. (2016).** Effect of deamidation-induced modification on umami and bitter taste of wheat gluten hydrolysates. *Science of food and Agriculture*, 97(10), 3181-3188.
- LODISH H., BERK A., MATSUDAIRA P. (2005).** Biologie moléculaire de la cellule, 3^{ème} Ed ; De Boeck et Larcier, Espagne.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.
- MAHIEU H., LEJAQEN J.C., LUQUET M.F., MOUILLET L. (1977).** Etude comparative de la composition et de la contamination des laits des espèces laitières bovines, ovines et caprines. *Lait*, 57, 565-566.
- MALACARNE M., MARTUZZI M., SUMMER A., MARIANI P. (2002).** Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12(11), 869-877.
- MCMAHON D.J., YOUSIF B. H. (1993).** Effect of Whey Protein Denaturation on Structure of Casein Miceiles and their Rennetability after Ultra-high Temperature Processing of Milk with or without Ultrafiltration. *International Dairy Journal*, 3(3), 239-256.
- MCNALLY E.J., HASTEDT J.E. (2007).** Protein Formulation and Delivery, 2^{ème} Ed; Informa Healthcare, New York.
- MEHAIA M.A. (1994).** Vitamin C and riboflavin content in camels milk: effects of heat treatments. *Food Chemistry*, 50 (2), 153-155.
- MIWA N., YOKOYAMA K., NIO N., SONOMOTO K. (2013).** Effect of enzymatic deamidation on the heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to gel properties. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 61(9), 2205-2212.
- NAQVI Z., KHAN R.H., SALEEMUDDIN M. (2010).** A procedure for the purification of Beta-Lactoglobulin from bovine milk using gel filtration chromatography at low pH. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40(4), 326-336.

- NARKYUN B. (2013).** *In vitro* and *in vivo* study of deamidating enzymes through proteomic analysis: Focus on Asparaginase, Glutaminase and Transglutaminase 2. These. University of Natural Resources and Applied Life Sciences. Vienna.
- NEYESTANI T.R., DJALALI M., PEZESHKIC M. (2003).** Isolation of α -lactalbumin, β -lactoglobulin, and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*, 29(2), 202-208.
- NORIYOSHI M., RYOTA K., OHGI T. (2015).** Glycolic Acid-Catalyzed Deamidation of Asparagine Residues in Degrading PLGA Matrices: A Computational Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 7261-7272.
- PACE A.L., WONG R.L., ZHANG Y.T., KAO Y.A., WANG Y.J. (2013).** Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(6), 1712-1723.
- PILIONG H., YAN R., ANDREW J.A., SIU KWAN S. (2011).** Detection, Evaluation and Minimization of Non enzymatic Deamidation in Proteomic Sample Preparation. *National Center for Biotechnology Information*, 10(10), 1-11.
- POLONOVSKY M., BOULANGER P., MACHEBOEUF M., ROCHE J. (1971).** *Biochimie Médicale. Fascicule III.* Masson et Cie, 8^{ème} Ed, Paris.
- POUGHEON S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitières. Thèse. Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE, France.
- PRIOULT G. (2003).** Effet des prébiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse. Université Laval, Québec.
- RAUHAVIRTA T., HIETIKKO M., SALMI T., LINDFORS K. (2016).** Transglutaminase 2 and Transglutaminase 2 Autoantibodies in Celiac Disease: a Review. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*.
- ROBINSON N.E., ROBINSON A.B. (2004).** *Molecular Clocks: Deamidation of asparaginyll and glutaminyll residues in peptides and proteins*, Ed; Althouse Press, USA.

- ROBINSON N.E., ROBINSON A.B. (2007).** Use of Merrifield Solid Phase Peptide Synthesis in Investigations of Biological Deamidation of Peptides and Proteins. *Biopolymers*, 90(3), 297-306.
- RUSCONI F. (2011).** Manuel de spectrophotométrie de masse à l'usage des biochimistes, Ed; Lavoisier, Paris.
- RYTKONEN J. (2006).** Effect of heat denaturation of bovine milk β -actoglobulin on its epithelial transport and allergenicity. University of Oulu. Finland.
- RYTTERSGAARD C., GRIFFITH S.C., SAWAYA M.R., MACLAREN D.C., CLARCKE S., YEATES T.O. (2002).** Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10642-10646.
- SERRA A., GALLART-PALAU X., WEI J., KWAN SZE S. (2016).** Characterization of glutamine deamidation by long-length electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (LERLIC-MS/MS) in shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*, 88(21), 10573-10582.
- SCHÔNICHEN A., WEBB B.A., JACOBSON M.P., BARBE D.L. (2013).** Considering Protonation as a Post-translational Modification Regulating Protein Structure and Function. *National Center for Biotechnology Information*, 42, 289-314.
- SHAMSIA S.M. (2009).** Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and molecular Biology*, 1 (2), 52-58.
- SHLOMO M. (1996).** Surface Activity of Proteins Chemical and Physicochemical Modifications, Ed; New York.
- SHIMAZAKI K.I., SUKEGAWA K. (1982).** Chromatographic Profiles of Bovine Milk Whey Components by Gel Filtration on Fractogel TSK HW55F Column. *Journal Dairy Science*, 65(11), 2055-2062.
- SJÔBERG B. (2013).** Oxydation des protéines par les espèces réactives de l'oxygène : l'importance de l'environnement protéique. Thèse. Université de Franche-Comté. France.

SI AHMED ZENNIA S., ALMI D., SENOUSSE CH., BOUDJENAH H.S., MATI A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Journal of Food Agricultural*, 25 (4) 283-290.

SI AHMED ZENNIA S., MATI A., SAULNIER F., VERDIER Y., CHIAPPETTA G., MULLIERT G., MICLO L., VINH J., GIRARDET J.M. (2015). Identification by FT-ICR-MS of *Camelus dromedarius* α -lactalbumin variants as the result of non enzymatic deamidation of Asn-16 and Asn-45. *Food Chemistry*, 187, 305-313.

SIBOUKEUR O.K. (2007). Etude du lait camelin collecté localement : caractéristiques Physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à la coagulation. Thèse. Université INA El-Harrach ; Alger.

STEPHENSON R.C., CLARKE S. (1989). Succinimide Formation from Aspartyl and Asparaginyl peptides as a Model for the Spontaneous Degradation of Proteins. *Journal of biology chemistry*. 264(11), 6164-6170.

SUPPAVORASATIT I., LEE S.Y., CADWALLADER K.R. (2013). Effect of enzymatic protein deamidation on protein solubility and flavor binding properties of soymilk, *Journal of Food Science*, 78(1), 1-7.

TRENTINI D.B., SUSKIEWICZ M.J., HEUCK A., KURZBAUER R., DESZCZ L., MECHTLER K., CLAUSEN T. (2016). Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a Clp protease. *Nature*, 539, 48-53.

VIDAL V., CASES E., CUQ J.L. (2003). Propriétés fonctionnelles - Modifications chimiques des protéines alimentaires et étude des relations structure/fonction. *Oilseeds and fats, corps and lipids*, 10(1), 41-46.

VOET D., VOET J.G. (2005). Biochimie, 2^{ème} Ed ; De Boeck Supérieur, Italie.

VOET D., VOET J.G. (2016). Biochimie, 3^{ème} Ed ; De Boeck Supérieur, Italie.

WAL J. M. (2001). Structure and milk of allergens. *Allergy*, 56, 35-38.

XIE M., SCHOWEN R.L. (1999). Secondary Structure and Protein Deamidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88(1), 8-13.

- YAMAGUCHI S., JEENES D.J., ARCHER D.B. (2001).** Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. Purification, characterization and gene cloning. *Journal of Biochemistry*, 268(5), 1410-1421.
- YAO X.T., ZHAO X.H. (2015).** Pre-deamidation of soy protein isolate exerts impacts on transglutaminase-induced glucosamine glycation and cross-linking as well as properties of the products. *Journal of Science Food Agricultural*, 96(7), 2418-2425.
- YONG Y.H., YAMAGUCHI S., GU Y.S., MORI T., MATSUMURA Y. (2004).** Effects of Enzymatic Deamidation by Protein-Glutaminase on Structure and Functional Properties of R-Zein, *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 52(23), 7094-7100.
- YOSHIDA S. (1990).** Isolation of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin by Gel Filtration Using Sephacryl S-200 and Purification by Diethylaminoethyl Ion-Exchange Chromatography. *Journal Dairy Science*, 73(9), 2292-2298.
- ZAHRADDENN D., BUSTWAT I.S., MBAP S.T. (2007).** Evolution of some factors affecting milk composition of indigenous goats in Nigeria. *Livestock Research for Rural development*, 19(11), 1-8.
- ZHANG T.N., YAO J., ZHAO D., LÜ H., GUO M. (2005).** Changes in chemical composition of Alaxa Bactrian camel milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3402-3410.



Annexes

Annexe 1: Détermination de la teneur en protéine selon la méthode de Lowry *et al.*, (1951).

1- Solutions

Solution A

- Carbonate de sodium anhydride (Na_2CO_3) ;
- Soude 0,1 M.

Solution B

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

Solution C

- Solution A 50ml
- Solution B 1ml

Solution mère de BSA

- BSA 0.1mg
- Eau distillée 0.5 ml

Gamme étalon

A partir de la solution BSA, des dilutions ont été préparé suivant ce tableau :

Concentration en BSA $\mu\text{g/ml}$	0	30	50	80	100
Solution mère de BSA μl	0	150	250	400	500
Eau distillée μl	500	350	250	100	0

2-Méthode

- 0,5 ml de l'échantillon contenant entre 25 et 100 μg de protéines
 - Ajouter 2,5 ml de la solution C et mélanger ;
 - Laisser 5 à 10 min à température ambiante ;
 - Ajouter 250 μl de réactif de Folin-Ciocalteu ;
 - Homogénéiser et laisser 30 min à l'obscurité ;
 - Lire la DO à 750 nm.

3- Expression des résultats

- Tracer la courbe d'étalon : $DO=f$ (concentration de protéine standard : BSA) ;
- Déterminer à partir de cette courbe les teneurs en protéines des échantillons inconnus.

Annexe 2 : Dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS)

1-Principe de la méthode

En milieu alcalin et à chaud, l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres. Il peut être dosé par spectrophotométrie ($\lambda = 530\text{nm}$).

2-Protocole expérimental

- Mettre 1ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2ml du réactif (3.5 DNS) ;
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5min ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer pendant 15min à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530nm contre le blanc.

Gamme étalon

N° de tube	01	02	03	04	05	06
Solution de lactose (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Réactif DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

3-Expression des résultats

Tracer la courbe étalon $DO = f$ (concentration en glucose) et déterminer la quantité de sucre réducteur présente dans les solutions inconnues.

Annexe 3 : Dosage de la vitamine C dans le lait

1-Solutions :

- Solution de 2,6 dichlorophénol, (DCPIP) à 0,25 g/l :

- Sel de sodium du 2,6 DCPIP 0,25 g
- Bicarbonate de sodium -0,1 g
- Eau distillée chaude..... 300 ml
- Laisser refroidir et ajuster à 1000 ml avec de l'eau distillée.

- Préparation d'une solution titrée d'acide ascorbique à 0,5 g/l ;

- Acide ascorbique 0,5 g
- Eau distillée chaude..... 200 ml

2-Protocole :

- Préparation du blanc (témoin) ;

Dans un bicher de 10 ml, introduire : -1 ml de la solution à doser ;

- Ajouter 200 μ l d'acide acétique glaciale ;
- Verser goûte à goûte la solution de 2,6 DCPIP à l'aide d'une burette, jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante ;
- Lire le volume sur la burette (chute de burette), soit V (ml).

- Dosage de la vitamine C contenue dans des échantillons variés de lait ;

- Le lait.....1 ml
- Eau distillée3 ml
- Acide acétique glaciale.....800 μ l
- Verser goûte à goûte la solution de 2,6 DCPIP à l'aide d'une burette, jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante ;
- Lire le volume sur la burette (chute de burette), soit V (ml).

- Evolution de la teneur en Vit C dans différentes conditions de traitement ;

Dans chaque erlenmeyers A, B, C, et D mettre :

- 20 ml de la solution d'acide ascorbique à 0,5 g/l
- Puis on les traite comme indiqué ci- dessous :
- Laisser 15 min à température ambiante et exposer à la lumière ;
- Laisser 15 min à température ambiante et mettre à l'abri de la lumière ;
- Porter 15 min au bain marie à 40 C° ;
- Porter 15 min au bain marie à 80 C°.

Annexe 4 : Etapes suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait.

1-Matériels

- 05 tubes à essai propres et secs
- Tampon Tris-HCl 0,5M ; pH 6,4
- L'enzyme : la trypsine
- Le substrat ; protéines sériques
- Bain marie à 40°C et un autre bain mari à 100°C

2-Solutions à préparer

- Tampon Tris-HCL 0,5M ; pH 6,4
- Tampon d'échantillon
- Solution de HCl 10^{-3}

Annexe 5 : Electrophorèse en conditions non dénaturantes et non dissociantes (PAGE-Native)

1-Solutions :

Solution d'acrylamide

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

Tampon de gel (B)

Tris.....	9.14 g
Eau distillées.....	100 ml

Ajuster à pH 8.9 avec de HCL 4N

Tampon d'électrode

Tris.....	1.2 g
Glycine.....	5.76 g
SDS.....	0.2 g
Eau distillées.....	200 ml

Tampon d'échantillon

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

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

2-Electrophorèse**Préparation du gel : T=12% et C=2.7% (pour une plaque)**

Solution (A).....	3.25 ml
Solution (B).....	5 ml
Eau distillée.....	1.68 ml

Dégazer le mélange (maximum 2 min)

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

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 250 V

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 6: Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE- SDS).

1. Solutions :

Solution d'acrylamide (A) :

Acrylamide.....	36g
Bis-acrylamide.....	1g
Eau distillée.....	100 ml

Tampon du gel de séparation (Solution S) :

Tris.....	9.25g
Eau distillée.....	50 ml

Ajuster à pH 8,8 avec de HCL 4N

Tampon du gel de concentration (Solution C)

Tris.....	3g
Eau distillée.....	50 ml

Ajuster à pH 6.8 avec de HCL 4N

Tampon d'électrode

Tris.....	1.2 g
Glycine.....	5.76 g
SDS.....	0.2 g
Eau distillée.....	200 ml

Tampon d'échantillon

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

Dissoudre 1 à 2 mg de protéines lyophilisées dans 800µl de ce tampon

Chauffer à 100°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 graines de bleu de bromophénol.

Solution de fixation

TCA.....	12 g
----------	------

Eau distillée 100ml

Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250 0.5g

TCA..... 4g

Methanol..... 100ml

Eau distillée 100ml

Solution de décoloration

Acide acétique37,5ml

Eau distillée312,5ml

Methanol..... 150ml

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium0,1g

Eau distillée (qsp)..... 1ml

2. Electrophorèse :**Préparation du gel de séparation : T = 12% et C = 20% (pour une plaque)**

Solution (A)..... 4,60 ml

Solution (S)2,51ml

Eau distillée2,73ml

Dégazer pendant 2mn maximum

SDS 10% 100µl

TEMED 13µl

Persulfate d'ammonium 10 % 75µl

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

Préparation du gel de concentration : T = 4,8% et C = 2,7% (pour une plaque)

Solution (A)..... 1,3ml

Solution (C).....2,5ml

Eau distillée..... 5,8ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à 10% 100µl

TEMED.....20 µl

Persulfate d'ammonium 10 %.....10 µl

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

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 200 V

Fixation : 45 minutes dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration