

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMÈRI DE TIZI OUZOU, ALGÈRIE
FACULTÉ DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE - MICROBIOLOGIE



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Sciences en
Biologie ; option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies

Thème

**Isolement et séparation des protéines sériques du lait de
chamelle : mise en évidence du phénomène de désamidation
de l' α -Lactalbumine ; conséquences sur la stabilité structurale**

Présenté par : Saliha SI AHMED ZENNIA

Devant le jury :

Président :	Mr HOUALI Karim	Professeur	UMMTO
Directeur de thèse :	Mr MATI Abderrahmane	Professeur	UMMTO
Examineurs :	Mme HELLAL Amina	Professeur	ENP d'Alger
	Mr MOUSSA-BOUDJEMAA Boumediene	Professeur	UABB de Tlemcen
Invité :	Mr GIRARDET Jean-Michel	HDR	Université de Lorraine, France

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

Ce travail de thèse a été une aventure personnelle très enrichissante et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu pour la réalisation de ce projet.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse M^r MATI Abderrahmane, professeur en Biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. Pour sa disponibilité, pour ses qualités tant scientifiques qu'humaines. Qu'il en soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : le président M^r HOUALI Karim, professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou ainsi que les examinateurs M^{me} HELLAL Amina, professeur à l'Ecole National Polytechniques d'Alger, M^r MOUSSA-BOUDJEMAA Boumediene, professeur à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen ainsi que notre invité d'honneur M^r Girardet Jean-Michel, HDR à l'Université de Lorraine-France.

Ma gratitude s'adresse tout particulièrement à M^r Girardet Jean Michel pour m'avoir initié à la chromatographie FPLC et à l'électrophorèse bidimensionnelle. Pour les précieux conseils dont il m'a fait profiter tout au long de mon stage à Nnacy.

Je tiens aussi à remercier le professeur Dary Annie, animatrice de l'équipe PB₂P de m'avoir accueilli avec bienveillance au sein de son laboratoire de l'URFPA de l'Université de Lorraine-France, pour mener à bien ce travail de thèse.

Je voudrai témoigner ma reconnaissance plus particulièrement à Saulnier Franck, technicien au SCSP et Miclo Laurent, maîtres de conférences et membres de l'équipe PB₂P-URAFPA de l'université de Lorraine avec qui j'ai eu de nombreux échanges qui se sont concrétisés par une collaboration scientifique productive. Je remercie aussi Cakir-Kiefer Céline, maîtres de conférences et membres de l'équipe PB₂P-URAFPA, pour ses conseils qui ont contribué à l'avancement de ce travail.

Un grand merci à toute l'équipe Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de ParisTech-France, en particulier, Vinh Joëlle, Verdier Yann et Chiappetta Giovanni pour leur réel investissement dans nos

analyses de spectrométrie de masse. A cette occasion, je remercie aussi tous les responsables du projet « Très Grand Equipent, TGE » qui ont financé nos analyses de spectrométrie de masse.

J'exprime ma profonde gratitude à Kriznik Alexandre, ingénieur d'études au laboratoire AREMS (Université de Lorraine) qui nous a permis la réalisation de nos analyses de calorimétrie et de dichroïsme circulaire. Merci Alexandre pour ta disponibilité et pour toutes les informations utiles que j'ai eues, tu m'as fait replonger dans mes anciennes connaissances de thermodynamie.

Je souhaite remercier vivement Mulliert Guillermo et toute l'équipe du laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations de Université de Lorraine, pour leur précieuse contribution dans la partie modélisation informatique.

Je remercie très sincèrement tous les membres de l'équipe du LABAB, ils se reconaitront, pour nos discussions scientifiques assidues et leurs nombreux encouragements. Je tiens particulièrement à remercier nos ingénieurs de laboratoire Samia et Lamia et notre agent de saisie Hassina pour l'ambiance chaleureuse qu'elles nous assurent au laboratoire et pour tous les moments de détente que nous avons partagé.

J'associe à ces remerciements tous mes collègues enseignants-chercheurs du département de Biochimie-Microbiologie de l'université Mouloud Mmammeri de Tizi Ouzou, pour leur soutien moral, une pensée particulière à mon amie Malika, dont la générosité est sans limite.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mes très chers parents qui ont toujours souhaité que j'aille le plus loin possible sans jamais m'imposer une direction particulière. Merci donc à vous deux pour m'avoir soutenu pendant toutes ces années.

Enfin, un immense merci à mon cher époux, Samir, qui m'a épaulé durant ces cinq années, pour son grand soutien dans les moments de doute et de fatigue.

Et puisque deux merci valent mieux qu'un, à vous tous, à nouveau, un grand merci !

Dédicaces

Je dédie cette thèse à mon adorable fils « Aghiles »

« La théorie, c'est quand on sait tout mais que rien ne fonctionne. La pratique c'est quand tout fonctionne mais que personne ne sait pas pourquoi. En science on allie la théorie à la pratique : rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi. »

Albert Einstein

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

RESUME

INTRODUCTION GENERALE 01

I/ SYNTHESE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Aperçu sur le lait camelin. 03

1.1.1. Le dromadaire et la production du lait.....

1.1.2. Caractéristiques du lait camelin.....

1.1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques.....

1.1.2.2. Composition et proportions des différents constituants..... 04

1.2. Spécificité de L' α -lactalbumine cameline..... 08

1.2.1. Structure second-tertiaire.....

1.2.2. Rôle du calcium dans la stabilité de l' α -lactalbumine..... 12

1.2.3. Propriétés biologique..... 13

1.2.4. Stabilité thermique..... 14

1.3. Désamidation non enzymatique des protéines..... 16

1.3.1. Définition et conditions de réalisation.....

1.3.2. Mécanisme de la désamidation non enzymatique 17

1.3.3. Importance de l'eau dans le mécanisme de désamidation.....

1.3.4. Importance de la désamidation non enzymatique..... 19

1.3.5. Influence de divers facteurs sur la cinétique désamidation

1.3.5.1. Effet du pH 20

1.3.5.2. Effet de la température 21

1.3.5.3. Effet du solvant

1.3.5.4. Effet de la structure de la protéine 23

1.3.6. Système de réparation de la désamidation non enzymatique..... 26

1.3.6.1. Mécanisme de réparation par la PIMT..... 27

1.3.7. Impacte de la désamidation non enzymatique sur les protéines alimentaires..... 30

II. MATERIEL & METHODES

2.1. Matériel..... 33

2.1.1. Appareillage

2.1.2. Matériel biologique..... 34

2.1.2.1. Echantillons de lait

2.1.2.2. Enzymes et protéines étalon

2.1.3. Produits et réactifs 35

2.2. Méthodes 37

2.2.1. Isolement des protéines lactosériques totales

2.2.2. Dosage des protéines.....

2.2.3. Fractionnement des protéines lactosériques camelines..... 37

2.2.3.1. Chromatographie d'échange d'anions.....

2.2.3.2. Chromatographie de perméation sur gel

2.2.3.3. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)..... 38

2.2.3.4. Elimination des immunoglobulines camelines

2.2.4. Méthodes électrophorétiques et les techniques de révélation 40

2.2.4.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE)

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

2.2.4.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE).....	41
2.2.4.4. Révélation des protéines par bleu de coomassie	42
2.2.4.5. Révélation des protéines par le nitrate d'argent	
2.2.4.6. Révélation des protéines par le réactif de Schiff	
2.2.5. Désamidation nonn enzymatique	43
2.2.5.1. Incubation du lactosérum camelin dans le tampon phosphate	
2.2.5.2. Dosage par FPLC analytique	
2.2.6. Hydrolyses enzymatiques.....	
2.2.7. Chromatographie liquide à hautes performances (HPLC) en phase inversée	44
2.2.8. Dichroïsme circulaire (CD).....	
2.2.9. Microcalorimétrie différentielle à balayage de température (DSC).....	46
2.2.10. Spectrométrie de masse à transformé de Fourier (FT-ICR-MS).....	48
2.2.10.1. Principe	
2.2.10.2. Détermination de la masse	
2.2.10.3. Détermination du site de désamidation	49
2.2.11. Modélisation moléculaire de l' α -lactalbumine cameline	51

III. RESULTATS –DISCUSSION

Chapitre I : Fractionnement et caractérisation des protéines sériques du lait camelin purification de l'α-lactalbumine cameline.....	53
3.1.1. Mesure du pH et quantification des fractions protéiques.....	
3.1.2. Analyse électrophorétique des protéines sériques camelines totales	54
3.1.3. Fractionnement des protéines sériques camelines totales	57
3.1.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions.....	
3.1.3.2. Chromatographie de perméation sur gel	
3.1.4. Purification de l' α -Lactalbumine ameline par FPLC	59
Chapitre II : Mise en évidence de la désamination spontanée de l'α-Lactalbumine et cinétique de la réaction.....	63
3.2.1. Modification chimique l' α -lactalbumine en fonction du temps et du pH	
3.2.1.1. Suivi de la modification de l' α -lactalbumine par FPLC.....	
3.2.1.2. Suivi de la modification de l' α -lactalbumine par l'électrophorèse.....	66
3.2.2. Purification de l'isoforme A ₃	69
3.2.3. Paramètres cinétique de la désamidation de l' α - La cameline.....	
3.2.4. Détermination des points isoélectriques des isoformes d' α -lactalbumine cameline.....	74
3.2.5. Spectrométrie de masse	78
3.2.5.1. Détermination de la masse exacte des isoformes	
3.2.5.2. Détermination des sites de désamidation	
3.2.6. Modélisation moléculaire de la structure de l' α -lactalbumine cameline.....	81
Chapitre III : Influence de la désamidation sur les propriétés structurale et thermodynamique de l'α-Lactalbumine de chamelle.....	85
3.3.1. Structures second-tertiaire de l' α -lactalbumine cameline native et désamidée	
3.3.2. Thermostabilité de l' α -lactalbumine cameline native et désamidée.....	86
3.3.3. Etude de la cinétique d'hydrolyse de l' α -La native er désamidée.....	91
Conclusion générale.....	101
Références bibliographiques.....	105
Annexes	

LISTE DES ABREVIATIONS

2D	Bidimensionnelle
α-La	α -Lactalbumine
α_S-CN	Caséine α _S
β-CN	Caséine β
β-Lg	β -Lactoglobuline
γ-CN	Caséine γ
κ-CN	Caséine κ
μg	Microgramme
2-ME	2-mercaptoéthanol
AdoHcy	S-adénosyl homocystéine
AdoMet	S-adénosyl méthionine
AG	Acide gras
APS	Persulfate d'ammonium
BBP	Bleu de bromophénol
BSA	Albumine sérique bovine
C	rapport (en %) : (bisacrylamide /acrylamide + bisacrylamide)
CN	Caséine
CNT	Caséines totales
CWBP	« Camel Whey Basic Protein »
Da	Dalton
DC	Dichroïsme circulaire
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DNE	Désamidation non enzymatique
DSC	« Différentiel Scanning Calorimetry »
DO	Densité optique
EDTA	Ethylènediaminetétracétate
E/S	rapport enzyme sur substrat
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
FPLC	Chromatographie liquide rapide des protéines
FT-ICR	« Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance »
HEPES	acide N-(2-hydroxyéthyl) pipérazine-N'-(2-éthanesulfonique)
HPLC	chromatographie liquide à haute performance
IEF	isoélectrofocalisation
IgG	Immunoglobulines G
kDa	kilo Dalton
LF	Lactoferrine
LP	Lactoperoxydase
LZ	Lysozyme
M	Molaire
MG	« Moltene globule »
MGG	Membrane du Globule Gras
MM	Masse moléculaire
MS	Spectrométrie de masse
mA	Milli ampère
m/v	Masse par volume
NaCl	Chlorure de sodium
NPN	Azote non protéique
NT	Azote total

OVA	Ovalbumine
P/V	Poids / volume
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
PDB	banque de données des protéines
PGRP	Protéine de reconnaissance du peptidoglycane
pH	Potentiel d'hydrogène
pHi (ou pI)	pH isoélectrique
PL	Protéines du lactosérum
PM	Poids moléculaire
PIMT	L-isoaspartyl-méthyltransférase
PP3	Composant-3 des protéose –peptones
PSc	Protéines solubles camelines
PSv	Protéines solubles bovines
PT	Protéines totales
R	Coefficient de corrélation
SA	Albumine sérique
SAH	S-adénosyl-L-homocystéine,
SAM	S-adénosyl-méthionine
SDS	Dodécylsulfate de sodium
T	rapport (%) : (acrylamide + bisacrylamide) sur le volume du gel
TCA	Acide trichloracétique
TFA	acide trifluoracétique
TEMED	N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylène diamine
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UV	Ultra-violet
v/v	Volume par volume
WAP	« Whey Acide Protein ».

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Alignement des structures primaires des α -Lactalbumines de diverses espèces. Les numéros d'accès dans <i>SwissProt</i> sont en italiques	09
2	Structure de l' α -lactalbumine (Bushmarina <i>et al.</i> , 2005)	10
3	Site de fixation du calcium (PDB 1HFY)	10
4	Etapas réactionnelles de la synthèse du lactose (Hill et Brew, 1975).	13
5	Courbes de capacité calorifique, à pH 7,6, des formes <i>holo</i> pour la courbe a et <i>apo</i> pour la courbe b de l' α -Lactalbumine bovine (Yutanit et Ogasahara, 1992).	15
6	Mécanisme de la désamidation non enzymatique du résidu asparagine à pH>5 (Knorre <i>et al.</i> , 2009)	18
7	Mécanisme de la désamidation non enzymatique du résidu d'asparagine à pH <4 et pH >6	22
8	Rotation de l'angle de torsion psi requise pour la formation de l'intermédiaire succinimide (Robinson et Robinson, 2004)	24
9	Vue d'ensemble de la structure cristalline de la PIMT humaine (Ryttersgaard <i>et al.</i> , 2005)	27
10	Mécanisme de réparation des protéines par la PIMT (Young <i>et al.</i> , 2005)	28
11	Etapas de séparations suivies des protéines lactosériques à partir du lait de dromadaire collecté dans la région de Ouargla (Algérie).	36
12	Photographie de l'appareillage de chromatographie liquide basse pression (BioLogic LP, Biorad)	39
13	Photographie de l'appareillage de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) semi-automatisé ÄKTA-Purifier.	39
14	Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de l'hélice α (Johnson et Tinoco, 1972), du feuillet β et de la structure désordonnée (Brahms et Brahms, 1980).	45
15	Photographie d'un spectromètre de dichroïsme circulaire de type CD 6.	46
16	Photographie d'un microcalorimètre à balayage de température, modèle Microcal VP-DSC.	48
17	Photographie d'un spectromètre de masse LTQ-FT (ThermoFisher Scientific)	50
18	Schéma du principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap TM	50
19	Electrophorèses en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE ; A) et en présence de SDS (SDS-PAGE ; B) des protéines solubles du lactosérum bovin (PSv) et camelin (PSc).	56
20	Séparation des protéines sériques camelines totales par chromatographie échangeuse d'ions en basse pression.	58
21	Profils électrophorétiques (Alkaline-PAGE) des fractions F ₁ , F ₂ et F ₃ purifiées par chromatographie basse pression sur colonne DEAE-cellulose.	58
22	Séparation des protéines sériques camelines totales par chromatographie de perméation sur gel en basse pression.	60
23	Profil électrophorétique (Alkaline-PAGE) des fractions F ₁ , F ₂ et F ₃ purifiées par chromatographie sur Sephacryl S200.	60
24	Chromatogramme en FPLC semi-préparative d'échange d'anions des protéines lactosériques camelines.	62
25	Contrôle de pureté par électrophorèse (Alkaline-PAGE) de la fraction A ₁ obtenue par FPLC.	62
26	Profils chromatographiques (FPLC d'échange d'anions; colonne Mono Q) permettant de	64

	suivre la modification de l' α -La cameline A ₁ en isoforme A ₂ à pH 7,4	
27	Profils chromatographiques (FPLC d'échange d'anions; colonne Mono Q) permettant de suivre la modification de l' α -La cameline A ₁ en isoforme A ₂ à pH 8,4	65
28	Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc	67
29	Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc	68
30	Profils chromatographiques (FPLC d'échange d'anions; colonne Mono Q) permettant de suivre la modification de l' α -La cameline A ₁ en isoforme A ₂	70
31	Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc	71
32	Evolution exponentielle (A) et logarithmique (B) du rapport des aires (à 280 nm) des pics de l' α -lactalbumine A ₂ (A _t /A ₀) déterminée par FPLC en fonction du temps d'incubation à 37°C dans 150 mM de tampon phosphate de sodium à différent pH	73
33	Electrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D) des isoformes A ₁ , A ₂ et A ₃	75
34	Superposition des trois gels de l'électrophorèse bidimensionnelle (PAGE-2D) des isoformes A ₁ , A ₂ et A ₃ d' α -Lactalbumine de chamelle	77
35	Spectre FT-ICR-MS/MS de l' α -lactalbumine A ₁ , A ₂ et A ₃	79
36	Spectre FT-ICR-MS/MS des peptides 9–26 (1972.89 Da) et 32–50 (2172.90 Da) de l'hydrolyse chymotrypsique de l' α -lactalbumine cameline désamidée	80
37	Représentation en ruban de la modélisation dynamique de l' α -lactalbumine cameline (<i>Camelus dromedarius</i>) (a) et la localisation détaillée des deux séquences Asn ⁴⁵ -Gly ⁴⁶ (b) et Asn ¹⁶ -Gly ¹⁷ (c)	84
38	Spectres de dichroïsme circulaire dans l'UV proche (A) et l'UV lointain (B) de l' α -lactalbumine cameline native (A ₁) et désamidées (A ₂ et A ₃) purifiées par FPLC semi préparative et solubilisées dans l'eau ultra-pure	87
39	Thermogrammes obtenus par DSC de l' α -La cameline native et désamidée. Les courbes illustrées sont la moyenne de trois analyses	90
40	Hydrolyse de l' α -lactalbumine bovine (α -La Bov) et cameline (α -La A ₁) par la thermolysine à 37°C en fonction du temps	93
41	Hydrolyse de l' α -lactalbumine cameline A ₂ (α -La A ₂) et A ₃ (α -La A ₃) par la thermolysine à 37°C en fonction du temps	94
42	Hydrolyse de l' α -lactalbumine bovine (α -La Bov) et cameline (α -La A ₁) par la trypsine à 37°C en fonction du temps.	96
43	Hydrolyse de l' α -lactalbumine cameline A ₂ (α -La A ₂) et A ₃ (α -La A ₃) par la trypsine à 37°C en fonction du temps.	97
44	Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C ₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline (A ₁ , A ₂ et A ₃) traitées par la thermolysine à 37°C après 180 min d'incubation.	99
45	Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C ₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline (A ₁ , A ₂ et A ₃) traitées par la trypsine à 37°C après 180 min d'incubation.	99

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
I	Caractéristiques physico-chimiques des protéines sériques bovines et camelines	07
II	Teneur en protéines totales (g L^{-1}) des différentes fractions du lait étudié.	53
III	Comparaison des MM (en kDa) des protéines sériques camelines et bovines mesurées en PAGE-SDS avec celles rapportées par la littérature.	56
IV	Hydrolyse chymotrypsique des isoformes A ₁ , A ₂ et A ₃ et identification des peptides obtenus per FT-ICR-MS/MS	82
V	Proportion d'éléments de structure secondaire de l' α -La native (A ₁) et désamidée (A ₂ et A ₃).	88
VI	Paramètres therermodynamiques de l' α -Lactalbumine cameline native et désamidée.	90

Résumé

Les protéines sériques du lait camelin collecté dans la région de Ouargla ont été fractionnées par chromatographie d'échange d'anions sur DEAE Cellulose et par perméation sur Sephacryl S200 et caractérisées par leurs comportements électrophorétiques sur gel de polyacrylamide dans diverses conditions. L' α -La cameline a été isolée par FPLC sur mono Q. Cette protéine migre en une seule bande en SDS-PAGE et en deux bandes en Alkaline-PAGE.

La désamidation non enzymatique de l' α -la cameline a été mise en évidence en suivant par FPLC sur mono Q son comportement quand elle est incubée dans un tampon phosphate de sodium, aux pH (7,4 et 8,4) pendant des temps variables (0-80 h) à 37°C. Contrairement à l' α -La du lait bovin, celle provenant du lait de dromadaire, reste instable dans les conditions physiologiques à 37°C, à pH neutre (7,4) ou à pH plus basique (8,4). Nous avons montré que cette transformation chimique est séquencée avec apparition de deux nouvelles isoformes : A₂ (qui apparaît rapidement aux pH 7,4 et 8,4) et A₃ (qui n'apparaît que lentement à pH 8,4). Ce résultat est confirmé par l'étude de la modélisation moléculaire de cette protéine.

Les trois isoformes de l' α -La cameline A₁, A₂ et A₃, purifiées en deux étapes, par FPLC puis par HPLC, ont été caractérisées par 2D-PAGE et leurs pHi apparents déterminés sont estimés à 5,63 (A₁), 5,36 (A₂) et 5,05 (A₃). A l'aide de la spectroscopie (FT-ICR), les masses moléculaires suivantes ont été déterminées pour les trois isoformes : 14 421,8659 (A₁), 14 422,8569 (A₂) et 14 423,8479 Da (A₃). L'analyse par spectrométrie de masse en tandem (FT-ICR-MS/MS) a permis de montrer qu'il s'agit bien des résidus Asn¹⁶ et Asn⁴⁵ qui étaient sujets au phénomène de désamidation chimique.

La désamidation non enzymatique de l' α -La cameline rend la structure tridimensionnelle beaucoup plus stable. Cette conclusion est rendue possible par les résultats des approches spectrométrique, thermodynamique et protéolytique développées.

Mots clés : Lait camelin / α -Lactalbumine / Purification / Spectrométrie de masse FT-ICR / Electrophorèse/ Désamidation non enzymatique / Modélisation

Abstract

Camel milk whey proteins, collected from Ouargla, were fractionated by anion exchange chromatography on DEAE-Cellulose and by exclusion chromatography on Sephacryl S200, then characterized by polyacrylamide gel electrophoresis. Camel α -La was purified by FPLC on mono Q. This protein shows one band in SDS-PAGE and two bands in Alkaline-PAGE.

Non enzymatic deamidation of camel α -La was observed by FPLC after its incubation in phosphate buffer at pH 7.4 and 8.4 at 37°C as function of time. Two isoforms noted A₂ and A₃ were observed. This result was confirmed by molecular modelisation.

Three isoforms A₁, A₂ and A₃ were purified by FPLC and HPLC then characterized by 2D-PAGE. Their pI are respectively 5.63, 5.36 and 5.05. Mass spectrometry analysis was then performed to determine whether the two new isoforms were the result of a deamidation process. Isoforms A₁, A₂ and A₃ displayed an experimental molecular mass of 14 421.8659, 14 422.8569 and 14 423.8479 Da respectively.

To determine which (Asn) residues underwent a nonenzymatic deamidation process, the three purified isoforms were analyzed by tandem mass spectrometry. This analysis confirmed that A₂ corresponded mainly to the camel α -La deamidated on Asn⁴⁵ and A₃ contained camel α -La deamidated on the two residues Asn¹⁶ and Asn⁴⁵.

Spontaneous deamidation of camel α -La has for consequence to increase their thermal stability. This observation is confirmed by thermodynamic and proteolysis approaches.

Key words : Camel milk / α -Lactalbumin / Purification/ Masse spectrometry FT-ICR/ Electrophoresis/ Non enzymatic deamidation / Modelisation

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Connu surtout pour ses "vertus thérapeutiques", le lait camelin constitue depuis des temps très lointains déjà, un produit nourricier des populations vivant dans les zones arides et semi-arides qui le consomment à l'état frais ou fermenté. Même s'il possède une composition similaire à celle du lait bovin, il se singularise toutefois par son rapprochement au lait humain (du fait de l'absence dans ces deux laits d'une protéine allergène : la β -Lactoglobuline). En outre, ce lait, riche en vitamine C, possède en son sein un puissant système protecteur (Lysozyme, Lactoperoxydase, Lactoferrine...etc) qui prolonge naturellement sa conservation de quelques jours sous des températures moyennes de 30 °C.

Par ailleurs, dans de nombreux cas, les connaissances établies sur le lait de vache se sont avérées non appropriées pour rendre compte de la nature et de l'évolution des laits d'espèces voisines (brebis, chèvre, chamelle, bufflonne...). En effet des particularités apparaissent dans ces laits et incitent les chercheurs à opérer des réajustements pour pouvoir réaliser des transformations technologiques du lait de départ. Il en est ainsi du lait de dromadaire, qui malgré une bonne valeur nutritionnelle, possède des aptitudes limitées dans l'obtention de produits dérivés (fromages, beurre, crèmes glacées ...etc).

La compréhension des différentes phases de transformation ou de conservation de ce lait ne peut avoir lieu, sans une meilleure connaissance de la structure et des propriétés de ses constituants. D'autant plus que ce produit spécifiquement du terroir, est appelé à se développer et à se heurter à des procédés technologiques visant une diversification de son utilisation.

En effet, le potentiel en ce produit nourricier est loin d'être négligeable. Notre pays possède un cheptel camelin estimé à environ 340 000 têtes. La production moyenne en lait camelin est de l'ordre de 13 000 t/an, alors que la production journalière varie de 6 à 10 litres et la durée de lactation est en moyenne de 14 mois.

En plus de ces difficultés, le lait camelin est relativement peu exploré et sa fraction protéique, qui présente plusieurs caractéristiques, dont sa faible proportion en κ -caséine et sa richesse en α -Lactalbumine (α -La) (protéine lactosérique majoritaire dans ce lait), n'a pas livré tous ses secrets.

L' α -Lactalbumine du lait camelin est présente à une teneur cinq fois plus élevée que dans le lait de référence. Elle est connue pour sa haute valeur nutritionnelle, vue sa richesse en acides aminés essentiels, notamment le tryptophane. Elle joue un rôle fondamental dans la régulation de la synthèse de lactose du lait et est considérée comme une molécule anti-stress en augmentant la synthèse de sérotonine dans le sang. C'est aussi la protéine la moins allergisante du lait. De nombreux effets thérapeutiques sont attribués aussi aux peptides issus de sa protéolyse (effet anti-oxydant, anti-microbien, opioïde, anti-hypertensif...etc).

Néanmoins, nous savons que les protéines peuvent être instables dans les conditions physiologiques et peuvent être sujettes à de nombreuses modifications impliquant le changement de la nature chimique des résidus d'acides aminés.

Parmi les modifications chimiques, il y a la désamidation non-enzymatique (DNE) du résidu d'asparagine (Asn) qui peut générer de nombreux effets indésirables, telle une diminution de son activité biologique, une réduction de sa stabilité ou encore une augmentation de son immunogénicité. Cette DNE peut aussi être à l'origine de la reconnaissance, par le système immunitaire, des protéines ou des peptides désamidés comme étant des antigènes. C'est aussi une voie importante de la dégradation chimique des anticorps monoclonaux utilisés principalement dans un but thérapeutique en oncologie, ce qui affecte la stabilité et l'efficacité de nombreux produits pharmaceutiques.

Même si bon nombre de travaux sur les protéines impliquées *in vivo* dans des processus biologiques ont montré que certaines d'entre-elles subissent le phénomène de désamidation non-enzymatique, il n'en demeure pas moins que très peu d'études sont consacrées à cette transformation aux niveaux des protéines alimentaires et, particulièrement, des protéines laitières, dont le devenir au niveau du tractus digestif et l'implication de leurs peptides, générés par protéolyse et ayant subi cette modification, sur les réactions métaboliques et leurs implications physiologiques favorables ou défavorables, sont insuffisamment explorées.

Partant de ces données et sachant que la séquence primaire de L' α -lactalbumine présente deux sites potentiels de désamidation (Asn¹⁶-Gly¹⁷) et (Asn⁴⁵-Gly⁴⁶), contrairement à son homologue bovin qui ne présente aucun site de désamidation, alors que l' α -La équine présente un seul site (Asn⁴⁵-Gly⁴⁶), il nous a semblé opportun de mener des investigations pour mettre en évidence, dans un premier temps, cette modification chimique pour l' α -La cameline et essayer de déterminer, dans un second temps, si cette DNE pourrait modifier ou pas ses propriétés structurales et fonctionnelles.

Aussi, après avoir donné un aperçu des connaissances fondamentales liées à ce domaine d'étude, cette présente contribution expérimentale s'articule autour de trois chapitres complémentaires :

- le chapitre I : est consacré au fractionnement et la caractérisation des protéines sériques du lait camelin suivie par la purification par FPLC de l' α -La ;
- le chapitre II : porte sur la mise en évidence de la désamination spontanée de l' α -La et l'étude des paramètres cinétiques de cette réaction ;
- enfin, le chapitre III : a pour objectif d'étudier l'influence de la DNE sur la stabilité structurale de l' α -La par trois approches : spectrométrique (par dichroïsme circulaire), thermodynamique (par calorimétrie différentielle à balayage) et protéolytique (par hydrolyse enzymatique).

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SYNTHÈSE DES DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Aperçu sur le lait camelin

1.1.1. Le dromadaire et la production du lait

Selon des statistiques récentes publiées par la l'Organisation des Nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO, 2014), la population cameline mondiale est estimée à environ 20 millions, avec la Somalie classée en tête de liste. Cette population est confinée dans la ceinture aride et semi-aride du nord de l'Afrique jusqu'au nord-ouest du continent asiatique. Elle se scinde en deux espèces qui appartiennent au même genre *Camelus* :

- *Camelus dromedarius* : dromadaire à une seule bosse, qui vit principalement dans les secteurs arides du désert (nord et nord-est de l'Afrique) ;
- *Camelus bactrianus* : chameau à deux bosses qui peuple les régions froides de l'Asie (Yagil, 1982 ; Farah, 1996).

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

Selon les statistiques de la FAO (2014), la production laitière mondiale du lait camelin (pour les deux espèces) est estimée à environ 5,3 millions de tonnes par an dont seulement 1,3 millions de tonnes sont destinés à l'alimentation humaine, tandis que le reste est orienté vers l'alimentation du chamelon.

Actuellement, la Somalie est le plus grand pays producteur de lait de chamelle (1 100 000 tonnes/an) à l'échelle mondiale suivie par le Kenya (933 616 tonnes/an). L'Algérie est à la 12^{ème} place avec une production estimée, par la FAO (2013), à 13 000 tonnes/an (avec 344 015 têtes). Une grande partie de cette production est consommée localement par les familles des éleveurs ou par les petits chamelons. Elle n'atteint pas les marchés urbains vu que les troupeaux sont situés dans des secteurs éloignés des marchés.

1.1.2. Caractéristiques du lait camelin

1.1.2.1. Caractéristiques physico-chimiques

Le lait camelin présente une couleur blanche opaque, un gout légèrement sucré, acide et parfois même salé (Yagil & Etzion, 1980). Ceci dépend généralement du type de fourrage ingéré et de la disponibilité de l'eau (Farah, 1996 ; Khaskheli *et al.*, 2005). Le pH de ce lait varie de 6,5 à 6,7 (Mehaia *et al.*, 1995 ; Khaskheli *et al.*, 2005).

Le pH du lait camelin est similaire à celui du lait de brebis (Yagil *et al.*, 1984) mais il est légèrement inférieur à celui du lait de vache (Sawaya *et al.*, 1984). Sa densité moyenne est de 1,029 g/cm³ (Farah, 1996), identique à celle du lait bovin (1,030 g/cm³).

Laleye *et al.* (2008) ont rapporté que le lait camelin est moins visqueux que son homologue bovin (1,72 mPa s et 2,04 mPa s à 25°C) (Kherouatou *et al.*, 2003). La variation des données sur le pH, acidité, densité et viscosité peut être aussi en relation directe avec les conditions de la traite et la charge microbienne des échantillons collectés (Mehaia *et al.*, 1995).

Le lait de chamelle reste stable pendant quelques jours à température ambiante (25 à 30°C) comparativement aux laits d'autres espèces. Le pH de coagulation (5,7) est atteint après 8h à 30°C alors que le lait bovin commence à coaguler après 3h dans les mêmes conditions. Ceci est dû à la présence en son sein d'un système antimicrobien puissant (Lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase, immunoglobulines, protéose-peptones...), dont les concentrations sont plus élevées dans ce lait que dans celui des autres espèces laitières (vache, chèvre, brebis et bufflonne) (Kappeler *et al.*, 1999 ; El-Agamy, 2000 ; Konuspaveva *et al.*, 2007 ; Benkerroum, 2008). Le lait camelin pasteurisé peut être conservé sans s'altérer pendant 10 jours à 4°C (Wernery, 2008).

1.1.2.2. Composition et proportions des différents constituants

La composition globale du lait camelin a été étudiée par de nombreux auteurs (Ohri et Joshi, 1961 ; Sawaya *et al.*, 1984 ; Elamin et Wilcox, 1992 ; Mehaia *et al.*, 1995 ; Haddadin *et al.*, 2008 ; Shuiep *et al.*, 2008 ; Omer & Eltinay, 2009). Ces derniers rapportent des valeurs assez variables qui peuvent être attribuées à plusieurs facteurs (la race, l'âge, l'alimentation, l'origine géographique des échantillons...) (Khaskheli *et al.*, 2005).

L'eau est un facteur important qui affecte cette composition. Sa teneur, qui oscille entre 86 et 88%, varie selon son apport dans l'alimentation (Khan et Iqbal, 2001).

Gassem et Abu-Tarboush (2000) ont rapporté que la teneur moyenne de l'extrait sec total du lait camelin (11,9%) est légèrement inférieure à celle du lait bovin (12,3%), tandis que la teneur en d'autres composés, tels que les protéines, les lipides, le lactose et les sels minéraux reste similaire et très proche de celle du lait de référence.

Haddadin *et al.* (2008) ont observé une grande concentration en vitamines et en minéraux, ce qui fait de ce lait un véritable composant diététique. A ce propos le lait de chamelle contient relativement moins de vitamine A, B1, B2, B5, B9 et E que le lait de vache tandis que les teneurs en vitamines B6 et B12 sont assez comparables entre les deux matières alimentaires (Farah *et al.*, 1992 ; Wernery *et al.*, 2005).

La concentration en vitamines dans le lait camelin reste de l'ordre du microgramme par litre de lait, à l'exception de l'acide ascorbique qui se trouve à des teneurs nettement plus élevées (24 à 60 mg L⁻¹ contre 3 à 23 mg L⁻¹ dans le lait bovin) (Farah *et al.*, 1992 ; Haddadin *et al.*, 2008). Cette caractéristique est très bénéfique d'un point de vue nutritionnel pour les

populations des régions arides, où la faible disponibilité des fruits et des légumes est à relever dans ces milieux (Mehaia, 1994 ; Kappeler, 1998).

La matière grasse du lait camelin représente environ 1,2 à 6,4% (Konuspayeva *et al.*, 2009). Elle est dispersée sous forme de gouttelettes sphériques (globules gras) entourées par la membrane du globule gras (MGG), qui est constituée essentiellement de phospholipides et de glycoprotéines (Farah et Rüegg, 1991). Comparativement au lait bovin, la matière grasse du lait camelin est pauvre en acides gras à courtes chaînes et en carotène (Abu-Lehia, 1989 ; Stahl *et al.*, 2006). Cette faible teneur en ce dernier composé peut expliquer la couleur blanchâtre de cette matière (Abu-Lehia, 1989).

Dans ce lait, une richesse en acides gras à longues chaînes a été apportée par Konuspayeva *et al.* (2008). La teneur en acides gras insaturés, en particulier les acides gras essentiels, est estimée à 43%. Ceci reste élevé par rapport à celle présente dans le lait bovin (Sawaya *et al.*, 1984 ; Abu-Lehia, 1989 ; Haddadin *et al.*, 2008) ; alors que la teneur en acides gras saturés y est plus faible (67,7% contre 69,9% dans le lait bovin) (Konuspayeva *et al.*, 2008).

Des études sur la microstructure montrent que les globules gras présentent deux particularités :

- la première étant une fréquence plus élevée des globules de petits diamètres, variant de 2,7 à 2,9 μm (Mehaia *et al.*, 1995 ; Lopez *et al.*, 2005 ; Attia *et al.*, 2007) ;
- la seconde, une épaisseur plus importante de la MGG (Danthine *et al.*, 2000 ; Kherouatou *et al.*, 2003 ; Karray *et al.*, 2006).

La teneur en protéines totales du lait camelin varie de 2,15 à 4,90% (Konuspayeva *et al.*, 2009). Ces dernières peuvent être scindées en deux grands groupes : les caséines (CN) qui précipitent totalement à leur pH isoélectriques et les protéines lactosériques (PS), qui restent solubles à ces pH.

Les CN sont les protéines majeures du lait de mammifères. Le lait de chamelle en contient 1,63 à 2,76%, ce qui représente 52 à 87% des protéines totales (Farak et Kabary, 1992 ; Mehaia *et al.*, 1995 ; Khaskheli *et al.*, 2005).

Le lait de dromadaire est caractérisé par une composition en CN qui diffère quantitativement et qualitativement du lait bovin. Dans ce dernier, les micelles présentent un diamètre moyen de 180 nm alors que dans l'homologue camelin, la micelle peut atteindre 300 nm. Ceci constitue un des facteurs limitant pour la coagulation de ce lait (Farah et Bachman, 1987 ; Farah et Rüegg, 1989 ; Ramet, 2001).

La caséine α_{S1} (α_{S1} -CN) représente 21% des caséines totales du lait camelin (Kappeler *et al.*, 2003), ce qui est en deçà du taux atteint dans le lait de vache (36%) (Davies & Law, 1980). Sa séquence primaire étudiée par Kappeler *et al.* (1998) présente 207 résidus d'acides aminés (aa). Sa masse moléculaire (MM) est estimée à 35,5 kDa en PAGE-SDS (Farah et Farah-Riesen, 1985). Celle du lait bovin est de 22 à 25 kDa (Eigel *et al.*, 1984).

La caséine α_{S2} (α_{S2} -CN) cameline représente environ 9,5% des caséines totales. Sa séquence primaire compte 178 résidus d'aa et une MM d'environ 25 kDa. Son homologue bovin en présente 207 résidus et une MM qui oscille entre 25 et 26 kDa (Swaisgood, 1982 ; Lorient, 1991). L'absence de résidus glucidiques et la présence de deux résidus de cystéines caractérisent l' α_{S2} -CN cameline.

La caséine β (β -CN) est la caséine majeure du lait camelin. Elle représente 65% des caséines totales camelines (Kappeler *et al.*, 2003) contre 36% pour son homologue bovin (Davies & Law, 1980). La MM de la β -CN est estimée par électrophorèse PAGE-SDS, à 28,6 kDa (Mohamed, 1993), celle du bovin est évaluée à 24 kDa (Eigel *et al.*, 1984).

Sa structure primaire, riche en résidus proline, est déterminée par Kappeler *et al.* (1998). Elle compte 217 résidus d'aa. L'homologue bovin contient 209 résidus (Swaisgood, 1982 ; Lorient, 1991). La caséine β est dépourvue de résidus glucidiques et de cystéines. Comme dans le cas du lait bovin, c'est la protéine la plus hydrophobe des caséines (Larsson-Raznikiewicz et Mohamed, 1986).

La caséine κ (κ -CN) est peu présente dans le lait de dromadaire. En effet, cette protéine ne représente que 3,5% de la micelle totale de caséine (taux trois fois plus faible que dans le lait de vache). Ceci rend son observation difficile sur un gel d'électrophorèse (Farah & Farah-Riesen, 1985 ; Farah & Atkins, 1992). Néanmoins, cette protéine est assez étudiée, probablement pour son importance dans la stabilité de la micelle et son rôle dans la coagulation du lait (Ochirkhuyag *et al.*, 1997 ; Kappeler *et al.*, 1998). Sa séquence primaire présente 162 résidus d'aa pour une MM de 22,2 kDa (contre 169 résidus dans le bovin pour une MM évaluée à 19 kDa) (Minoia, 1994 ; Kappeler *et al.*, 1998).

La κ -CN est la seule caséine glycosylée. Sa partie glucidique est constituée majoritairement de l'acide N-acétyl-neuraminique (acide sialique). L'étude de Mehaia (1987) concernant sa disposition dans la micelle, a montré que 90% de cette protéine se localise à la surface externe. Schlimme (1990) a constaté une relation inversement proportionnelle entre le diamètre de la micelle de caséine et la teneur en caséine κ .

La κ -CN cameline présente un site de coupure spécifique pour la chymosine (Phe⁹⁷-Ile⁹⁸) différent de celui existant pour la κ -CN bovine (Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶) (Kappeler *et al.*, 1998). Ceci peut être dû à la présence, dans la séquence primaire de la κ -CN cameline, d'un résidu proline supplémentaire (Pro⁹⁵) susceptible de jouer un rôle primordial dans la stabilité de la structure de la κ -CN cameline (Kappeler *et al.*, 1998).

Les PS représentent 20 à 25% des protéines camelines totales (Farag & Kabary, 1992 ; Mehaia *et al.*, 1995 ; Khaskheli *et al.*, 2005). On y trouve l' α -Lactalbumine (α -La) qui reste la protéine majeure du lait camelin, l'albumine sérique ou sérum albumine (SA), la lactoferrine (LF), les immunoglobulines (Ig) et la lactophorine (également connue sous le terme PP3 ou encore GlyCAM-1). Les caractéristiques physico-chimiques des ces protéines sont récapitulées dans le Tableau I.

Tableau I : Caractéristiques physico-chimiques des protéines sériques bovines et camelines (Kappeler, 1998).

Protéines	Nombre d'acides aminés		Masse moléculaire (Da)		Point isoélectrique		Concentration (mg.L ⁻¹)	
	<i>Bovin</i>	<i>Camelin</i>	<i>Bovin</i>	<i>Camelin</i>	<i>Bovin</i>	<i>Camelin</i>	<i>Bovin</i>	<i>Camelin</i>
β-Lg	162	nd	18281	nd	4,66	nd	<4000	nd
α-La	123	123	14186	14430	4,65	4,87	600 - 1700	>5
Lactoferrine	689	689	76143	75250	8,18	8,14	140	220
Lactophorine	135	137	15304	15442	6,03	5,10	300	954
Lactoperoxydase	612	612	96569	69460	7,90	8,63	30	nd
WAP	nd	117	nd	12564	nd	4,70	nd	157
PGRP	nd	172	nd	19143	nd	8,73	nd	370

nd : Non déterminé

WAP : Protéines sériques acides ou *Whey Acide Protein*.

PGRP : Protéine de reconnaissance du peptidoglycane ou *Peptido Glycan Recognition Protein*

Comme dans le lait humain, la particularité de ce lait est l'absence en son sein de la β -Lactoglobuline (β -Lg), protéine lactosérique majoritaire du lait des autres espèces (El-Agamy *et al.*, 2009 ; Ochirkhuyag *et al.*, 1998 ; Liberatori *et al.*, 1979).

Certaines propriétés des PS camelines restent différentes de celles rencontrées dans le lait des autres. Ainsi, il a été constaté que la stabilité thermique du lait camelin est en relation avec sa composition protéique. Le lait camelin montre une faible stabilité lors d'un traitement thermique à 140°C, ceci est en relation avec l'absence de la β -Lg et sa faible teneur en κ -CN (Farah & Atkins, 1992 ; Al-Saleh, 1996). Les PS camelines prises individuellement montrent une meilleure stabilité au traitement thermique par rapport à celles du lait de vache ou de bufflonne (Al-Saleh, 1996 ; El-Agamy, 2000 ; Wernery, 2006).

1.2. Spécificités de l' α -Lactalbumine cameline

1.2.1. Structure primaire et second-tertiaire

L' α -La est une protéine globulaire compacte de la famille des métalloprotéines capable de se lier à plusieurs ions métalliques, principalement le calcium (Ca^{2+}), mais également aux ions Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Na^+ , K^+ et Al^{3+} (Ren & Stuart, 1993; Velusamy & Palaniappan, 2011).

L' α -La se trouve dans les glandes mammaires et sous forme soluble dans le lait de diverses espèces. C'est la protéine majeure du lactosérum camelin (Beg *et al.*, 1985). Sa teneur varie de 2,2 à 3,5 g/l (El-Hatmi, 2006). Sa séquence primaire comprend 123 résidus d'acides aminés. Elle a une MM de 14,6 kDa (Beg *et al.*, 1985 ; Beg, 1986) et un pH isoélectrique (pHi) de 5,01. Elle présente une forte similitude avec les protéines homologues des laits de vache, de chèvre et de femme. Sa séquence primaire est présentée sur la figure 1.

L' α -La cameline, comme celle d'autres espèces contient 8 résidus de cystéines tous impliqués dans la formation de ponts disulfures. Le lait camelin contient, selon Conti *et al.* (1985) deux formes d' α -La, notées A et B. Les deux formes ont des masses moléculaires similaires mais des pHi différents (5,1 et 5,3 respectivement).

La structure secondaire de l' α -La bovine est faiblement organisée. Elle comprend 14% de feuillets β , 26% d'hélices α et 60% de formes non structurées (Fox, 1989). Sa structure tertiaire est organisée en deux domaines : un large domaine en hélices α et un petit domaine en feuillet β (Pike *et al.*, 1996 ; figure 2).

Le domaine α est formé par les régions N- et C-terminales de la chaîne polypeptidique (résidus 1-34 et 86-123). Il contient quatre hélices α : hélice A (résidus 5-11), B (23-34), C (86-99) et D (105-109), et 3 hélices 3_{10} (12-16, 101-104 et 115-119).

α -La cameline	KQFTKCKLSD	ELKDNVHG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSNVGNREY	GLFQINNKIW	CRDNENLQSR
α -La Guanaco	KQFTKCKLSD	ELKGNVHG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSNVGNREY	GLFQINNKIW	CIDNENLQSR
α -La Lama	KQFTKCKLSD	ELKGNVHG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSNVGNREY	GLFQINNKIW	CLDNENLQSR
α -La A équine	KQFTKCELSQ	VIKSMGYKG	VTLPWICTI	FHSSGYDTQT	IVKNGKTEY	GLFQINNKMW	CRDÑQLPSR
α -La AB asinienne	KQFTKCELSQ	VIKSMGYKG	VTLPWICTI	FHSSGYDTQT	IVKNGKTEY	GLFQINNKMW	CRDÑQLPSR
α -La A Humaine	KQFTKCELSQ	LLKIDIDYGG	IALPELICIM	FHTSGYDTQA	IVENNESTEY	GLFQISNKLW	CKSSQVPQSR
α -La B bovine	EQLTRGEVFR	ELKDLKGYG	VSLPEWVCTT	FHTSGYDTQA	IVQNDSTEY	GLFQINNKIW	CKDDQPHSS
α -La A rate	TELTRCKVSH	AIKIDIDYQG	ISLLEWACVL	FHTSGYDTQA	VVNDNGSTEY	GLFQISDRFW	CKSSEFFPESE
α -La cameline	NICDISCDKF	LDDDLDDKM	CAKKILDKEG	IDYWLAKHKL	CSEKLEQWQC	EKW	<i>P00710</i>
α -La Guanaco	NICDISCDKF	LDDDLDDIM	-----	-----	-----	-----	<i>Q97723</i>
α -La Lama	NICDISCDKF	LDDDLDDIM	CAKKILDKEG	IDYWLAKHKL	CSEKLEQWQC	EKW	<i>(Saadaoui et al., 2014)</i>
α -La A équine	NICGISCDKF	LDDDLDDVM	CAKKILDSEG	IDYWLAKHKL	CSEKLEQWLC	EEL	<i>P08334</i>
α -La AB asinienne	NICGISCDKF	LDDDLDDVM	CAKKILDSEG	IDYWLAKHKL	CSEKLEQWLC	EEL	<i>P28546</i>
α -La A Humaine	NICDISCDKF	LDDDIIDDIM	CAKKILDKG	IDYWLAKHAL	CEKLEQWLC	EKL	<i>P00709</i>
α -La B bovine	NICNISCDKF	LDDDLDDIM	CVKKILDKVG	INVWLAKHAL	CSEKLDQWLC	EKL	<i>P00711</i>
α -La A rate	NICGISCDKL	LDELDDDDIA	CAKKILAIG	IDYWKAYKPM	CSEKLEQWRC	EXP	<i>P29752</i>

123

100

Figure 1. Alignement des structures primaires des α -lactalbumines de diverses espèces. Les numéros d'accèsion dans *SwissProt* sont en italiques

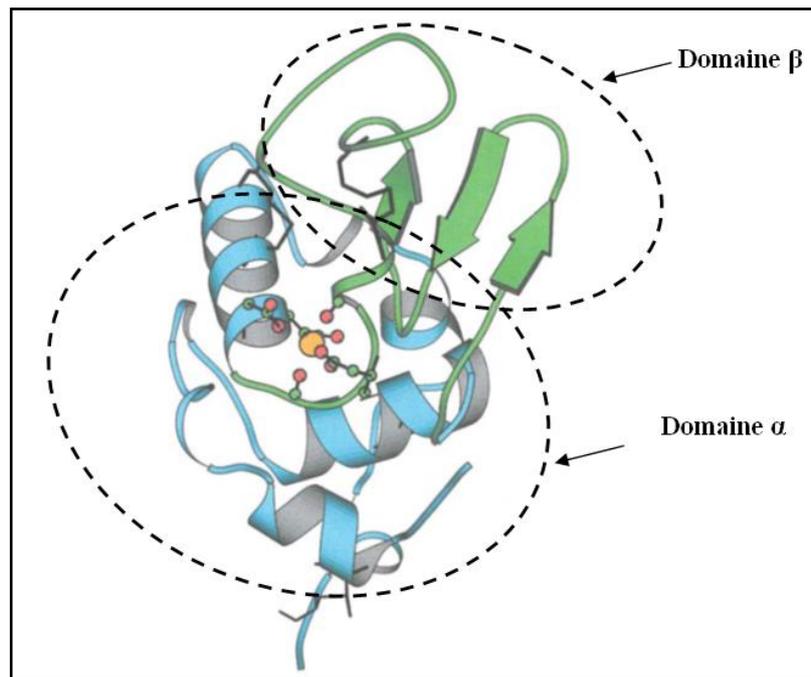


Figure 2. Structure de l' α -lactalbumine (Bushmarina *et al.*, 2005).

Le domaine β est en vert et le domaine α en bleu. Les ponts disulfures sont représentés par des traits noirs. Le calcium est indiqué par un rond jaune et les chaînes latérales des acides aminés qui le stabilisent au sein de la structure sont aussi représentées.

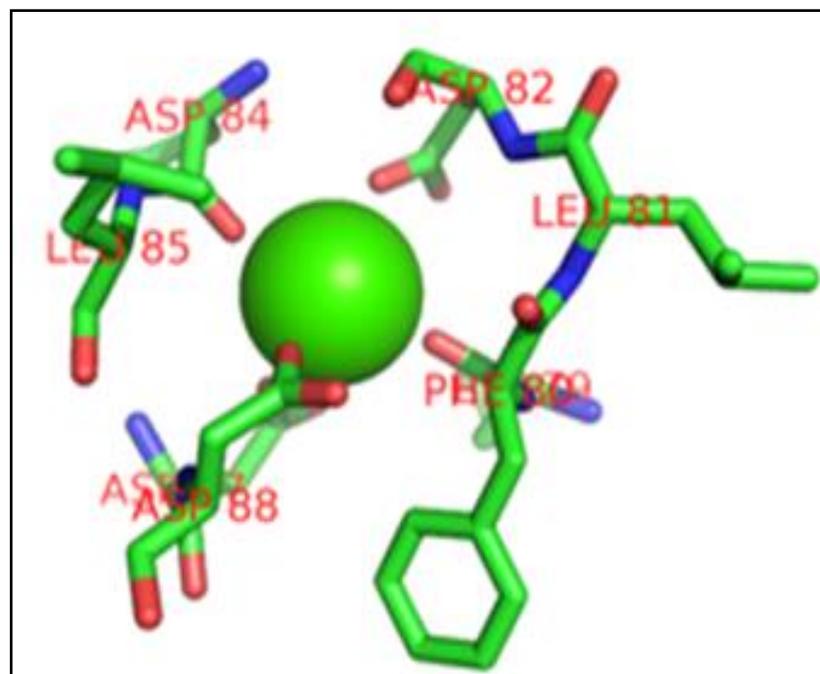


Figure 3. Les résidus d'acides aminés constituant le site de fixation du calcium (Pike *et al.*, 1996).

Le domaine β est formé par la section centrale de la chaîne polypeptidique (des résidus 35-85) et contient un feuillet β antiparallèle à trois brins (41-43, 48-50, 55-56), une petite hélice 3_{10} (76-82) et une grande boucle. Les domaines interagissent entre eux par des liaisons hydrogène entre le groupe hydroxylique du phénol de Tyr¹⁰³ (domaine α) et l'oxygène de l'amide de Gln⁵⁴ et l'amide de la chaîne principale d'Asn⁵⁶ (domaine β).

La structure de la protéine est aussi stabilisée par quatre ponts disulfures (Permyakov & Berliner, 2000) : deux dans le domaine α (Cys²⁸-Cys¹¹, Cys⁶-Cys¹²⁰), un dans le domaine β , (Cys⁶¹-Cys⁷⁷) et un pont qui connecte l'hélice C du domaine α avec l'hélice 3_{10} du domaine β .

Un site de liaison du Ca²⁺ de haute affinité se trouve dans la boucle qui connecte les deux domaines (78-89) et cette liaison assure la stabilisation de la structure native de l' α -La (Kuwajima, 1989). Ce site est constitué par une partie de la chaîne assez longue (résidus 79-88).

Le Ca²⁺ est coordonné selon une structure pentagonale bipyramidale tordue par les groupes carboxyliques des chaînes latérales de trois résidus aspartates (Asp⁸², Asp⁸⁷ et Asp⁸⁸), deux atomes d'oxygène du squelette (Lys⁷⁹ et Asp⁸⁴), et par deux atomes d'oxygène de la molécule d'eau (Anderson *et al.*, 1997 ; figure 3). Ce site n'appartient pas à la famille des sites de liaison de calcium de type « *EF hand* » mais à un nouveau type de site « le coude » (Desmet et van Cauwelaert, 1988).

La constante de dissociation de l'ion Ca²⁺ est de l'ordre de 10⁻⁷-10⁻⁸ M (Permyakov *et al.*, 1981; Murakami *et al.*, 1982). Cette valeur dépend de la concentration d'autres cations monovalents et divalents présents dans la solution, du pH et de la température (Grico & Remeta, 1999). L' α -La existe sous forme de monomère au pH physiologique (Fox, 1989).

La molécule d' α -La se trouve principalement sous sa forme native (*holo- α -La*), décalcifiée (*apo- α -La*) ou sous une forme intermédiaire appelée « *molten globule state* ; MG». L'*apo- α -La* est obtenue soit par l'utilisation d'agents chélateurs ou séquestrant du calcium, soit par une augmentation de la température ou une diminution du pH autour du pHi de la protéine.

Ces modifications structurales sont notamment engendrées par les répulsions électrostatiques dues à l'ionisation de groupements carboxyles et tyrosyles dans la boucle de fixation du calcium (Griko *et al.*, 1994 ; Forge *et al.*, 1999 ; McGuffey, 2004). Cette forme est plus flexible, plus hydrophobe et moins soluble que la forme native (Bramaud *et al.*, 1997; Brinkmann *et al.*, 2013). L'étude de l'état *molten globule* par dichroïsme circulaire (DC) dans l'UV lointain montre que cet état a une structure secondaire similaire à celle de l'état natif.

Notons que, le DC est une technique souvent utilisée pour mettre en évidence les structures secondaire et tertiaire des protéines. Cette technique utilise peu de matériel qui n'est pas détruit en ayant recours à ce procédé. Les changements causés par les conditions ambiantes de pH, d'agents dénaturants et de températures peuvent y être facilement étudiés.

Les résidus aromatiques Trp et Tyr sont responsables du signal spectral de DC enregistré dans l'UV proche (entre 260 et 300nm). Des variations du spectre de DC dans l'UV proche mettent donc en évidence des modifications du micro-environnement des résidus Tyr et Trp, positionnés de manière spécifique dans la structure tertiaire de la protéine native (Dolgikh *et al.*, 1985; Vanderheeren et Hanssens, 1994). Les éléments de structure secondaire d'une protéine sont responsables du signal de DC enregistré dans l'UV lointain.

Pour suivre les modifications des éléments de structure secondaire (particulièrement les structures en hélices α) et tertiaire de l' α -La par DC, les auteurs suivent à la fois la variation du signal à 222 nm pour la structure secondaire et à 270 nm pour la structure tertiaire (Vanderheeren et Hanssens, 1994 ; Griko *et al.*, 1994 ; Demarest *et al.*, 1999 ; 2001).

1.2.2. Rôle du calcium dans la stabilité structurale

Le calcium a un rôle structural très important pour la stabilité et le repliement de l' α -La (Griko *et al.*, 1994). La protéine native contient un ion de calcium par molécule mais le rôle physiologique de cette liaison n'est pas encore connu.

A la température ambiante, la liaison du calcium entraîne des changements dans la structure tertiaire mais pas dans la structure secondaire de l' α -La (Permyakov *et al.*, 1981 et 1985 ; Anderson *et al.*, 1997 ; Hendrix *et al.*, 2000).

La stabilité de la forme « *apo* » dépend de la force ionique de la solution, qui peut être changée par l'addition de NaCl, KCl ou Tris-HCl (Desmet *et al.*, 1987; Griko et Remeta 1999). La stabilité de la forme « *holo* » dépend de la concentration du Ca^{2+} dans le milieu. En effet, bien que la constante de dissociation du Ca^{2+} pour l'état natif soit de l'ordre de 10^{-8} M, l'ajout de 10 mM de Ca^{2+} est nécessaire pour la stabilisation de la protéine. Dans ces conditions, la protéine « *holo* » passe en état MG vers 70°C.

La forme MG est une conformation intermédiaire de l' α -La, compacte et très hétérogène. Elle possède un domaine d'hélices α toujours très structuré (*native like*), mais le domaine composé de feuillets β est en majorité dénaturé (Kuwajima, 1996 ; Permyakov & Berliner, 2000).

La déstabilisation de la forme « *apo* » est liée à la présence de charges négatives non compensées dans le site de liaison du Ca^{2+} . La compensation partielle de ces charges stabilise la protéine, ce qui explique l'effet de la force ionique sur la protéine, mais leur neutralisation complète n'est possible qu'en présence du Ca^{2+} avec les liaisons bien coordonnées (Griko et Remeta, 1999 ; Wijesinha-Betoni *et al.*, 2001). C'est pour cela que la protéine est déstabilisée à pH acide.

La compétition entre les protons et le Ca^{2+} amène à une décalcification de la protéine. Le passage à la conformation MG se produit généralement sous trois conditions : soit la présence d'agents dénaturants en concentration modérée tels que l'urée et le chlorhydrate de guanidine ; un faible pH menant à la dénaturation acide de la protéine ou le retrait du calcium à pH neutre et à une concentration faible en sel (Kuwajima, 1996 ; McGuffey, 2004).

1.2.3. Propriétés biologiques

L' α -La est une protéine pourvue d'une excellente valeur nutritionnelle. L' α -La humaine présente une teneur élevée en tryptophane (Trp) et cystéine (Cys) qui sont des acides aminés essentiels et des précurseurs de la synthèse de la mélatonine et du glutathion, respectivement (Kelleher *et al.*, 2003).

Le Trp a démontré des effets positifs sur le développement du cerveau et du système nerveux des nouveau-nés. Ainsi, Markus *et al.* (2002) ont montré qu'un apport régulier d' α -La humaine chez des sujets adultes permettait d'augmenter les quantités plasmatiques de Trp, améliorant ainsi certaines fonctions neurologiques (l'attention, les performances cognitives, la vigilance matinale... etc). De ce fait, l' α -La joue le rôle d'une molécule anti-stress.

L' α -La possède également une bonne digestibilité et un faible pouvoir allergène (Gurgel *et al.*, 2001; Velusamy & Palaniappan, 2011). Les effets bénéfiques, sur la santé humaine, attribués à la consommation de l' α -La peuvent être subdivisés en trois groupes : (i) des effets liés à la protéine elle-même sous sa forme native, (ii) ceux liés aux peptides issus de l'hydrolyse enzymatique partielle de l' α -La et (iii) ceux liés à la composition en acides aminés issus de la digestion totale de cette protéine.

La principale fonction de l' α -La est qu'elle joue le rôle de facteur de régulation dans la synthèse du lactose (Ramakrishnan *et al.*, 2002). Elle se lie à l'enzyme β -1,4-galactosyltransférase (GT) pour former le complexe lactose synthase qui est essentiel à la formation de lactose (Hill & Brew, 1975 ; Velusamy & Palaniappan, 2011).

La lactose synthase est une enzyme constituée de deux protéines : la GT et l' α -La qui s'adsorbe à la première et modifie sa spécificité. La GT seule catalyse le transfert du galactose de l'UDP-galactose vers des glycoprotéines (en particulier la N-acétyl-D-glucosamine) pour former la lactosamine (figure 4). La GT peut également catalyser aussi le transfert de galactose vers le glucose libre pour former le lactose. Cependant, la GT seule est très peu active avec le D-glucose comme accepteur, car sa constante d'affinité (K_M) pour le D-glucose est très élevée. Par contre, lorsque le complexe avec l' α -La est formé, le K_M pour le glucose diminue d'un facteur 1000, ce qui entraîne la synthèse de lactose (Ramakrishnan *et al.*, 2002).

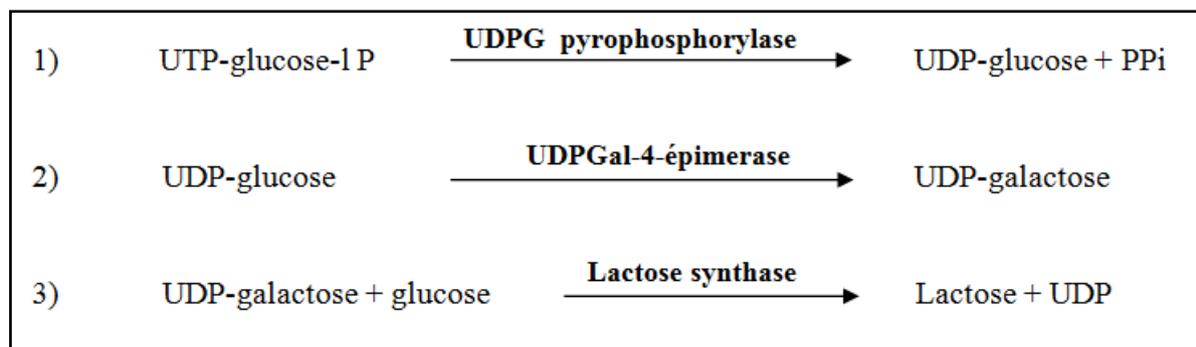


Figure 4 : Etapes réactionnelles de la synthèse du lactose (Hill & Brew, 1975).

En plus de son rôle majeur dans la synthèse du lactose, il a également été montré et durant ces dix dernières années, l'implication de l' α -La humaine dans la mort des cellules tumorales par la voie apoptotique en laissant intactes les cellules normales (Hakansson *et al.*, 1995 ; Svensson *et al.*, 1999 & 2000 ; Kohler *et al.*, 2001).

L' α -La humaine exerce cette fonction quand elle est dépourvue de son calcium et qu'elle adopte une structure de type MG. Dans ces conditions, elle interagit et forme un complexe avec l'acide oléique dénommé HAMLET (*Human α -lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells*) (Svensson *et al.*, 1999 ; Mok *et al.*, 2007).

De plus l' α -lactorphine, un tetrapeptide opioïde issu de l' α -La, a permis de diminuer la pression sanguine sur un modèle de rats hypertensifs (Nurminen *et al.*, 2000). L' α -La exerce aussi un effet protecteur contre les problèmes gastriques induits par l'alcool et le stress (Matsumoto *et al.*, 2001). Ainsi, il a été montré que le lait et le calcium protègent les muqueuses gastro-intestinales contre les ulcères (Koo, 1994).

Matsumoto *et al.* (2001) ont mis en évidence que seule l' α -La est responsable de cet effet. Il apparaît donc que l' α -La présente plusieurs fonctions biologiques qui dépendent des conformations qu'elle adopte et des cofacteurs qu'elle lie.

1.2.4. Stabilité thermique

La stabilité d'une protéine peut être définie comme étant sa capacité à conserver la structure tridimensionnelle d'une chaîne polypeptidique dans certaines conditions plus ou moins extrêmes (chaleur, pH, pression, effet d'agent chimique ou physique...etc).

La dénaturation et la stabilité sont étroitement liées car la rupture de la structure native d'une protéine est le seul moyen d'évaluation quantitative de sa stabilité. Néanmoins, l'étude de cette dernière est relativement complexe et plusieurs approches ont été utilisées pour rendre compte des transformations qui ont lieu dans ce processus de « formation/déformation » de la forme native des protéines.

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, pour *Differential Scanning Calorimetry*) permet la détection rapide et en temps réel de la variation de la chaleur libérée (processus exothermique) ou absorbée (processus endothermique) par l'échantillon analysé, comparativement à une référence.

C'est ainsi, que plusieurs auteurs (Relkin *et al.*, 1993 ; Yutani *et al.*, 1992 ; Corredig et Dalgleish, 1995 ; Boye *et al.*, 1997) ont utilisé la DSC pour déterminer les températures de dénaturation globale de l' α -La bovine.

Contrairement au DC ou à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la DSC est une technique qui ne permet pas de connaître précisément la température de dénaturation des structures secondaire et tertiaire d'une protéine. Elle permet cependant d'obtenir la température à partir de laquelle un changement conformationnel est observé dans la protéine. Aussi, la température de transition de l' α -La déterminée par DSC correspond à la température entraînant une modification structurale de la protéine.

Le profil de dénaturation thermique de l' α -La bovine a été étudié à plusieurs reprises, principalement à l'aide de la méthode de DSC (figure 5). L' α -La bovine présente un changement de conformation débutant à une température de 58°C à pH 7,0 (Caussin & Bouhallab, 2004). La dénaturation survient ensuite par un traitement thermique de quelques minutes à des températures de 65-70°C à son point isoélectrique (pHi de 4,1 à 4,3), ce qui entraîne la précipitation de la protéine (De Wit, 1989 ; Robin *et al.*, 1993).

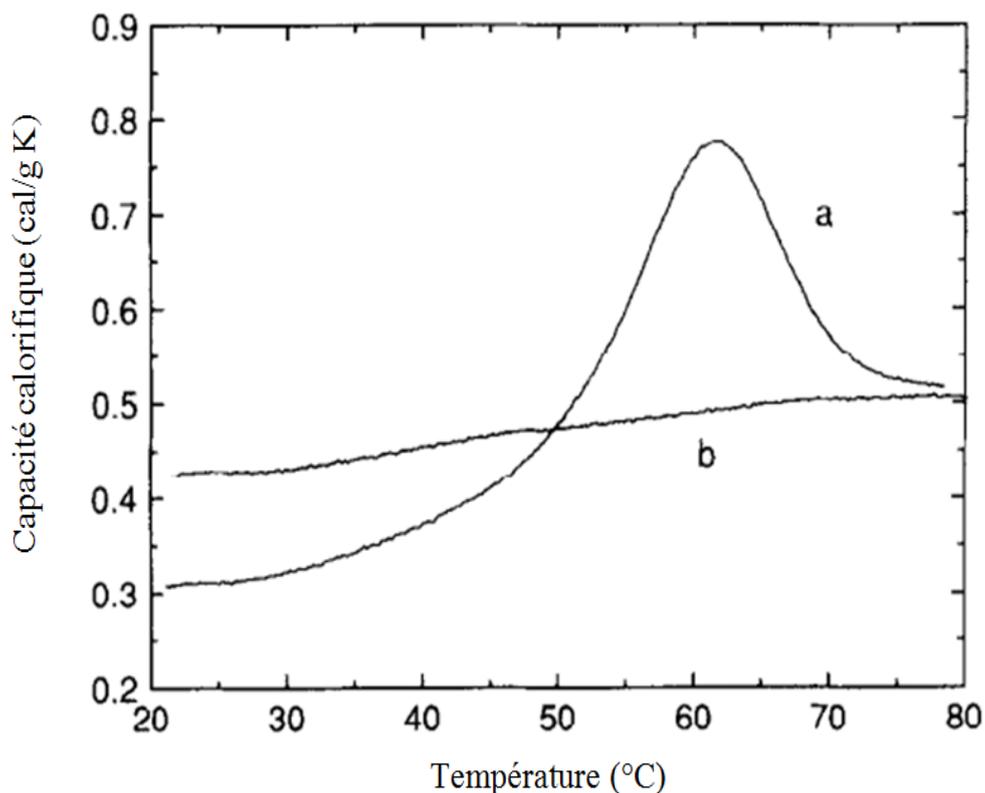


Figure 5. Courbes de capacité calorifique, à pH 7,6, des formes *holo* pour la courbe a et *apo* pour la courbe b de l' α -Lactalbumine bovine (Yutanit et Ogasahara, 1992).

À pH 6,5, L' α -La se dénature à des températures aussi basse que 62°C et perd aussi son ion calcium (De Wit, 1989 ; Goff et Hill, 1993; Robin *et al.*, 1993). L' α -La a la particularité de retrouver sa forme native suite à un refroidissement d'où sa réputation d'être une protéine très résistante à la dénaturation. Cette renaturation est de l'ordre de 80-90% pour l'*holo*- α -La et d'environ 50% pour l'*apo*- α -La.

Des études de solubilité ont démontré que suite à l'augmentation de la température de 20°C à 110°C, 85% de l' α -La était dénaturée, mais de façon irréversible (Jelen et Rattray, 1995).

La facilité de cette protéine à retrouver sa forme native réside dans sa petite structure (seulement 123 résidus) et dans ses quatre ponts disulfures qui limitent les changements de conformation (Jelen et Rattray, 1995). La dénaturation devient irréversible à des traitements thermiques au-delà de 10 min à 100°C, entraînant le largage de Ca^{2+} et la formation d'agrégats protéiques de grosse taille. L'*apo- α -La* est beaucoup plus sensible à la chaleur. Sa température de dénaturation avoisine les 42-44°C à pH 7,0.

1.3. Désamidation non enzymatique des protéines

1.3.1. Définition et conditions de réalisation

Les protéines peuvent être altérées par différentes modifications post-traductionnelles comme le clivage des chaînes polypeptidiques, la désamidation, la glycosylation, l'oxydation et la phosphorylation. Ces modifications créent souvent un changement conformationnel qui peut aboutir à une altération de la fonction de la protéine (Robinson et Robinson, 2004). Ces modifications sont considérées, au cours de l'évolution, comme une adaptation des êtres vivants. Elles jouent un rôle important dans la régulation en agissant comme des molécules horloges qui régulent la durée de vie des protéines.

La désamidation non enzymatique des protéines et des peptides est l'une des plus importantes modifications chimiques non enzymatique qui a été décrite. Elle a fait l'objet, pendant plusieurs années, de nombreux articles de recherche dans divers domaines tels la biochimie, la biologie moléculaire et la neurobiologie. D'autres domaines d'application s'y intéressent aussi, telle la pharmacologie, pour l'élaboration des préparations médicamenteuses et l'agro-alimentaire, pour l'amélioration des propriétés fonctionnelles des protéines alimentaires (Shih et Kalmar, 1987).

Contrairement aux autres modifications, qui sont le résultat d'une action enzymatique ou dues aux conditions environnementales, la désamidation non enzymatique est une simple réaction hydrolytique qui nécessite seulement la présence de molécules d'eau.

Cette réaction est décrite comme la perte de la fonction amide d'un résidu glutaminyle (Gln) ou asparaginyne (Asn) aboutissant à la libération d'ammoniac et transformant ces acides aminés en acides glutamique (Glu) et aspartique (Asp). C'est la raison pour laquelle la désamidation spontanée est une réaction difficile à détecter.

La transformation des résidus Gln et Asn présente une demi-vie qui varie de quelques heures jusqu'à plus de 100 ans à 37°C (Wright et Robinson, 1982). La désamidation du résidu Gln est considérée comme étant beaucoup plus lente que celle du résidu Asn (Robinson et Rudd, 1974). Ce phénomène peut être expliqué par la nature de la chaîne latérale du résidu Asn et Gln : la distance entre le -NH- de la liaison peptidique avec le NH_2 du groupement amide est plus importante pour le résidu Gln, vu la présence d'un groupement méthyle CH_2 supplémentaire, ce qui empêche la formation d'une liaison hydrogène stable (Wright et Robinson, 1982).

1.3.2. Mécanisme de la désamidation non enzymatique

La désamidation des protéines et des peptides est une réaction courante qui a été rapportée chez plus de 200 types de protéines et peptides naturels (Robinson et Robinson, 2004). Le résidu Gln peut être désamidé par voie enzymatique sous l'action de glutaminases et de transglutaminases. Cependant, selon Robinson et Robinson (2004), il n'existe pas d'exemple connu de désamidation enzymatique de résidu Asn au sein d'un peptide ou d'une protéine et la désamidation non enzymatique est la seule voie de désamidation pour ce résidu.

Le mécanisme de la désamidation non enzymatique (Figure 6) a été décrit par Robinson et Rudd (1974) et Wright (1991). Il se déroule en deux grandes étapes :

- la première consiste en la formation d'un cycle imide (L-succinimide). Celui-ci 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 de pH variant de 4,0 à 4,5, mais qui se décompose aussi vite qu'il s'est formé pour des pH plus élevés ;
- la deuxième étape consiste en l'hydrolyse du cycle imide, ce qui génère au sein de la chaîne peptidique la formation d'un résidu L-isoAsp (75% de probabilité de formation) ou L-Asp (25% de probabilité de formation ; Xie et Schowen, 1999). L'apparition d'un résidu isoAsp introduit une liaison β -amide branchée sur le groupement β -carboxylique du résidu isoAsp, ce qui provoque un changement dans la structure des peptides et des protéines qui subissent une désamidation.

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 (Clarke, 1987). Le résidu Asn ou Asp forme un succinimide intermédiaire (Stephenson et Clarke, 1989) qui s'hydrolyse en donnant soit un résidu d'isoaspartate, soit un résidu d'aspartate, dans un rapport d'environ 2:1.

1.3.3. Importance de l'eau dans le mécanisme de désamidation

Tous les mécanismes de désamidation non enzymatique (catalyse acido-basique ou formation d'intermédiaire succinimide) nécessitent la présence d'une molécule d'eau. Dans un peptide, l'accès de la molécule d'eau à la fonction amide est plus facile, comparativement à une structure protéique plus stable, où la pénétration de l'eau au cœur de cette molécule reste limitée, ce qui a une influence sur la vitesse et le taux de la réaction de désamidation.

De ce fait, la désamidation non enzymatique des résidus Asn et Gln présents au cœur de la protéine est limitée, contrairement à ceux présents en surface. Ces derniers, sont en contact direct avec les molécules d'eau et sujets souvent à cette modification.

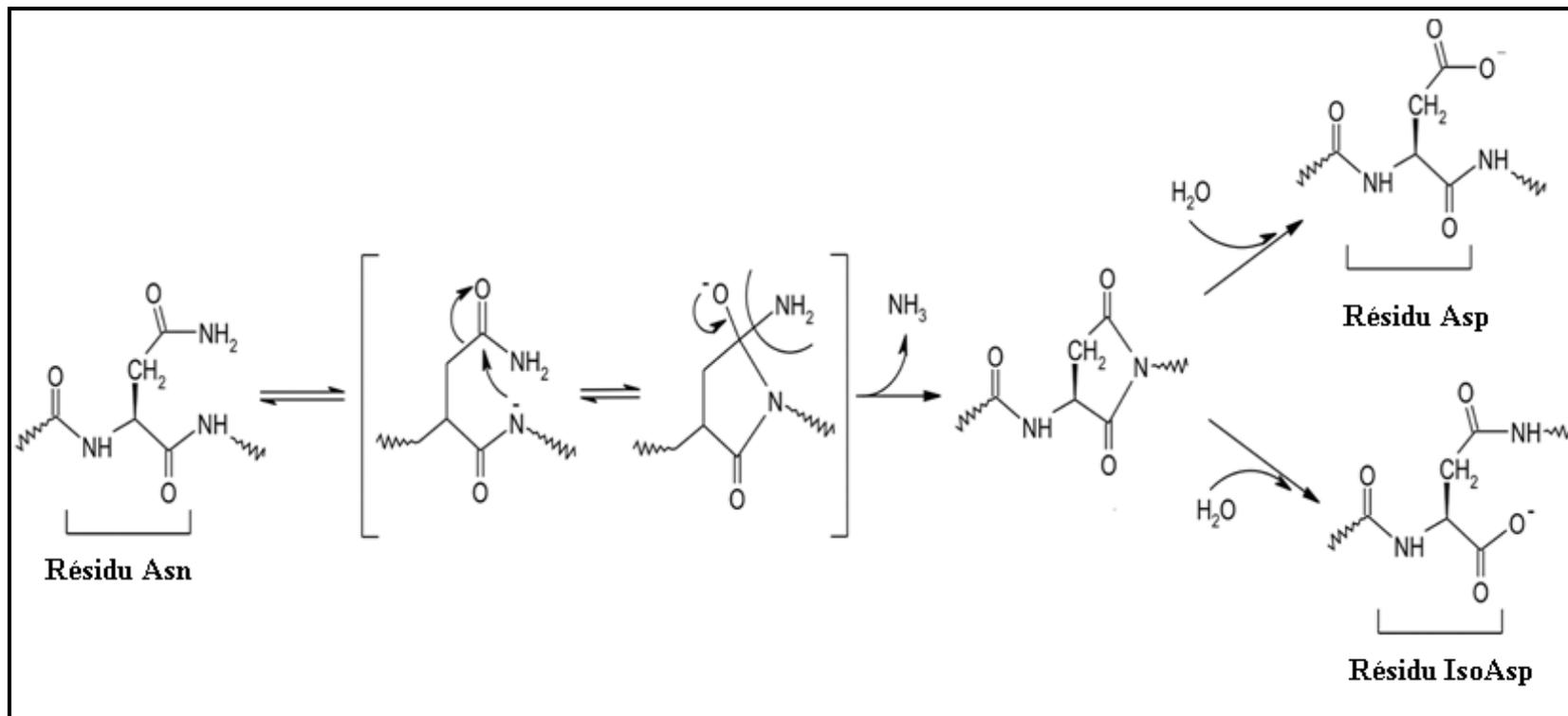


Figure 6. Mécanisme de la désamidation non enzymatique du résidu asparagine à pH>5 (Noriyoshi *et al.*, 2015).

La vitesse de désamidation non enzymatique, influencée par l'accès des molécules d'eau aux fonctions amide des résidus Asn et Gln, peut aussi être influencée par l'état statique de la structure protéique. De ce fait, les résidus Asn et Gln peuvent se retrouver en surface et devenir accessibles au solvant lors d'un mouvement dynamique de la molécule et un changement de configuration.

1.3.4. Importance de la réaction de désamidation non enzymatique

La désamidation non enzymatique des résidus Asn et Gln présents dans des séquences polypeptidiques a un intérêt biologique et physiologique important, car cette réaction produit souvent des changements structuraux. Ainsi l'étude des divers aspects de la désamidation spontanée des peptides et des protéines et leurs conséquences sur notre système physiologique a intéressé au plus haut point les chercheurs.

Les travaux antérieurs de Robinson *et al.* (1970) ont abouti aux premières hypothèses relatives au rôle des protéines désamidées dans l'expression de la durée de vie *in vivo* des protéines, car certaines d'entre-elles ont montré une sensibilité accrue à l'action des protéases par rapport à leur forme native.

Les travaux de Nilsson *et al.* (2002) montrent que le processus de désamidation joue un rôle important dans le phénomène de vieillissement et vise à limiter la durée de vie des protéines cellulaires sujettes au mauvais repliement responsable de nombreuses maladies (Robinson et Robinson, 2001). Le vieillissement cellulaire a largement été rapporté dans le phénomène de désamidation non enzymatique (Squier, 2001), car les protéines semblent accumuler des résidus isoAsp au cours du vieillissement (Desrosiers et Fanéus, 2011). Des études montrent que le traitement des érythrocytes avec le tert-butylhydroperoxyde (TBHP), un puissant agent oxydant, induit la formation de résidus isoAsp (Ingrosso *et al.* 2002).

L'apparition d'un résidu isoAsp fait que la désamidation interviendrait comme une horloge moléculaire dans la régulation de processus physiologiques, notamment le « *turn-over* » des protéines (comme par exemple le cytochrome c ou l'aldolase ; Robinson et Robinson, 2004). Pour beaucoup de protéines, la formation de résidu isoAsp peut aussi conduire à une perte d'activité (comme c'est le cas pour la calmoduline, le facteur de croissance épidermique et la ribonucléase) tandis que l'activité d'autres protéines ne semble pas être affectée. Ce qui est le cas pour l'hormone de croissance humaine (Teshima *et al.*, 1995).

1.3.5. Influence de divers facteurs sur la cinétique de désamidation

La désamidation des résidus d'asparagine et l'isomérisation des résidus d'acide aspartique sont de bons exemples de modifications non enzymatiques qui affectent les fonctions des protéines, en formant des résidus L-isoaspartatyls anormaux. La vitesse de désamidation de l'Asn est déterminée génétiquement et le temps de demi-vie du résidu au sein d'une protéine varie de 1 jour à plus de 30 ans selon la nature des résidus voisins (Robinson et Robinson, 2004).

Les études structurales menées sur la désamidation spontanée *in vitro* ont permis de déterminer l'influence de certains paramètres et facteurs environnementaux comme le pH, les ions composants le tampon, la force ionique et la température sur la désamidation de l'Asn. La cinétique de désamidation des fonctions amides dépend aussi de la structure et le temps de demi-vie de la protéine cible (Robinson, 2002).

1.3.5.1. Effet du pH

Dans un environnement de pH neutre ou basique, les résidus Asn et Asp sont enclins à subir des réactions chimiques spontanées, notamment la désamidation du résidu Asn qui produit un mélange d'isomères acides, contenant des résidus Asp et isoAsp. Le mécanisme de désamidation non enzymatique est sensible au pH du milieu de solubilisation de la protéine ou du peptide.

Patel et Borchardt (1990) ont étudié l'effet du pH sur la dégradation des résidus Asn et Asp dans un intervalle de pH variant de 1 à 12. Les résultats 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 (Chi *et al.*, 2003). 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 (Xie et Schowen, 1999).

La réaction de désamidation est une catalyse basique, sa vitesse est dépendante de la concentration en ions hydroxyde [OH⁻] présent dans l'environnement. Pour des pH variables de 5 à 8, l'ionisation de la liaison peptidique augmente, ce qui augmente la vitesse de désamidation du résidu Asn (Wakankar et Borchardt, 2006). Cette réaction explique que l'asparagine soit davantage susceptible à la désamination spontanée à pH neutre ou alcalin que la glutamine.

Le pH alcalin semble avoir un effet positif sur la réaction de désamidation, cette dernière est favorisée pour des peptides contenant Gln dans leur séquence (Scotchler et Robinson, 1974).

Des valeurs de pH acides ont été souvent utilisées notamment pour les protéines alimentaires, celles-ci se désamident *via* une hydrolyse directe de la liaison peptidique. Cependant, il est bien établi que la réaction de désamidation peut avoir lieu aussi à des valeurs de pH alcalin, et ce, par une attaque intramoléculaire de l'azote de la liaison peptidique sur le carbone de la fonction carbonyle (Stephenson et Clarke, 1989). Cette attaque intramoléculaire aboutit à la formation d'un intermédiaire succinimide instable qui peut subir une hydrolyse spontanée, aboutissant à la formation de peptides normaux ou d'isopeptides (Wright, 1991).

La formation de cet intermédiaire succinimide peut promouvoir aussi la racémisation d'un carbone, aboutissant à la génération d'isomères de la série D.

En résumé, deux cas de figure peuvent être retenus sur la réaction de désamidation spontanée en fonction du pH du milieu (figure 7) :

- à pH proche de la neutralité ou à pH alcalin : la concentration en OH⁻ dans l'environnement favorise l'ionisation de l'azote de la liaison peptidique, cette ionisation accélère la formation d'un intermédiaire imide cyclique très instable ;
- à pH acide (pH < 4), le résidu Asn subit une hydrolyse directe de la chaîne de côté amide, cette hydrolyse est plus favorable que la formation d'imide cyclique (Patel et Borchardt, 1990).

1.3.5.2. Effet de la température

De nombreuses études ont montré que le phénomène de désamidation non enzymatique de diverses protéines dépend étroitement de la température de l'environnement. L'augmentation de la température mène à l'augmentation de la réactivité des résidus Asn. Cette réactivité est exponentielle et suit la relation d'Arrhenius qui est une fonction de la température (Geiger et Clarck, 1987 ; Patel et Borchardt, 1990).

Les études menées sur l'effet de la température sur la désamidation suggèrent que l'augmentation de cette réactivité est accélérée à des températures élevées. Scotchler et Robinson (1974) ont constaté sur un pentapeptide qu'une augmentation de la température de 20°C peut causer une augmentation considérable dans la vitesse de désamidation.

L'effet de la température accélère la désamidation en fragilisant les interactions intra- et intermoléculaires qui s'établissent au sein de la molécule, ceci permet la pénétration d'eau dans la structure, favorisant la catalyse de désamidation dans le cœur de la protéine. Des charges négatives répulsives sont générées, ce qui peut alors faciliter le changement conformationnel de la protéine, et mener à l'exposition de plus de sites potentiels de réaction à l'environnement aqueux.

Les travaux de Hamada (1992) ont montré que la réaction de désamidation est accélérée en chauffant brièvement des protéines alimentaires. La pénétration d'eau et la solubilisation des protéines semblent être des facteurs-clés dans le processus de désamidation et tous les deux sont améliorés par la chaleur.

La température est un facteur qui peut aussi modifier indirectement d'autres paramètres tel que le pH de l'environnement. De ce fait, la température de stockage de certaines formules pharmaceutiques affecte la vitesse de désamidation d'une protéine en présence de certains tampons car la température a un effet indirecte sur la constante de dissociation d'eau : la concentration d'ions hydroxyles peut varier en fonction de la température et peut ainsi affecter la vitesse de désamidation (Araki *et al.*, 1989).

1.3.5.3. Effet du solvant

La nature du solvant joue un rôle déterminant sur la vitesse de la réaction. En effet, son pouvoir de solvatation et sa constante diélectrique influencent la répartition électronique sur les divers atomes du soluté (protéine), ce qui modifie la constante de vitesse de la réaction.

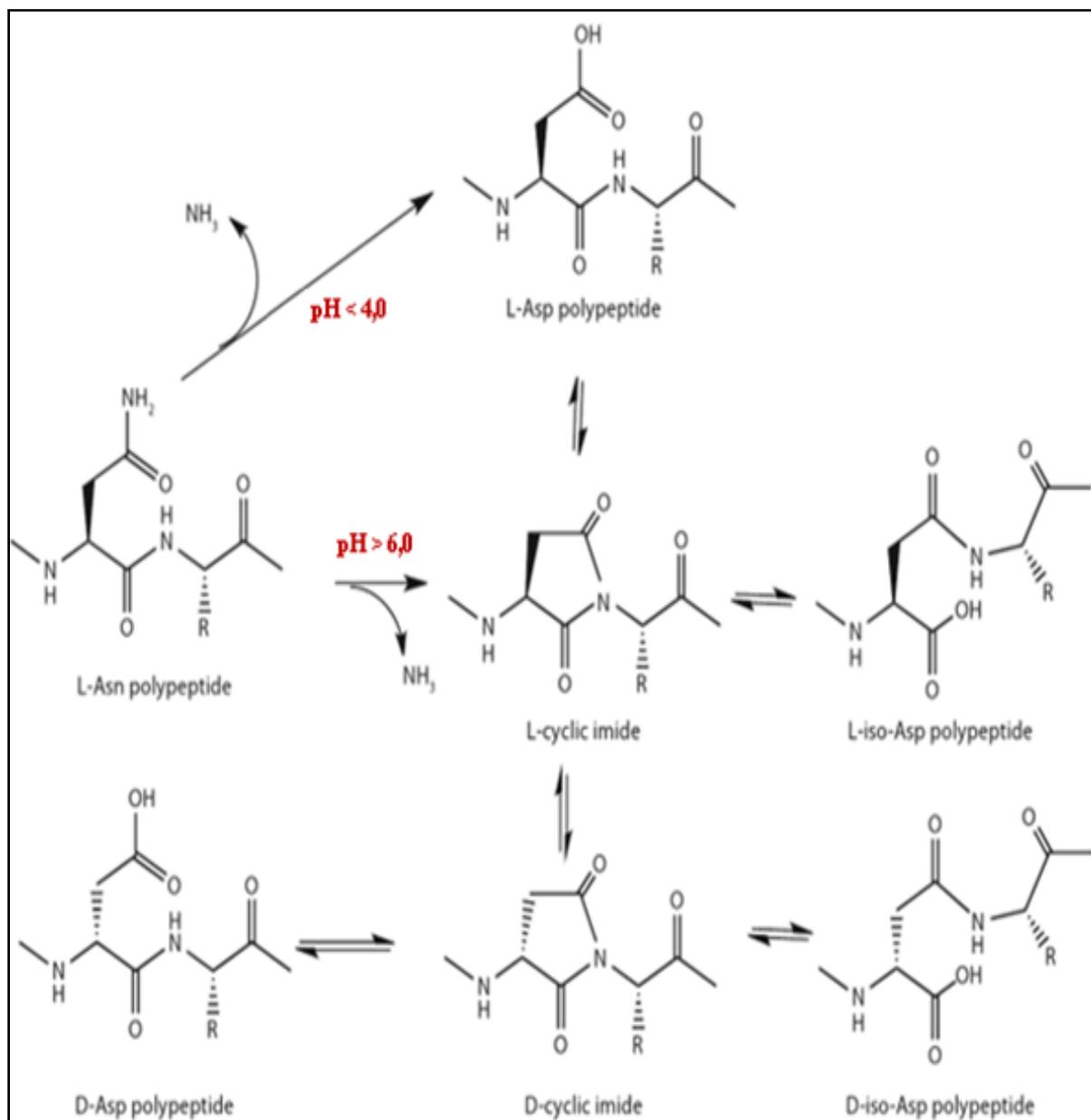


Figure 7. Mécanisme de la désamidation non enzymatique du résidu d'asparagine à pH <4 et pH >6 (Patel et Borchardt, 1990).

Lorsque certains résidus de la séquence polypeptidique ont des prédispositions pour former des liaisons hydrogène intramoléculaires, une compétition entre le solvant et le groupement donneur de proton de la molécule est possible pour former une liaison hydrogène.

La désamidation spontanée des protéines est un phénomène plus rapide en tampon phosphate de sodium qu'en tampon Tris-HCl, pour une même molarité et un même pH (Robinson, 2002). Le tampon phosphate de sodium augmente de 2 à 3 fois le taux de désamidation comparé à un tampon Tris-HCl à pH 7,4 et à 37°C (Robinson et Robinson, 2001).

Différents auteurs ont observé la présence d'un effet agoniste du tampon phosphate sur la désamidation des résidus Asn, par rapport à d'autres tampons comme Tris-HCl ou acétate à pH 7,5 (Aswad, 1995). Il a été montré aussi que le tampon Tris-HCl peut ralentir ou même inhiber la désamidation spontanée (Robinson, 2002).

L'effet du tampon d'incubation sur d'autres types de modifications chimiques spontanées tels que l'isomérisation ou la racémisation du résidu Asp n'est pas, par contre, mis en évidence.

1.3.5.4. Effet de la structure de la protéine

La vitesse de désamidation des chaînes latérales amidées est fonction de la structure primaire. L'effet de cette dernière sur la réactivité des résidus Asn a été largement rapporté, sur des modèles de penta et d'hexapeptides (Stephenson et Clarke, 1989 ; Robinson et Robinson, 2001 ; Robinson, 2002 ; Manning *et al.*, 1989).

Dans ce sens, il a été montré que la vitesse de désamidation est fortement influencée par la nature du résidu d'acide aminé adjacent du côté carboxylique de l'Asn, susceptible à être desamidé. Ceci est expliqué par l'hypothèse liée à l'encombrement stérique et à la flexibilité de ces résidus (Stephenson et Clarke, 1989 ; Robinson et Robinson, 2001).

Les études de Geiger et Clarke (1987) et de Radkiewicz *et al.* (2001) montrent que les séquences primaires où le résidu Asn est suivi des résidus Gly, His, Asp ou Ser sont des séquences très favorables à la réaction de désamidation spontanée.

Les résidus Asn présents dans les séquences Asn-Gly, Asn-Ser (Geiger et Clarke, 1987 ; Tyler-Cross et Schirch, 1991 ; Robinson et Robinson, 2001) sont les plus exposés à la désamidation spontanée, car des réarrangements intramoléculaires surviennent plus facilement au niveau des liaisons peptidiques de type Asn-Gly, Asn-Ser.

L'étude de Robinson *et al.* (1973) suggère que lorsque la séquence Asn-Ala est précédée par un résidu avec une encombrante chaîne latérale (Ile, Leu, Val, Pro), le taux de désamidation est ralenti de 6 fois comparativement à une même séquence Asn-Ala précédée par une Gly. De même, lorsque l'Arg précède l'Asn, ceci augmente le taux de désamidation de 2 fois (Robinson *et al.*, 1973 ; Robinson et Rudd, 1974). D'autres travaux ont rapporté également que la vitesse de désamidation dépend aussi de la nature de l'aa suivant le résidu Asn. Le taux de désamidation est inversement proportionnel au volume de la chaîne latérale

des résidus qui suivent l'Asn dans l'ordre suivant : $G > S > A > L > P$ (Robinson et Rudd, 1974; Geiger et Clarke, 1987 ; Capasso *et al.*, 1989 ; Stephenson et Clarke, 1989).

L'influence de la séquence primaire sur la vitesse de désamidation non enzymatique est résumée en trois points :

- les résidus polaires qui précèdent l'Asn et la Gln augmentent la vitesse de la réaction ;
- les résidus Gly, Ser et Thr qui succèdent à l'Asn favorisent cette réaction ;
- les résidus encombrants et de nature hydrophobe, placés avant l'Asn, diminuent la vitesse de la réaction.

La séquence primaire de la protéine et la nature de ses résidus reste indépendante de la vitesse de désamidation à pH acide (1 à 2). Dans ce cas, le mécanisme de la désamidation non enzymatique répond à une simple hydrolyse de la liaison peptidique sans passer par l'étape de la formation de l'intermédiaire succinimide. De ce fait, on génère un résidu Asp (Patel et Borchardt, 1990).

La vitesse de transformation d'un résidu Asn en résidu Asp ou isoAsp est dépendante aussi de la structure secondotertiaire des protéines. Elle est corrélée à la flexibilité de la chaîne polypeptidique. Ainsi, si la séquence Asn-Gly se trouve au cœur d'une hélice α ou d'un feuillet β , sa désamidation est considérablement ralentie (Xie & Schowen, 1999). Pour qu'il y ait désamidation spontanée, la rotation psi (située avant le plan de la liaison peptidique) est requise afin que la chaîne latérale du résidu Asn se positionne de façon optimale par rapport à l'azote de la liaison peptidique (figure 8). Dans une structure secondaire ordonnée, les liaisons peptidiques sont stabilisées par des ponts hydrogène et la réaction de désamidation ne peut pas se réaliser facilement (Robinson & Robinson, 2004).

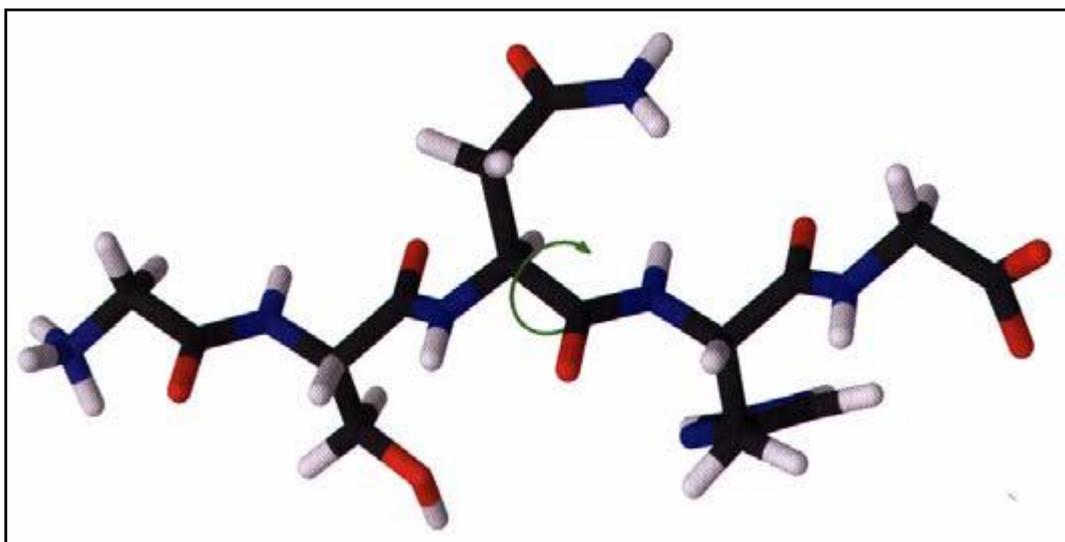


Figure 8. Rotation de l'angle de torsion psi requise pour la formation de l'intermédiaire succinimide (Robinson et Robinson, 2004).

Une augmentation de la flexibilité de la chaîne polypeptidique en absence d'encombrement stérique favoriserait la formation des résidus isoAsp. Par exemple, la vitesse de formation du résidu isoAsp est de 30 à 50 fois supérieure quand le résidu Gly est situé après l'Asn ou Asp (Smith *et al.*, 2002). De ce fait, la formation de l'intermédiaire succinimide est favorisée pour certains motifs séquentiels comme Asn-Gly ou Asn-Ser où la chaîne peptidique est très flexible. Les résidus Gly et Ser adjacents aux résidus Asp favorisent également la formation de succinimide, mais avec une vitesse 15 à 30 fois plus lente que dans le cas des résidus Asn (Stephenson et Clarke 1989).

L'augmentation de la proportion des structures secondaires hélicoïdales diminue la vitesse de désamidation dans certaines protéines (Stevenson *et al.*, 1993). Des travaux sur des analogues d'hormones de croissance ont montré que l'addition du méthanol dans le milieu réactionnel augmente le pourcentage d'hélice α dans la structure protéique, ce qui a pour conséquence la diminution de la vitesse de désamidation (Di Donato *et al.*, 1993).

Dans sa structure native, la RNAase résiste au phénomène de désamidation, probablement à cause de sa structure relativement rigide. La boucle est stabilisée par un pont disulfure entre Cys⁸-Cys¹² et par un coude β au niveau des résidus 66-68, ce qui pourrait empêcher la formation d'imide cyclique (Darrington et Anderson, 1995). La forme réduite et dénaturée est sujette à une désamidation. Des résidus Asp et isoAsp sont produits, et une activité enzymatique différente est alors observée (Di Donato *et al.*, 1993).

La structure tertiaire d'une molécule protéique peut également influencer la réactivité des résidus Asn (Clarke, 1987 ; Kossiakoff, 1988 ; Athmer *et al.*, 2002). La protéine présente une structure tertiaire qui résulte de diverses interactions entre les structures secondaires. Cet état présente une réduction de la flexibilité de la chaîne peptidique, qui se trouve présente dans une conformation, ce qui a pour conséquence de réduire le taux de réactivité du résidu Asn (Kossiakoff, 1988 ; Meyer *et al.*, 2002).

L'influence de la structure tertiaire est mise en évidence en comparant la réactivité des résidus Asn présents dans une structure tertiaire native par rapport à ceux présents dans la même structure après dénaturation ou ceux présents dans des séquences peptidiques limitées (penta- ou hexapeptides). Ces dernières ont des structures très prompts à la désamidation spontanée.

De ce fait, la vitesse de désamidation du résidu Asn est influencé par :

- la flexibilité du résidu Asn au sein de la conformation de la protéine ;
- l'accessibilité du solvant afin d'atteindre le résidu Asn susceptible d'être désamidé.

Un modèle de prédiction de la réaction de désamidation des protéines est mis en ligne par Robinson et Robinson (2004) sur le site www.deamidation.org. Ce modèle est basé sur l'étude de l'effet des structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines sur la vitesse de désamidation des résidus Asn. La connaissance de la structure tridimensionnelle de la protéine après cristallisation est évidemment un pré requis indispensable pour utiliser ce logiciel.

1.3.6. Système de réparation de la désamidation non enzymatique

La désamidation du résidu L-Asn en L-isoAsp introduit une charge négative (acide α -carboxylique), une isomérisation (L-isoAsp) et l'apparition d'une liaison β -amide liée au groupement β -carboxylique du résidu isoAsp (liaison pseudo-peptidique avec un groupement méthyle supplémentaire). Ceci altère profondément la structure primaire de la protéine désamidée.

In vivo, les protéines intracellulaires comportant des résidus L-isoAsp sont soumises à un processus de réparation par la protéine L-isoaspartyl-méthyltransférase (PIMT ; EC 2.1.1.77), une protéine abondamment exprimée dans le cerveau (McFadden 1987) et d'autres tissus.

En 1984, Aswad démontra que le groupement α -carboxyle libre d'un isoAsp était un excellent site de méthylation pour cette enzyme à laquelle il attribua donc le nom de protéine L-isoaspartyl méthyl transférase (Aswad, 1984). Par la suite, Murray et Clarke démontrèrent qu'un intermédiaire imide cyclique se formait lors de la réaction et que l'hydrolyse de ce dernier entraînait la formation d'un mélange de résidus α -aspartyls (Asp) et β -aspartyls (iso-Asp). De plus, ils démontrèrent que la PIMT méthyle sélectivement le résidu iso-Asp (Murray et Clarke, 1984).

La PIMT est une enzyme ubiquitaire d'environ 24,5 kDa qui a été identifiée chez plusieurs organismes comme les bactéries, les plantes, les champignons et les mammifères (Barten et O'Dea, 1990) où elle est présente dans tous les tissus. C'est dans le cerveau que son expression est la plus élevée, suivi des testicules et du cœur (Diliberto et Axelrod, 1976 ; Boivin *et al.*, 1995). Elle a pu être purifiée dans d'autres organes tels que le thymus (Kim, 1973) et le rein (Gingras *et al.*, 1991) ainsi que dans les érythrocytes (Kim *et al.*, 1983).

La structure cristalline de la PIMT humaine (figure 9 ; Ryttersgaard *et al.*, 2002 ; Smith *et al.*, 2002) a été élucidée, ce qui a permis de mieux comprendre son mécanisme catalytique.

Chez l'humain, il existe majoritairement deux isoformes de la PIMT résultant de l'épissage alternatif d'un gène situé sur le chromosome 6 (MacLaren *et al.*, 1992). L'isoforme I a 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 (MacLaren *et al.*, 1992).

La formation spontanée de résidus isoAsp n'est pas néfaste 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 leurs structures et de leurs fonctions biologiques. C'est notamment le cas dans certaines maladies dont la maladie d'Alzheimer (Clarke, 2003).



Figure 9. Vue d'ensemble de la structure cristalline de la L-isoaspartyl-méthyltransférase humaine (Ryttersgaard *et al.*, 2005).

La PIMT possède une forte affinité pour les résidus L-isoAsp. Elle reconnaît les résidus D-Asp avec une affinité de 700 à 10 000 fois moindre que les résidus L-isoAsp (Lowenson et Clarke, 1992). Cette spécificité de réparation de la PIMT est due à l'orientation de l'atome d'azote, qui se trouve en avant plan et qui empêche la PIMT de se fixer sur les résidus L-Asp et D-isoAsp (Clarke, 2003).

1.3.6.1. Mécanisme de réparation par la PIMT

La réparation des résidus L-iso Asp par la PIMT se fait par le transfert d'un groupement méthyle, provenant de l'AdoMet, sur les résidus carboxyles des protéines endommagées (Lindner et Helliger, 2001). Il y a alors formation d'un groupement méthyl-ester sur la protéine ciblée et libération de S-adénosyl-L-homocystéine (SAH), qui peut agir comme inhibiteur compétitif de la réaction de méthylation.

Le groupement méthyl-ester de la protéine va par la suite s'hydrolyser spontanément et ainsi libérer du méthanol et former un intermédiaire succinimide qui se convertira à son tour en résidu Asp ou L-isoAsp. L'hydrolyse non enzymatique du succinimide engendre environ 30% de résidus L-Asp «réparés» et 70% de résidus L-isoAsp «non réparés» (Gingras

et al., 1994). Toutefois, le cycle de réparation peut survenir plusieurs fois, assurant une réparation presque complète des protéines endommagées (figure 10). L'activité de la PIMT est donc essentielle afin de maintenir un niveau très bas de protéines isomérisées anormales dans les cellules

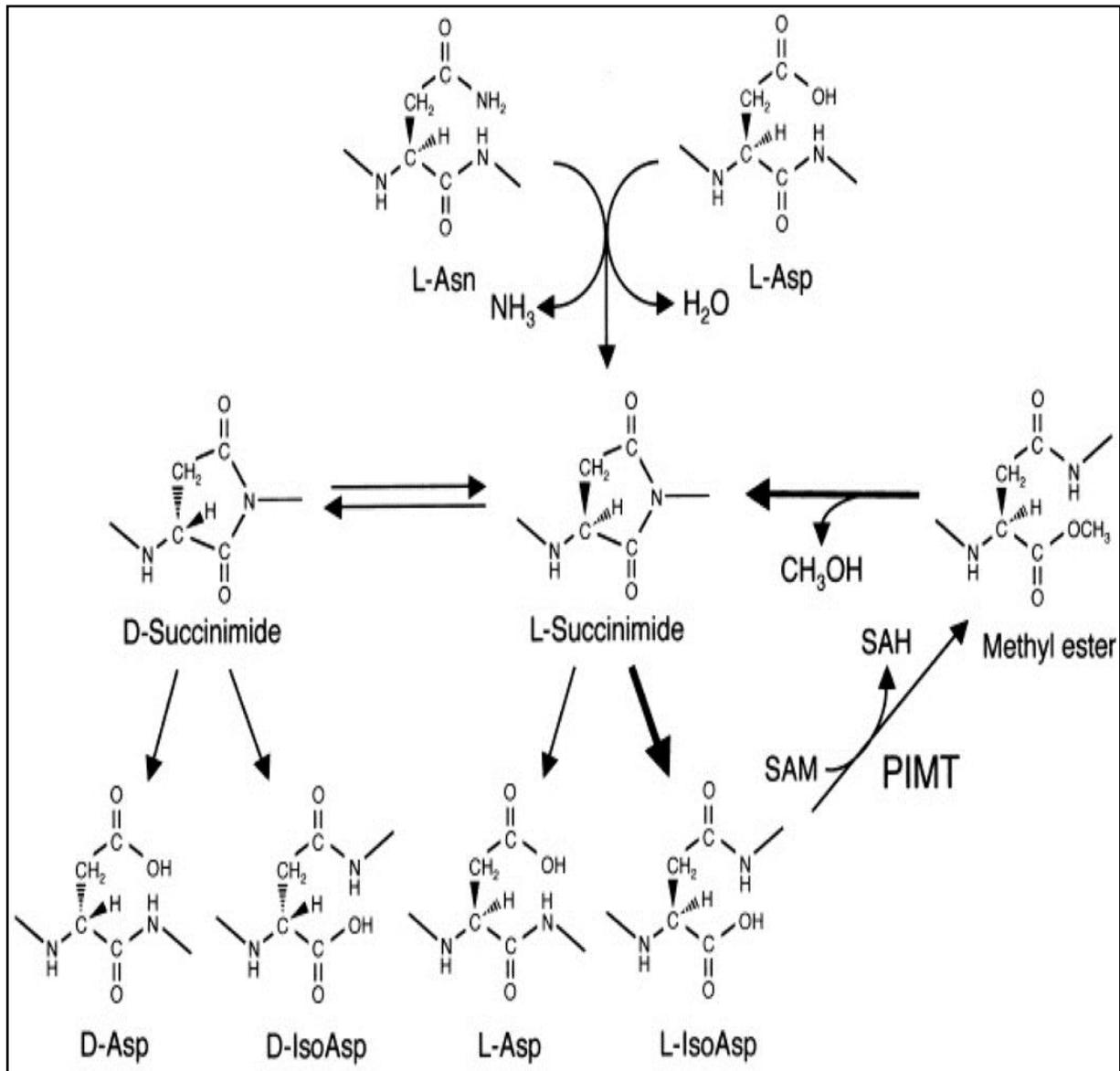


Figure 10. Mécanisme de réparation des protéines par la L-isoaspartyl-méthyltransférase (Young et al, 2005).

SAH : S-adenosyl-L-homocystéine,

SAM : S-adenosyl-méthionine

Une de ses particularités est la localisation du site de liaison de l'AdoMet (S-adénosyl méthionine) dans une poche profonde enfouie à l'intérieur de la PIMT. Ceci suggère que l'une des étapes limitantes de la réaction enzymatique est la liaison de l'AdoMet à son site puis le relâchement de l'AdoHcy (S-adénosyl homocystéine) de cet espace restreint. Ainsi, l'AdoMet est le premier substrat à lier l'enzyme et l'AdoHcy est le dernier produit à la quitter.

Les études ont également permis de déterminer la présence de deux résidus chargés négativement à l'intérieur de la PIMT, dans le site de liaison de l'AdoMet et conservés d'une espèce à l'autre.

Chez l'humain, ces résidus sont Asp⁸³ et Asp¹⁰⁹ et sont essentiels pour la liaison de l'AdoMet. Ainsi, la chaîne latérale du groupement carboxyle du résidu Asp⁸³ interagit avec le groupement amine porté par le carbone- α de l'AdoMet, alors que la chaîne latérale du résidu Asp¹⁰⁹ forme des liaisons hydrogènes avec les groupements hydroxyles du ribose (Kindrachuk *et al.*, 2003).

La liaison du substrat L-isoAsp semble impliquer des liaisons hydrogène avec un résidu Ser à proximité de l'AdoMet (Bennett, *et al.*, 2003). La PIMT de mammifère possède un K_M pour les peptides possédant un L-isoAsp d'environ 0,5 à 10 μ M et son V_{max} est de 15 à 30 nmol/min/mg à 37°C (Johnson et Aswad, 1995). Ainsi, 1 à 3 minutes sont nécessaires pour que chaque molécule de PIMT catalyse le transfert d'un groupement méthyle (Aswad, 1995).

Dans un contexte physiologique normal, les protéines chaperones telle que Hsp70 assurent le repliement adéquat des protéines et participent aux mécanismes de survie cellulaire (Leu *et al.* 2009). Il n'existe pas encore de relation claire entre l'activité de la PIMT et le repliement des protéines. Cependant, certaines observations expérimentales laissent présumer que la PIMT contribue à maintenir la structure native des protéines. Par exemple, l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine tau sont des processus fortement associés à la maladie d'Alzheimer (Grill et Cummings, 2010).

Cette enzyme intracellulaire est surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et est retrouvée au sein des dégénérescences neurofibrillaires (Shimizu 2000). Or, on a détecté la présence de résidus L-isoAsp sur des sites spécifiques d'une forme structurelle anormale de la protéine tau, suggérant que la formation de résidus L-isoAsp serait un autre facteur contribuant à son hyperphosphorylation et son agrégation (Watanabe *et al.* 1999). Ces résultats sont en accord avec les études montrant l'accumulation de résidus L-isoAsp sur la protéine tau dans le cerveau de souris déficientes en PIMT (Shimizu *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.* 1998).

La PMT, qui permet de limiter l'accumulation des résidus isoAsp pourrait aussi induire une forte stimulation du système immunitaire. Ceci peut mener à l'apparition de maladies auto-immunes (c'est le cas des MICI, Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin qui regroupent la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique) lorsqu'il s'agit d'une molécule du soi qui est désamidée (Mamula *et al.*, 1999) ou l'apparition d'allergies lorsqu'il s'agit d'une molécule étrangère (désamination excessive de la gliadine du blé).

L'accumulation d'isoAsp 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 isoAsp (Mamula *et al.*, 1999). Une accumulation d'isoAsp dans des souris PIMT^{-/-} inhibe la transmission synaptique, provoquant ainsi l'épilepsie et la mort rapide des souris (Yamamoto *et al.*, 1998).

L'accumulation d'isoAsp peut aussi mener à l'apparition d'autres maladies auto-immunes (lupus érythémateux, sclérose en plaques ; Mamula *et al.*, 1999). Dans le cas du lupus érythémateux, le complexe ribonucléaire, lorsqu'il est désamidé, devient une cible pour les auto-anticorps (Mamula *et al.*, 1999). Enfin, ce mécanisme de désamidation non-enzymatique jouerait un rôle de signal dans la programmation de l'apoptose cellulaire et dans la maladie de Parkinson (Huebscher *et al.*, 1999). La désamidation serait impliquée dans le processus de sénescence. Il est à ce propos intéressant de noter que la surexpression de PIMT augmente la durée de vie des drosophiles (Chavous *et al.*, 2001).

1.3.7. Impact de la désamidation non enzymatique sur les protéines alimentaires

Du point de vue nutritionnel, une composition variée et équilibrée en acides aminés des protéines alimentaires, ainsi qu'une bonne digestibilité et biodisponibilité, font partie des facteurs qui expliquent leur intérêt nutritionnel (De Wit, 1998 ; Sindayikengera & Xia, 2006).

Au cours de leur passage dans le tractus gastro-intestinal, les protéines alimentaires sont dégradées par hydrolyse enzymatique grâce aux enzymes de la digestion (pepsine, trypsine, chymotrypsine et autres) et aux protéases des bactéries intestinales (Prioult *et al.*, 2004).

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.

In vitro, la désamidation non enzymatique des résidus Gln et Asn provoque l'accroissement de la charge négative d'une protéine. La présence de charges négatives additionnelles entraîne une diminution du pHi de la protéine, une augmentation des répulsions électrostatiques, le déplissement de la protéine et sa dissociation. Elle se traduit par une amélioration de sa dispersibilité et sa capacité d'absorption d'eau.

De ce fait, la désamidation non enzymatique peut être aussi un traitement opéré au niveau technologique dans le but d'améliorer de façon substantielle les propriétés technofonctionnelles des protéines alimentaires en faisant varier leur solubilité et leur capacité de rétention d'eau ainsi que leurs propriétés de surface (pouvoir moussant, émulsifiant). Elles sont aussi recherchées pour des applications non alimentaires (cosmétologie, pharmacologie...etc).

Ces modifications chimiques sont également pratiquées dans des études fondamentales pour mieux élucider la relation structure/fonction des protéines.

Cette modification n'induit pas que des effets favorables. Elle peut générer des composés devenus nocifs pour la santé, telle que l'accumulation d'isoAsp qui pourrait induire une forte stimulation du système immunitaire et peut mener à l'apparition de maladies auto-immunes (Mamula *et al.*, 1999).

Signalons que des protéines laitières de diverses espèces (humaine, bovine et équine) ont, aussi fait l'objet d'une étude sur leur sensibilité à la réaction de désamidation non enzymatique et sa conséquence sur leurs propriétés et leur fonction.

Ainsi, pour la LF humaine, l'effet antioxydant (capacité à chélater des métaux lourds (Fe^{3+} , Cu^{2+}) qui catalysent les réactions d'oxydation des acides gras insaturés) a été augmenté par une réaction de désamidation non enzymatique (Belizy *et al.*, 2001).

La modification de structure faisant suite à la désamidation de cette protéine entraîne une augmentation de ses propriétés anti-oxydantes par une interaction non spécifique de la protéine désamidée avec les ions ferriques, ce qui confère une protection supplémentaire pour le nouveau-né (Belizy *et al.*, 2001).

Le lysozyme, qui représente environ 0,5 g/kg de lait équin (Malacarne *et al.*, 2002), est la troisième protéine majeure du lactosérum équin, juste après la β -lg (2,5 g/kg de lait) et l' α -la (2,4 g/kg). Il possède deux séquences de désamidation spontanée potentielle, $\text{Asn}^{44}\text{-Gly}^{45}$ et $\text{Asn}^{49}\text{-Gly}^{50}$. Le lysozyme pourrait alors se désamider spontanément dans le lait équin, de façon similaire à l' α -La. Par contre, le lysozyme du lait bovin ne possède pas de telles séquences.

Comparativement à ces résultats, l'étudié de Nonaka *et al* (2008) sur le lysozyme des canidés a montré aussi que cette protéine porte trois sites Asn-Gly susceptibles à la désamidation non enzymatique à pH 8, 30°C. La forme dénaturée du lysozyme est plus sensible que celle de la forme native, ce qui confirme le rôle de la structure second-tertiaire dans le phénomène de désamidation non enzymatique.

La caséine- β équine peut, elle aussi subir un phénomène de désamidation non-enzymatique spontané lors d'une incubation à 37°C et à un pH basique ou proche de la neutralité (Girardet *et al.*, 2006 ; Matéos *et al.*, 2009). Cette caséine a la spécificité de posséder un résidu Asn^{135} présent dans une séquence Asn-Gly qui est susceptible de se désamider facilement, comme cela a été montré pour de nombreuses protéines contenant cette séquence et soumise à des conditions physiologiques de température et de pH (Robinson et Robinson, 2004). Les caséines β issues des autres espèces (bovine, humaine et cameline) ne possèdent pas de séquence caractéristique Asn-Gly et ne sont pas une cible pour une désamidation potentielle.

Un autre exemple est celui de l' α -La équine qui possède aussi un site de désamidation potentiel en position $\text{Asn}^{45}\text{-Gly}^{46}$, qui se désamide à pH 7,4 et à 37°C (Girardet *et al.*, 2004).

Cependant, aucune incidence significative de cette désamidation sur la conformation de la protéine n'a été observée par dichroïsme circulaire (N'Negue, 2006), mais, il serait possible que cette modification soit à l'origine de certains cas d'allergies aux protéines sériques équine décrits (Gall *et al.*, 1996).

Dans ce contexte, qu'en est-il de l' α -La cameline qui possède deux résidus Asn qui peuvent être des sites de désamidation non enzymatique, plus ou moins spontanée ? Quelles sont les répercussions de cette modification chimique sur certaines des propriétés de cette protéine clé dans le sérum du lait de dromadaire ? C'est à ces questions que nous nous proposons d'apporter des éléments de réponse en réalisant l'étude expérimentale présentée ci-après.

MATERIEL & METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a été réalisé grâce à la collaboration de plusieurs laboratoires de recherches :

- le Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Université M. Mammeri de Tizi-Ouzou, Algérie ;
- le laboratoire de l'Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), Université de Lorraine, France ;
- le Service Commun de Biophysique – Interactions Moléculaires (SCBIM), Faculté de Médecine (Biopôle), Université de Lorraine, France ;
- le laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), Université de Lorraine, France
- le laboratoire Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMPB), ESPCI ParisTech, Paris, France

Il a été sous tendu par les moyens ci-après indiqués.

2.1. MATERIEL**2.1.1. Appareillage**

Dans chacun des établissements cités plus haut, un certain nombre d'équipement scientifique a été utilisé pour réaliser les différentes expérimentations :

2.1.1.1. Equipement utilisé au LABAB-UMMTO

- unité de chromatographie liquide basse pression (Bio-Rad)
- unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales (Hoeffer SE 200) ;
- spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU) ;
- centrifugeuse réfrigérée (max 28 000xg ; SIGMA) ;
- lyophilisateur à plateaux (Telstar LyoQuest) ;
- autre matériel d'usage courants (balance de précision à 0,01 mg (Denver Instrument) ; balances analytiques à affichage digital (0,01 g ; Denver Instrument) ; pH mètre (Hanna-instruments) ; bain-Marie (Mettler) ; agitateurs variés....etc).

2.1.1.2. Equipement utilisé à l'URAFPA-France

- ÄKTA-Purifier (GE Healthcare, Uppsala, Suède) permettant de réaliser de la chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) et équipé, selon l'expérimentation, d'une des colonnes suivantes :
 - colonne Mono Q 10/100 GL (10 x 100 mm, taille des particules 10 µm, (GE Healthcare)
 - colonne Hitrap-CM (carboxyméthyl , 5/5 columns , 1.5 x 2.5 cm, taille des particules 10 µm, GE Healthcare) ;
- unité de chromatographie liquide de haute performance (HPLC) en phase inversée avec une colonne analytique LichroCart C₁₈ (250 x 4 mm ; 5µm de taille de particule ; 10 nm de

porosité; Merck, Darmstadt, Allemagne), reliée à un système HPLC Alliance 2690 (Waters). Equipée d'un détecteur à barrette de diodes 996 (Waters, Milford, États-Unis) relié en ligne à la HPLC. Les spectres UV sont exploités avec le logiciel Millenium 32, version 3.05.01 (Waters).

- unité d'électrophorèse (Mini-PROTEAN Tetracell, Bio-Rad) ;
- système d'isoélectrofocalisation pour électrophorèse bidimensionnelle (PROTEAN IEF Cell, Bio-Rad) ;
- sécheur de gel à chaleur tournante (GelAirDryer, BioRad).

2.1.1.3. Equipement utilisé au SCBIM-France

- spectromètre de dichroïsme circulaire CD 6 (Jobin-Yvo, France) ;
- microcalorimètre à balayage de température (Microcal VP-DSC, France).

2.1.1.4. Equipement utilisé au SMBP, ESPCI ParisTech, France

Spectromètre de masse Ultra LTQ-FT (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, États-Unis) utilisé est équipé d'une source nano ESI TriVersaNanoMate (Advion Biosciences, Ithaca, NK, États-Unis).

2.1.1.5. Equipement utilisé au CRM2-France

Outils informatiques équipés d'un logiciel Amber 12 Molecular Dynamics Package (Case *et al.*, 2012).

2.1.2. Matériel biologique

2.1.2.1. Echantillons de lait

Les échantillons de lait utilisés dans le cadre de cette étude proviennent de lait camelin collectés au printemps, à partir de troupeau de chamelles saines (*Camelus dromedarius*) de la population *Sahraoui* vivant en élevage extensif dans des parcours naturels de la région de Ouargla du sud algérien.

Un échantillon de lait bovin a été aussi utilisé pour des comparaisons. Il provient d'un troupeau de vaches saines de race Holstein (ferme d'élevage de Draa Ben Khedaa, Tizi-ouzou, Algérie).

2.1.2.2. Enzymes et protéines étalon

Nous avons eu recours aux enzymes suivantes pour différentes hydrolyses :

- trypsine (EC 3.4.21.4), extraite de pancréas bovin et traitée au TPCK (*L-1-tosylamide-2-phenylethylchloromethyl ketone*) afin d'inhiber une éventuelle activité chymotrypsique contaminante (Sigma Chemical, États-Unis) ;

- thermolysine (EC 3.4.24.27), issue de la souche *Bacillus thermoproteolyticus* ROKKO (Sigma Chemical, États-Unis) ;

Pour les protéines étalons d'électrophorèse, nous avons utilisé un kit commercial prêt

A l'emploi, comprenant dix protéines dont les MM allant de 10 à 250 kDa (Bio-Rad, Etats-Unis).

2.1.3. Produits et réactifs

Acrylamide, N, N'-méthylène-bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de Coomassie R250, bleu de Dextran 2000, dodécyl sulfate de sodium (SDS), glycine, β -mercaptoéthanol, persulfate d'ammonium, N, N, N', N' tétraméthyléthylène diamine (TEMED), réactif de Folin-Ciocalteu, tyrosine, nitrate d'argent, résines pour chromatographie (Diéthylaminoéthyl cellulose (DEAE cellulose DE 52 et le Séphacryl S200 prêt à l'emploi) ...etc.

2.2. METHODES

2.2.1. Isolement des protéines lactosériques totales

Dans le cas des protéines bovines, le lait cru trait proprement est conditionné dans des flacons de 100 mL et est immédiatement additionné d'un antibactérien, l'azoture de sodium à 0,05% (m/v) puis acheminé au laboratoire dans une glacière.

Les protéines du lactosérum bovin (PSv) sont préparées à partir de 2 L de lait cru écrémé par centrifugation (20 min, 4°C, 4500xg). Le pH du lait est amené progressivement à 4,6 par addition d'HCl 1 M et le lait est centrifugé (20 min, 20°C, 3000xg). Le surnageant contient les protéines solubles du lactosérum et le culot, les caséines. La solution de protéines sériques est neutralisée par NaOH 1 M, dialysée 72 h à 4°C contre de l'eau distillée en présence de l'agent antibactérien, le thymol, puis lyophilisée.

Dans le cas des lactoprotéines camelines (PSc), le lait cru est recueilli proprement dans des bouteilles de 1 L et est immédiatement additionné d'un antibactérien, l'azoture de sodium à 0,05% (m/v), puis acheminé au laboratoire dans une glacière contenant un bloc réfrigérant. Ces échantillons sont ensuite congelés dès leur arrivée au laboratoire à -18°C.

Après une décongélation lente à température ambiante, le lait est écrémé par centrifugation (30 min, 4°C, 4500xg). L'ensemble des caséines précipite à pH 4,3 (Wangoh *et al.*, 1998), par addition d'HCl 1 M. Le lait est par la suite centrifugé (20 min, 20°C, 3500xg). Le surnageant qui contient les protéines lactosériques est neutralisé par NaOH 1 M, dialysé 72 h à 4°C contre de l'eau distillée en présence de thymol puis lyophilisé (figure 11).

2.2.2. 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 2). Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur deux réactions simultanées : une réaction de type Biuret, par laquelle les molécules polypeptidiques qui contiennent au moins quatre groupements (-CO-NH-) donnent en milieu alcalin un complexe cuivrique coloré et une réaction par laquelle les noyaux phénoliques de la tyrosine et du tryptophane et à un degré moindre la cystéine et l'histidine, réduisent le réactif de Folin (tungsto-phospho-molybdique).

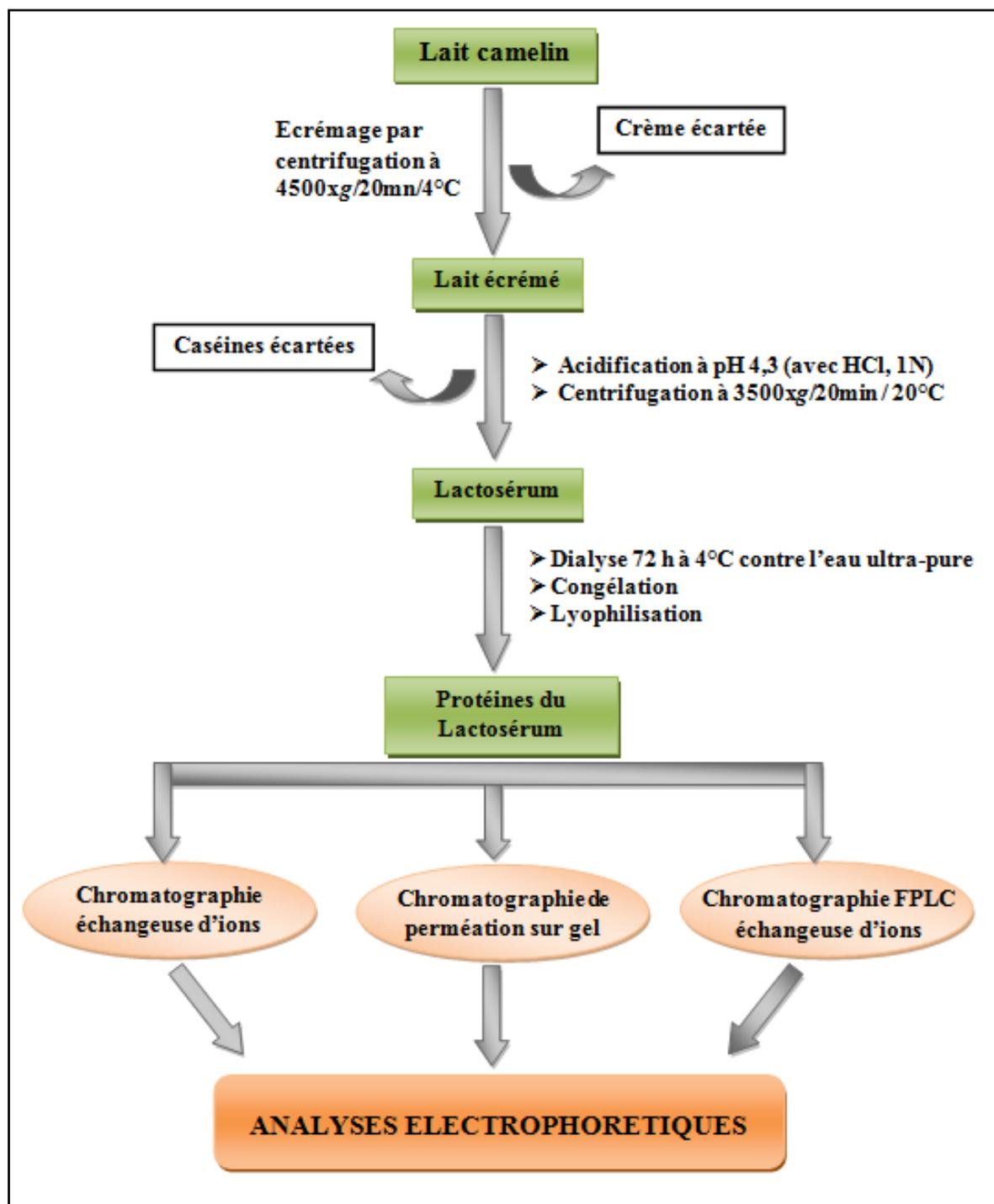


Figure 11. Etapes de séparations suivies des protéines lactosériques à partir du lait de dromadaire collecté dans la région de Ouargla (Algérie).

Les intensités de coloration développées sont proportionnelles à la concentration protéique dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 750 nm. La détermination de la concentration en protéines des échantillons (trois essais ont été réalisés) se fait par le biais d'une courbe d'étalonnage en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard.

2.2.3. Fractionnement des protéines lactosériques camelines

2.2.3.1. Chromatographie d'échange d'anions

La chromatographie échangeuse d'ions est basée sur les interactions des molécules en solution pour les ions de charge opposée de la phase stationnaire. Pour la chromatographie sur DEAE cellulose, la phase stationnaire est une résine de cellulose sur laquelle sont liés chimiquement les groupements ammonium quaternaires (DEAE) du gel, qui sont, eux, chargés positivement à pH alcalin. La phase mobile permet d'éluer sélectivement les protéines suivant un ordre décroissant de leurs charges, et ce en augmentant progressivement la concentration en sel (force ionique).

La méthode de Bican (1995) a été adoptée pour le fractionnement des protéines sériques camelines en basse pression.

Des essais préliminaires ont montré que 5 g de DEAE cellulose en poudre sont nécessaires pour la préparation de la colonne (dimension 1 x 20 cm ; figure 12). Ce gel est gonflé au préalable par des lavages successifs à travers le verre frité de porosité 3 avec :

- 200 mL d'hydroxyde de sodium 1 N ;
- 200 mL d'acide chlorhydrique, 0,1 N, NaCl 25% (m/v) ;
- eau distillée (plusieurs lavages) ;

Enfin, la colonne est équilibrée avec le tampon Tris-HCl, 20 mM, pH 7,2, contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium jusqu'à ce que le pH du filtrat soit confondu avec celui du tampon utilisé.

L'échantillon, à raison de 30 mg mL⁻¹, est déposé sur la colonne DEAE cellulose, équilibrée préalablement avec le tampon Tris-HCl indiqué plus haut. L'élution est réalisée à température ambiante (20 à 25°C) par un gradient linéaire de chlorure de sodium (NaCl) dans le même tampon (0 à 0,4 M) pendant 2h à un débit de 0,5 mL min⁻¹. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 5 mL sont collectées, dialysées, lyophilisées puis analysées par électrophorèse.

2.2.3.2. Chromatographie de perméation sur gel

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 l'ordre décroissant de leurs poids moléculaires.

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.*, 2005).

Les protéines sériques camelines sont fractionnées par chromatographie de perméation sur un gel de Séphacryl S200 en basse pression selon la méthode de Levieux *et al* (2005) avec modification du support de séparation (Séphacryl S200 au lieu et place du Sephadex G200).

Le gel (environ 10 g) est mis en contact du tampon de départ : chlorure de tris hydroxyméthyl aminométhane (Tris-HCl), 20 mM, pH 7,4 contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium pendant 30 mn. Il est ensuite dégazé sous vide, puis introduit dans la colonne (20 x 1cm) en une seule fois au moyen d'un appareillage semi-automatisé Bio-Rad.

L'élution est réalisée à température ambiante (20 à 25°C) avec le même tampon à un débit de 0,8 mL min⁻¹, le volume mort de la colonne est déterminé ($V_0 = 38$ ml) par injection de bleu dextrane à la concentration de 1 mg mL⁻¹.

Les protéines sériques camelines (100 mg) sont solubilisées dans 5 mL de tampon Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4, contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium puis déposées en haut de la colonne. L'absorbance est suivie à 280 nm et des fractions de 2 mL sont recueillies dialysées, lyophilisées puis analysées par électrophorèse.

2.2.3.3. Chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC)

Les protéines lactosériques camelines (10 mg mL⁻¹) sont fractionnées par chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) au moyen d'un appareillage semi-automatisé ÄKTA-Purifier (figure 13). En mode semi-préparatif, les protéines sont séparées sur une colonne Mono Q 10/100 GL.

Un volume de 30 mL (300 mg de PS) est injecté, en trois fois dans une boucle de 10 mL, la colonne équilibrée en tampon Tris-HCl, 20 mM, pH 7,4 contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium. Le débit est de 2 mL min⁻¹ et la détection est réalisée à 280 nm. Un gradient linéaire de 0 à 0,4 M de NaCl est appliqué pendant 6 min afin de purifier l' α -La cameline.

Les tubes contenant de l' α -La sont collectées, leur contenu est dialysées et lyophilisées (33 mg d' α -La cameline sont obtenus et conservés à -20°C).

2.2.3.4. Elimination des immunoglobulines camelines

Afin d'éliminer les immunoglobulines camelines présentes dans la fraction contenant l' α -La cameline (obtenue par FPLC), la fraction contenant de l' α -La est filtrée sur une cellule d'ultra-filtration UF Amicon Ultra-15 (30 kDa) puis centrifugée à 800xg pendant 20 min à 4°C.

Le perméat est récupéré, congelé et lyophilisé. Le lyophilisat est repris avec 1 mL de tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 et injecté dans une colonne Hitrap-CM couplée à un système ÄKTA-FPLC.

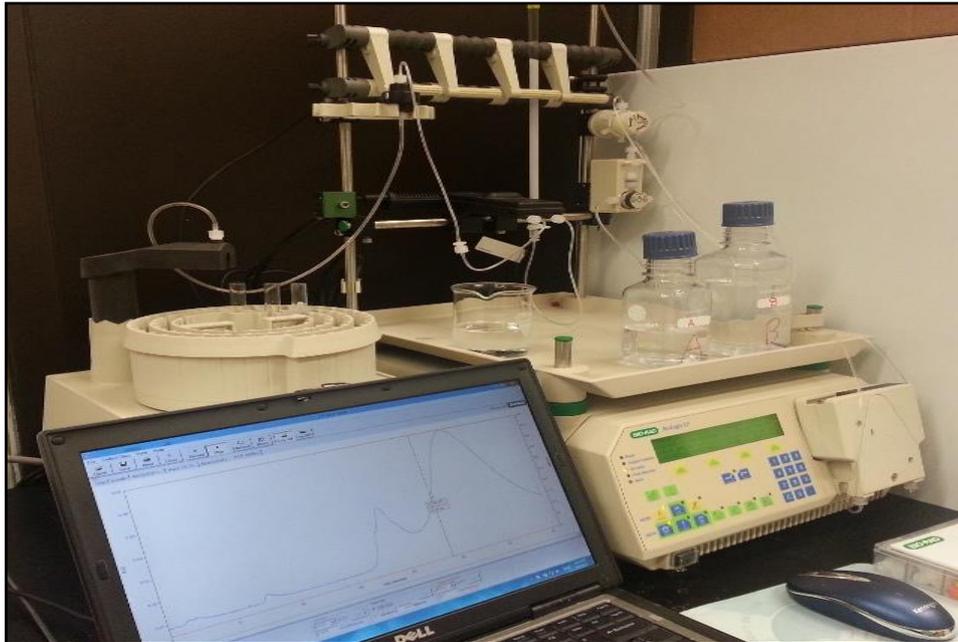


Figure 12 : Photographie de l'appareillage de chromatographie liquide basse pression (BioLogic LP, Biorad)



Figure 13 : Photographie de l'appareillage de chromatographie liquide rapide des protéines (FPLC) semi-automatisé ÄKTA-Purifier.

2.2.4. Méthodes électrophorétiques et les techniques de révélation

2.2.4.1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes et non dénaturantes (Alkaline-PAGE)

2.2.4.1.1. Principe

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Dans ces conditions, les protéines, du fait de leurs caractères amphotères, peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode et être visualisées sous formes de bandes de migrations distinctes selon leurs charges et leur masse moléculaires.

Le gel de polyacrylamide (PAGE), est l'un des supports électrophorétiques les plus utilisées pour ces séparations en raison de ses multiples avantages (transparence, reproductibilité, pouvant servir lui-même de tamis moléculaire...etc).

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leur structure particulière, qui est celle d'un réseau tridimensionnel de fibres et de pores résultant du greffage d'unités de N, N-méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) bi fonctionnelles sur des chaînes de polyacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) adjacentes. la polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ et de N,N,N,N- tetraméthylènediamine (TEMED).

La structure du gel est définie par les indices T et C. Sa porosité est ajustée en faisant varier les concentrations relatives de a et b ; la taille effective des pores d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée.

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

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

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

Notons que l'électrophorèse en conditions natives est bien adaptée pour les protéines globulaires, telles les protéines sériques du lait, qui migrent dans ces conditions selon leur charges nettes et leur formes et taille moléculaires.

2.2.4.1.2. Conditions expérimentales

La méthode adaptée par Pâquet *et al.* (1988) a été utilisée. Un gel de polyacrylamide (T : 9,25% ; C : 3,8%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9 est coulé dans un système utilisant des plaques verticales (Mini-PROTEAN Tetracell, Bio-Rad).

Le tampon d'électrodes contient 38 mM de glycine et le pH est ajusté à 8,3 avec du Tris. Les échantillons sous forme lyophilisée, sont additionnés de tampon d'échantillon (Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9 contenant 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol) à raison de 2 mg mL⁻¹ pour les protéines sériques totales et 1 mg mL⁻¹ pour les protéines pures.

Des dépôts de 10 μL sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous des conditions électriques de 60 mA, 30 W et 500 V (par gel) pendant 2h30 environ, à 4°C.

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

2.2.4.2.1. Principe

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

2.2.4.2.2. Conditions expérimentales

La méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (1973) est utilisée. Le gel (système de migration verticale) est formé d'un gel de concentration (T : 4,9% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 0,1% (m/v) de (SDS) et d'un gel de séparation (T : 15,4% ; C : 2,7%) en tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,8 contenant 0,1% (m/v) de SDS.

Le tampon d'électrodes (pH 8,3) est composé de 50 mM de Tris, de 384 mM de glycine et de 0,1% (m/v) de SDS. Les échantillons (sous forme lyophilisée) sont dissous à 2 mg mL⁻¹ dans du tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8 contenant 2% (m/v) de SDS, 5% (v/v) de 2-ME, 10% (v/v) de glycérol et 0,01% (m/v) de bleu de bromophénol.

Les échantillons subissent alors un traitement thermique à 100°C pendant 3 min. Des dépôts de 20 μL (40 μg) sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous des conditions électriques de 60 mA, 30 W et 500 V (par gel) pendant 2h30 environ, à 4°C.

2.2.4.3. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE)

La méthode d'Herbert *et al.* (1998) a été adaptée. La première dimension (isoélectrofocalisation) consiste à faire migrer les protéines selon leur point isoélectrique sur un gradient de pH pré-établi.

Les fractions d' α -La cameline native (notée A₁) et ses deux isoformes (notées A₂ et A₃) (18 μg , 12 μg et 6 μg , respectivement), purifiées sur ÄKTA-Purifier, sont solubilisées dans 180 μL d'une solution prête à l'emploi, contenant 8 M d'urée, 4% (m/v) de 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-1propanesulfonat (CHAPS), 2 mM de tributyl phosphine, 40 mM de Tris, 0,2% (m/v) d'ampholines 3-10 (Bio-Lytes 3-10; Bio-Rad) et 0,001% (m/v) de bleu de bromophénol.

Une bandelette ("IPG-strip" de 11 cm, pH 7 à 4) de gel de polyacrylamide (T : 4% ; C : 3%) prête à l'emploi a été utilisée pour l'IEF. Le gradient de pH utilisé est compris entre 4,0 et 7,0 (IPG ReadyStrippH 4-7 ; Bio-Rad). La bandelette "IPG-strip" est placée dans l'appareil

d'IEF et réhydraté activement (différence de potentiel constante de 50 V) avec les solutions protéiques correspondantes pendant 15 h à 10°C.

L'IEF est réalisée en trois étapes (à 10°C). Premièrement, un faible voltage de 250 V est appliqué pendant 15 min afin d'éliminer les ions salins en excès ; deuxièmement, une montée en gradient du voltage de 250 à 8000 V est programmée sur 15 min, avec un courant limite de 50 mA. Troisièmement, le voltage est maintenu constant à 8000 V pendant 5 h.

Après IEF, la bandelette est équilibrée pendant 15 min dans du tampon Tris-HCl 25 mM, pH 6,8 contenant 6 M d'urée, 2% (m/v) de SDS, 20% (v/v) de glycérol et 5 mM tributyl phosphine. La bandelette "IPG-strip" est scellée au sommet d'un gel de SDS-PAGE avec de l'agarose à 1% (m/v) fondu dans du tampon d'électrodes.

La seconde dimension (SDS-PAGE) est réalisée selon la méthode en tampons discontinus de Laemmli et Favre (1973) décrite précédemment.

2.2.4.4. Révélation des protéines par le bleu de Coomassie

Après migration électrophorétique, les protéines sont fixées dans le gel par de l'acide trichloracétique (TCA) à 12% (m/v) pendant 30 min, puis révélées pendant 2 h par une suspension colloïdale de bleu de Coomassie R250 à 0,1% (m/v) dans un mélange d'éthanol à 50% (v/v) et de TCA à 2% (m/v).

La décoloration est effectuée par plusieurs lavages dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) et d'acide acétique à 7,5% (v/v). Le gel est ensuite séché entre deux feuilles de Cellophane dans un sécheur de gel et conservé sous cette forme.

2.2.4.5. Révélation des protéines par le nitrate d'argent

Le gel est lavé dans une solution de TCA à 12% (m/v) pendant 5 min à température ambiante puis incubé pendant 3h dans une solution (éthanol, 30% / acide acétique, 10%) suivi de trois lavages successifs à l'eau ultra-pure pendant 20 min. La sensibilisation est réalisée par une solution de thiosulfate de sodium (0,02%) pendant 1 min. le gel est par la suite immergé dans une solution de nitrate d'argent (AgNO_3 0,1%), pendant 30 min à l'obscurité. Après cinq lavages dans l'eau, une solution de révélation contenant du formaldéhyde à 0,02 %, thiosulfate de sodium à 2% fait apparaître sur le gel les protéines. Le seuil de sensibilité de cette méthode de coloration est de 2 ng équivalent protéine.

2.2.4.6. Révélation des glycoprotéines par le réactif de Schiff

Une membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF) est trempée 2 secondes dans du méthanol puis lavée 2 min dans de l'eau ultra-pure et équilibrée 10 min dans du tampon de transfert composé de 10 mM de 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonate de sodium (CAPS), pH 11,0 contenant 10% (v/v) de méthanol. Après migration électrophorétique, les gels de polyacrylamide sont équilibrés 15 min dans le tampon de transfert puis mis en contact avec la membrane de PVDF.

L'ensemble est comprimé légèrement entre deux blocs de Scotch-Brite, et le tout est placé dans une cuve de transfert verticale remplie de tampon de transfert. Le gel est placé coté

cathode et la membrane coté anode. La migration des protéines du gel vers la membrane est réalisée à 4°C avec un voltage constant de 100 V et un courant de 0,5 A pendant 5 h.

Après transfert des protéines, la membrane PVDF est lavée dans une solution de TCA à 12% (m/v) pendant 5 min à température ambiante. Les étapes suivantes se déroulent à 4°C et à l'obscurité. La membrane est immergée dans de l'acide periodique à 1% (m/v) pendant 15 min et lavée par trois bains successifs d'acide acétique à 15% (v/v) pendant 15 min. La révélation des glyco-protéines est effectuée par le réactif de Schiff pendant 30 min. Après plusieurs lavages à l'acide acétique 7,5% (v/v), la membrane est séchée à l'air libre.

2.2.5. Désamidation spontanée de l' α -lactalbumine cameline

A 37°C et à un pH proche de la neutralité (ou à un pH basique), l' α -La se désamide spontanément en libérant de l'ammoniaque dans le milieu. L'étude cinétique de cette réaction est réalisée en dosant la protéine désamidée par FPLC d'échange d'anions (ÄKTA-Purifier).

2.2.5.1. Incubation du lactosérum camelin dans le tampon phosphate

Les protéines lactosériques camelines (15 mg mL⁻¹) sont solubilisées dans 150 mM de tampon phosphate de sodium, pH 7,4 ou 8,4, contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium. La solution est ensuite filtrée à 0,45 μ m et incubées à 37°C pendant 72h.

Afin d'étudier l'effet de la présence d'un agent réducteur sur la réaction de désamidation, l'expérience est refaite, dans les mêmes conditions, en ajoutant 5% de β -mercaptoethanol dans le tampon phosphate 150 mM, 0,02% d'azoture de sodium à pH 7,4 ou 8,4.

2.2.5.2. Dosage par FPLC analytique

Lors de l'incubation des protéines sériques camelines, des volumes de 100 μ L sont prélevés régulièrement, en présence et en absence de β -mercaptoethanol dans le tampon, pendant 3 jours d'incubation et dilués 4 fois avec de l'eau ultra-pure, filtrés à 0,45 μ m et injectés dans une colonne Mono Q pour FPLC. Pour les prélèvements contenant le β -mercaptoethanol, ce dernier est éliminé, avant injection sur colonne FPLC, par extraction en phase solide (SPE) sur colonne Sep-Pak[®] C₁₈ (Waters). A l'aide d'une seringue, la colonne est lavée dans un premier temps avec 4 mL d'une solution A (acétonitrile (5%) + acide trifluoroacétique à 0,1%, v/v), puis les prélèvements (additionnés de 1 mL de solution A) sont déposés dans la colonne et élués avec 3 mL d'une solution B (acétonitrile (50%) + acide trifluoroacétique à 0,1%, v/v).

2.2.6. Hydrolyses enzymatiques

Les fractions protéiques purifiées (α -La cameline et bovine) sont solubilisées, à raison de 1 mg mL⁻¹, dans :

- le tampon HEPES 50 mM, pH 7,2, contenant 10 mM de CaCl₂ et 0,02% (m/v) d'azoture de sodium (dans le cas de la thermolysine) ;
- le tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 et 0,02% (m/v) d'azoture de sodium (dans le cas de la trypsine).

Les solutions sont ensuite filtrées à 0,45 μm , puis incubées 15 min dans un bain-marie à 37°C. Des volumes appropriés de solution de thermolysine et de trypsine (2 mg.mL⁻¹), sont ajoutés à 1 mL de la solution d' α -La, afin d'obtenir un rapport molaire enzyme/substrat (E/S) de 1/80 pour la thermolysine et de 1/100 pour la trypsine. La réaction d'hydrolyse est arrêtée par addition de 2% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) afin d'obtenir un pH proche de 2. Les hydrolysats obtenus d' α -La cameline et bovine sont prélevés à différents temps d'hydrolyse compris entre 1 min et 3 h, puis congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Pour la forme désamidée, les protéines lactosériques (15 mg.mL⁻¹) sont incubées dans le tampon phosphate de sodium à 150 mM, pH 8,4, contenant 0,02% (m/v) d'azoture de sodium pendant 24 h à 37°C afin de générer spontanément de l' α -La cameline désamidée. Cette forme est ensuite purifiée par FPLC d'échange d'ions sur colonne Mono Q (voir paragraphe "chromatographie liquide").

L'hydrolyse, par la thermolysine ou par la trypsine, de l' α -La cameline désamidée est réalisée à 37°C pendant des temps d'incubation compris entre 1 min à 3 h, sous les mêmes conditions expérimentales que celle de l' α -La native, avec un rapport E/S de 1/80 pour la thermolysine et de 1/100 pour la trypsine.

2.2.7. Chromatographie liquide à hautes performances en phase inversée

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse permet la séparation des constituants d'un mélange selon leur hydrophobie relative. La phase stationnaire est majoritairement composée de silice greffée par des groupements hydrophobes, le plus souvent des chaînes linéaires de 8 ou 18 atomes de carbones (C-8 et C-18). La phase mobile est un solvant polaire. Ainsi, les composés sont élués dans l'ordre de leur hydrophobie croissante. La détection en sortie de colonne est réalisée par mesure d'absorbance en UV.

L'analyse des peptides d' α -La est réalisée par HPLC en phase inversée avec une colonne analytique LichroCart C₁₈. Un volume de 200 μL d'hydrolysat d' α -La est déposé dans la colonne. Un gradient de 5 à 20% (v/v) d'acétonitrile est appliqué pendant 60 min en présence de 0,1% (v/v) de TFA, puis un gradient de 20 à 50% d'acétonitrile est réalisé pendant 60 min également. Le débit appliqué est de 1 mL min⁻¹ et la détection est effectuée entre 210 et 320 nm. Les spectres UV sont exploités avec le logiciel Millennium 32, version 3.05.01 (Waters).

2.2.8. Dichroïsme circulaire (CD)

2.2.8.1. Principe

La technique repose sur la capacité qu'ont les structures optiquement actives d'absorber de façon inégale la lumière polarisée circulairement à droite et à gauche de la lumière polarisée. En effet, les structures secondaires n'absorbent pas de façon égale la lumière polarisée circulairement vers la droite et celle vers la gauche. L'absorption préférentielle de l'une de ces deux polarisations entraînera une déviation, laquelle varie en fonction de la longueur d'onde. Conséquemment, des spectres différents sont observés pour une hélice α , un feuillet β et une forme non structurée.

Les spectres caractéristiques de ces structures sont représentés à la figure 14. Ces spectres sont obtenus en utilisant des longueurs d'onde variant généralement entre 260 et 190 nm. Les algorithmes accessibles, basés sur des spectres de structures connues, aident à fournir, sous forme statistique, une estimation des ratios de chacune des structures secondaires retrouvées chez une protéine (Sreerama et Woody, 2004a et b). Pour une structure qui est principalement en hélice α , deux minimums seront observés sur le spectre, à 222 nm et 208 nm, ainsi qu'une forte absorption positive vers 190 nm.

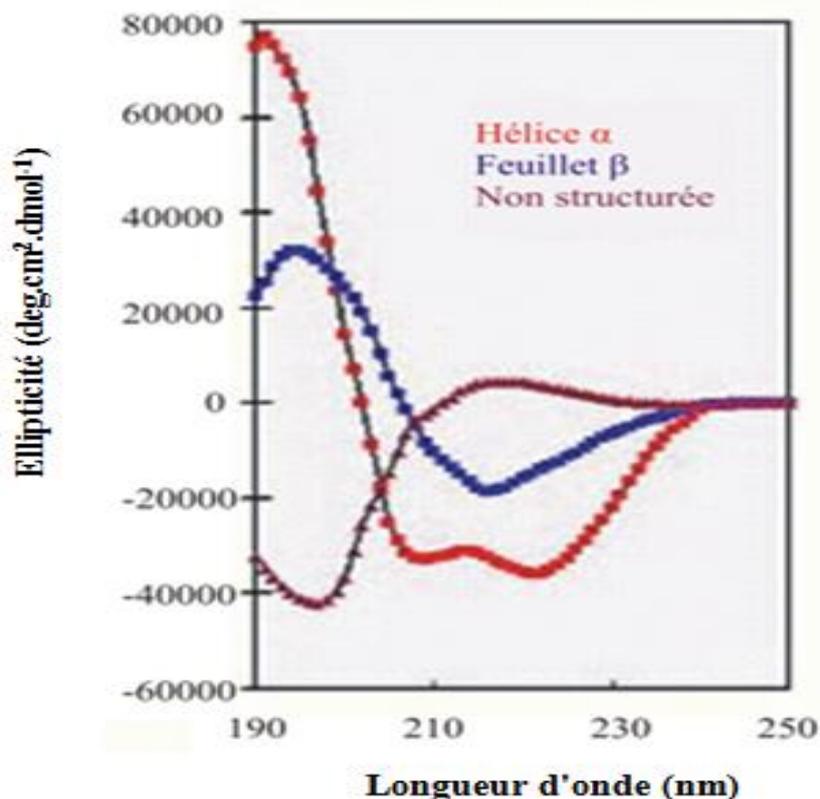


Figure 14. Spectres de dichroïsme circulaire caractéristiques de l'hélice α (Johnson et Tinoco, 1972), du feuillet β et de la structure désordonnée (Brahms et Brahms, 1980).

2.2.8.2. Conditions expérimentales

Les spectres de CD ont été enregistrés dans l'UV proche et lointain à l'aide d'un spectromètre de dichroïsme circulaire CD 6 (Jobin-Yvon, France ; figure 15). La température est maintenue constante à 25°C à l'aide d'un cryostat.

Les mesures dans l'UV lointain ont été effectuées pour l' α -La cameline native (A_1) et les deux formes désamidées A_2 et A_3 , dans une cuve en quartz (dont le trajet optique est de 1 mm ; capacité 300 μ L), les mesures dans l'UV proche sont elles effectuées dans une cuve en quartz de 1cm de trajet optique avec un volume d'échantillon de 1,5 mL.

Pour chaque mesure, trois acquisitions sont effectuées avec une vitesse de balayage de 0,2 nm toutes les 2 secondes (0.1 nm/seconde). Les solutions A₁, A₂ et A₃ sont préparées dans de l'eau ultra-pure à une concentration de 36 µM, 63 µM et 76 µM, respectivement, pour les mesures dans l'UV proche et de 3,6 µM, 12,7 µM et 7,65 µM, respectivement, pour les mesures dans l'UV lointain. La concentration de la solution protéique est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de 32 470 cm⁻¹ M⁻¹.

Les résultats ont été exprimés en unité d'ellipticité moyenne par résidu $[\theta]_{MRW}$ (deg.cm².dmol⁻¹ par résidu). L'ellipticité moyenne par résidu a été calculée à partir de l'équation $[\theta] = (\theta.100.MRW) / (c.l)$, où θ est l'ellipticité mesurée en degrés, MRW est la masse moyenne des résidus (Mean Residue Weight) égale à 113 Da, c, la concentration protéique (mg mL⁻¹), et l la longueur du trajet optique en cm. Le bruit de fond des spectres CD ont été lissés à l'aide du programme de l'appareil qui permet de différencier le signal du bruit de fond sans altérer la forme des bandes de CD. L'estimation de la proportion des éléments de structure secondaire (hélices α et brins β) a été déterminée avec le logiciel K2D3.

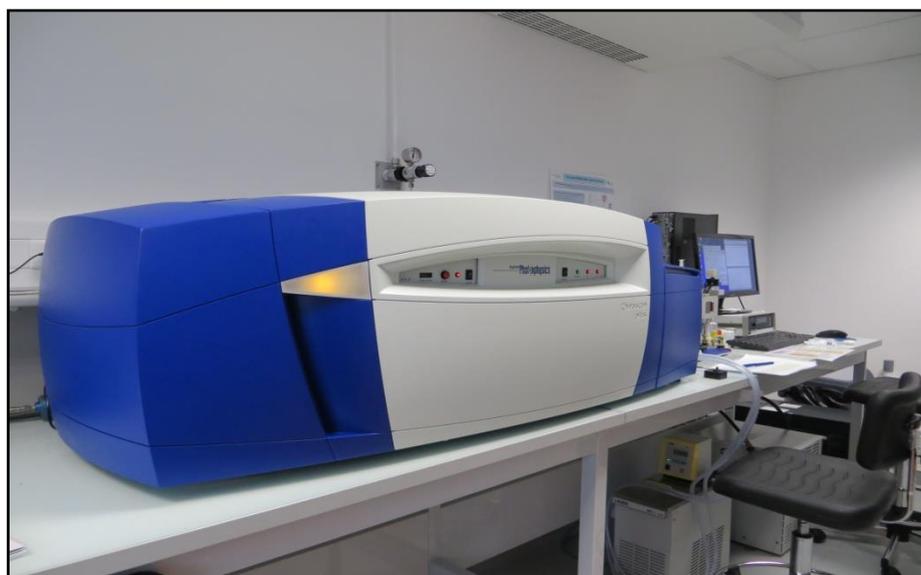


Figure 15 : Photographie d'un spectromètre de dichroïsme circulaire de type CD 6.

2.2.9. Microcalorimétrie différentielle à balayage de température (DSC)

2.2.9.1. Principe

La DSC consiste à mesurer la quantité de chaleur fournie à un échantillon pour élever sa température. Ces mesures sont réalisées en mode différentiel : deux cellules de mesure sont utilisées. La solution de protéine à étudier est placée dans la première, la deuxième étant réservée à la solution tampon. Ces deux cellules sont en contact thermique avec un thermostat et leur température est contrôlée. La température des deux solutions est augmentée

progressivement. Les puissances utilisées pour augmenter la température des échantillons sont mesurées.

La puissance utilisée par la solution tampon est soustraite à celle de la solution de protéine. Cette opération permet de distinguer les effets uniquement dus aux protéines. La courbe obtenue représente donc la puissance utilisée pour augmenter la température des protéines. Cette différence de puissance ΔP peut être traduite en termes de variation de capacité calorifique ΔC_p à pression constante. Ainsi, un traitement mathématique adéquat, permet d'obtenir les courbes de ΔC_p à partir des courbes de ΔP . Ce sont ces courbes ΔC_p qui sont utilisées pour calculer les paramètres thermodynamiques.

Dans le cas de la dénaturation d'une protéine suivie par DSC, deux phénomènes sont à l'origine de l'absorption de chaleur par l'échantillon :

- l'énergie nécessaire à l'augmentation de température de l'échantillon est puisée dans le milieu ambiant sous forme de chaleur ;
- l'énergie nécessaire à la destruction de la structure de la protéine est, elle aussi, puisée dans le milieu sous forme de chaleur.

2.2.9.2. Conditions expérimentales

Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un microcalorimètre à balayage de température (figure 16). Le balayage de température a été réalisé de 20 à 100°C avec une augmentation de 1°C min⁻¹ et des cellules de mesures de 0,5 mL. Une pression de 1,5 atm (30 psi) est maintenue dans ces cellules pour éviter l'apparition de bulles et l'ébullition des échantillons lors de l'élévation de température.

De surcroît, les solutions sont dégazées pendant 5 à 10 min avant chaque expérience. La ligne de base de l'appareil est obtenue en chauffant les deux cellules du calorimètre remplies avec le tampon expérimental (tampon acétate 10 mM, pH 6), puis les deux cellules sont à nouveau remplies : la cellule de contrôle avec le même tampon et la cellule de mesure avec la solution protéique d' α -La native ou désamidées à raison de 1 mg mL⁻¹. Les courbes expérimentales sont corrigées par soustraction de la ligne de base. La concentration de la solution protéique est déterminée par mesure de l'absorbance à 280 nm. Le coefficient d'extinction molaire utilisé est de 32 470 cm⁻¹ M⁻¹.

Les paramètres thermodynamiques de la dénaturation thermique de d' α -La native et désamidées ont été déterminés :

- l'enthalpie calorimétrique de dénaturation ΔH (en kJ mol⁻¹) est calculée à partir de la surface sous la courbe (intégration du pic) et correspond à l'enthalpie ou énergie totale dégagée par la réaction ;
- la variation de la chaleur spécifique ΔC_p (en kJ mol⁻¹ K⁻¹) de la protéine correspond à la différence de capacité calorifique (avant et après dénaturation) ;
- la température de demi-transition T_m (en °C ; m pour midpoint)



Figure 16 : Photographie d'un microcalorimètre à balayage de température, modèle Microcal VP-DSC.

2.2.10. Spectrométrie de masse à transformé de Fourier (FT-ICR-MS)

2.2.10.1. Principe

La spectrométrie de masse est une méthode qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance et d'obtenir des données structurales car, la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge (m/z) et, grâce au champ magnétique, les ions sont séparés et détectés (qualitativement et quantitativement).

2.2.10.2. Détermination de la masse

Le spectromètre de masse Ultra LTQ-FT (ThermoFisher Scientific, États-Unis ; figure 17) utilisé est équipé d'une source nano ESI TriVersaNanoMate (Advion Biosciences, Ithaca, NK, États-Unis) avec une précision de 5-10 ppm et une résolution de 100 000.

Les échantillons d' α -La camelines (A_1 , A_2 et A_3) ont été dissous dans un mélange d'acide formique/methanol (1:1, v/v) puis injectés sur un spectromètre de masse FT-ICR. A pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés se forment et le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées qui s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable.

Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes d'échantillonnage successifs faisant office de barrières avec les parties en aval maintenues sous un vide poussé ($<10^{-5}$ Torr).

Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes. Cette méthode produit donc des ions multichargés

Ces ions vont rentrer dans l'analyseur ICR pour être séparés selon le rapport masse/charge. L'analyseur à résonance cyclotronique d'ion se compose d'une cellule ICR qui comporte notamment six plaques sous tension, isolées les unes des autres. Les ions vont acquérir un mouvement dans le plan (xy) « cyclotronique », c'est-à-dire circulaire uniforme.

Une fois piégés dans la cellule, les ions ont donc la même trajectoire mais pas la même position à un instant déterminé. Les ions sont accélérés, mis en phase et voient le rayon de leur orbite augmenter. Le courant induit par le mouvement cohérent des ions de même m/z sera mesuré sur les plaques de détection : ce sera une sinusoïde amortie de fréquence cyclotronique. Le courant induit total mesuré sera donc la somme de sinusoïdes amorties des fréquences cyclotroniques correspondant aux ions de m/z excités par résonance. La fréquence cyclotron étant proportionnelle à $1/(m/z)$, l'inverse de la transformée de Fourier du courant obtenu permet d'aboutir au spectre de masse en m/z . La masse isotopique théorique de l' α -La cameline a été calculée par un logiciel informatique de calcul des masses (Molecular Weight Calculator 6.49 software).

2.2.10.3. Détermination du site de désamidation

Les échantillons d' α -La camelines (A_1 , A_2 et A_3) ont été dissous à raison de 1 mg mL^{-1} dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 50 mM , $\text{pH } 7,5$. Après réduction des ponts disulfures (dans du DTT à 10 mM , $37 \text{ }^\circ\text{C}$, pendant 2 h ensuite dans de l'iodoacétamide 50 mM , 30 min à l'obscurité), $2,5 \text{ } \mu\text{g}$ de chymotrypsine solubilisée dans un tampon de carbonate d'ammonium, 150 mM , $\text{pH } 7,5$, a été additionnée aux échantillons et incubés 16 h à 37°C sous agitation douce. La réaction d'hydrolyse est arrêtée par addition, au milieu réactionnel, de $10 \text{ } \mu\text{L}$ d'acide formique aqueux (10%) ; les peptides sont purifiés par chromatographie HPLC sur microcolonne C18 (Millipore, États-Unis).

Un volume de $2 \text{ } \mu\text{L}$ de chaque solution de peptides a été injecté sur une colonne capillaire en phase inverse C₁₈ (ThermoScientific, États-Unis). Un gradient de 2 à 40% de tampon B additionné au tampon A est appliqué pendant 45 min à débit constant de 220 nL min^{-1} :

- tampon A : eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique 98/2/0,1 (v/v/v) ;
- tampon B : eau/acétonitrile/acide trifluoroacétique 10/90/0,1(v/v/v).



Figure 17 : Photographie d'un spectromètre de masse LTQ-FT (ThermoFisher Scientific)

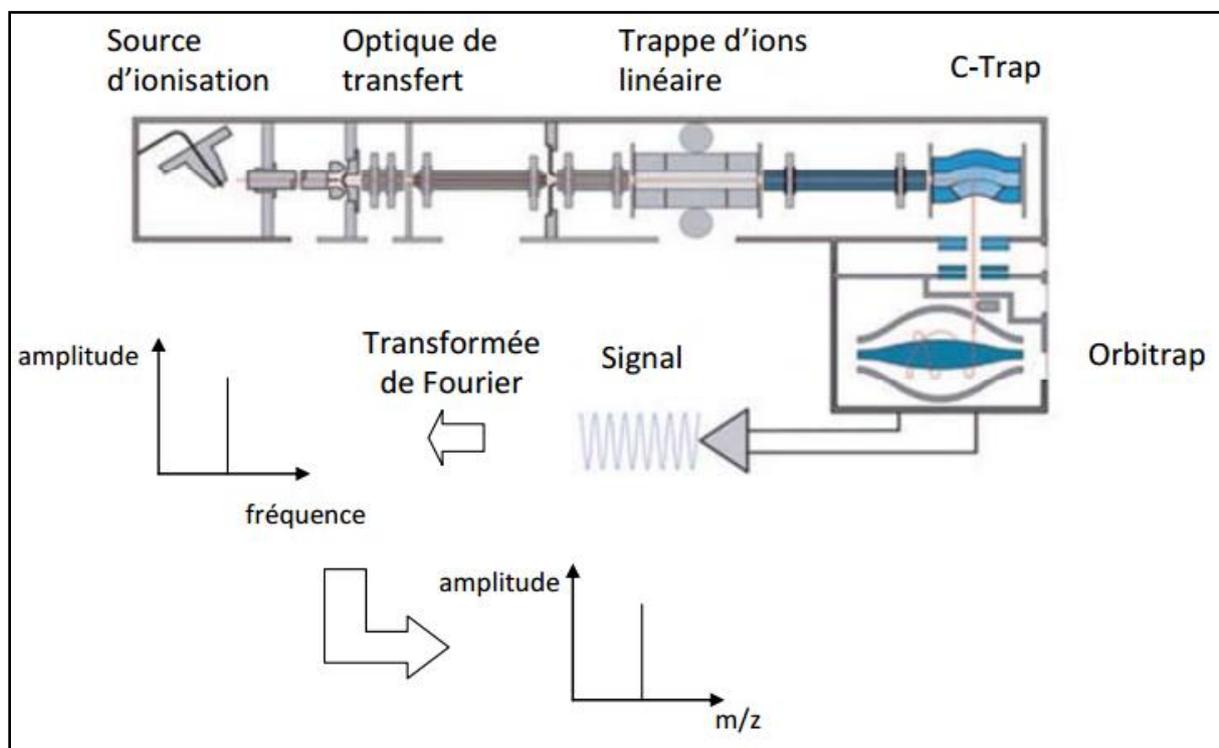


Figure 18 : Schéma du principe du fonctionnement d'un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap™

2.2.11. Modélisation moléculaire de l' α -lactalbumine cameline

La modélisation moléculaire implique l'utilisation de méthodes de calcul théoriques de dynamique moléculaire permettant de déterminer la représentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes d'une molécule et d'évaluer les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée.

La modélisation moléculaire associée à une représentation infographique des stéréochimies permet d'interpréter des phénomènes physico-chimiques, de suggérer des nouvelles expériences et d'analyser ainsi des résultats d'une façon plus critique que les expériences classiquement utilisées, mais ces 2 approches purement théoriques ou expérimentales sont complémentaires.

Le modèle de la structure tridimensionnelle de l' α -La cameline a été établi par homologie de structure à l'aide du serveur automatisé : <http://swissmodel.expasy.org> (Peitsch, 1995 ; Arnold *et al.*, 2006 ; Kiefer *et al.*, 2009). Le modèle utilisé par ce serveur est le code 1hml PDB correspondant à l' α -La humaine (la structure cristalline de l' α -La cameline n'a pas pour l'heure été déterminée). Le modèle a été minimisé et soumis à une dynamique moléculaire à l'aide du logiciel Amber 12 Molecular Dynamics Package (Case *et al.*, 2012).

RESULTATS & DISCUSSION

Chapitre I : Fractionnement et caractérisation des protéines sériques du lait camelin ; purification de l' α -Lactalbumine cameline

3.1.1. Mesure du pH et quantification des fractions protéiques

Les valeurs du pH et les résultats de dosage des fractions protéiques sont récapitulés dans le tableau II. Le pH du lait camelin analysés, issus de petits mélange, se situent en moyenne autour de $6,50 \pm 0,03$, ce qui est comparable aux valeurs rapportée par Siboukeur (2005) sur des échantillons de lait provenant de la même région (Ouargla). Ces résultats confirment aussi que le pH du lait de dromadaire est légèrement plus acide que celui du lait de vache ($6,70 \pm 0,06$).

Tableau II : Teneur en protéines totales (g L^{-1}) des différentes fractions du lait étudié.

Échantillon	Lait camelin	Lait bovin
pH	$6,50 \pm 0,03$	$6,70 \pm 0,06$
PT	31 ± 2	28 ± 2
PSc	$8,0 \pm 1,5$	6 ± 1
CN	23 ± 1	$20,5 \pm 1,5$

PT : protéines totales ; **PSc** : protéines totales du lactosérum camelin ; **CN** : caséines totales.

Le dosage de la fraction protéique donne une teneur moyenne en protéines totales de $31 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$, se situant au dessus de celle enregistrée pour le lait bovin ($28 \pm 2 \text{ g L}^{-1}$). Globalement, ces résultats sont comparables à ceux rapportés par d'autres auteurs (Kamoun, 1994 ; Mehaia *et al.*, 1995) même si des teneurs plus basses (29 g L^{-1}) ont été mentionnées (Elamin et Wilcox, 1992 et Khaskheli *et al.*, 2005), ainsi que des teneurs plus élevées (40 g L^{-1}) (Haddadin *et al.*, 2008 et Mohamed *et al.*, 1989).

Comme pour tous les composants chimiques du lait, la teneur en protéines est affectée par des facteurs environnementaux tels que l'alimentation et le climat (Khaskheli *et al.*, 2005 ; Konuspayeva *et al.*, 2008). Dans le cas du dromadaire, comme l'alimentation est la plus dépourvue en quantité et en qualité, d'autres facteurs, tels que l'adaptation et la physiologie particulière du dromadaire, sont susceptibles d'interférer sur la production (Farah, 1993). Kamoun (1994) signale que la teneur protéique du lait camelin est aussi fonction du stade de lactation où elle atteint une valeur minimale en fin de lactation.

La teneur en protéines sériques du lait camelin analysé est en moyenne de $8,0 \pm 1,5 \text{ g L}^{-1}$, ce qui représente environ 26% des protéines totales. Ce taux est supérieur à celui du lait bovin où les protéines sériques représentent environ $6 \pm 1 \text{ g L}^{-1}$ (soit 21%) des protéines totales.

Comparativement aux données bibliographiques, ces valeurs obtenues concordent avec celles rapporté par Kihal *et al* (1999) et Farah (1993) soit $8,5$ et 7 g L^{-1} respectivement.

Toutefois, des teneurs légèrement supérieures sont signalées par d'autres auteurs : 9 g L⁻¹ (Abu Lehia, 1987) et 10 g L⁻¹ (Bayoumi, 1990). Une teneur encore plus élevée (11 g L⁻¹) est rapportée par Elamin et Wilcox (1992) pour la race *Majaheem*.

L'importance quantitative de cette fraction protéique du lait chez le dromadaire se trouve rehaussé par les propriétés biologiques dévolues à ses différents constituants, dont notamment le rôle particulier joué par son système antimicrobien puissant constitué par un ensemble de protéines (lysozyme, lactoferrine, lactoperoxydase, immunoglobulines...etc) (Elagamy, 2000).

3.1.2. Analyse électrophorétique des protéines sériques camelines totales

L'isolement des protéines sériques a été conduit selon le schéma représenté sur la figure 11. Les travaux de Wangoh *et al* (1998) et Alim *et al* (2005) ont montré que la précipitation acide réalisée à pH 4,6 n'entraînait pas une précipitation totale des caséines du lait, contrairement à ce qui se passe dans le cas du lait bovin. Ceci nous a amené à précipiter ces fractions à pH légèrement plus acide (pH 4,3) comme préconisé par ces auteurs.

En ayant recours à l'analyse électrophorétique par la suite, nous visons à réaliser une pré-identification des entités protéiques séparées en confrontant les profils obtenus avec ceux du lait bovin et en s'appuyant sur les données bibliographiques compilées sur le lait camelin. Il est clair que l'identification de ces entités nécessite le recours au séquençage des extrémités N-terminales et leur comparaison à des séquences préalablement établies.

Par comparaison, les protéines solubles du lait de camelin (PSc) donnent des profils de séparation différents (PSc et PSv de la figure 19A). Il est admis que lors de l'analyse Alkaline-PAGE, les protéines du lactosérum bovin migrent en cinq bandes majeures classées par ordre décroissant de leur mobilité électrophorétique comme suit : Ig < BSA < α -La < β -Lg (B) < β -Lg (A).

Les PSc migrent aussi en cinq niveaux différents (notés de I à V ; figure 19A) où les bandes II et III correspondent respectivement aux SA et l' α -La selon Conti *et al* (1985) ; Farah (1986) et Ochirkhuyag (1998). La bande I migre à un niveau plus bas que l'IgG bovin, elle pourrait correspondre soit à ce composant ou au composant PP-3 camelin (appelé également lactophorin ou GlyCAM-1), d'autant plus que ce dernier existe dans le lait camelin à une teneur plus élevée et que son niveau de migration serait similaire à celui du PP-3 caprin (Mati *et al*, 1991 ; Kappeler *et al*, 1999 ; Girardet *et al*, 2000). Les travaux actuellement en cours au sein du laboratoire LABAB, précisément sur cette fraction, pourraient confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Les bandes IV et V pourraient correspondre à des variants de l' α -La en tenant compte du fait que Conti *et al* (1985) avaient mis en évidence l'existence de deux isoformes pour cette protéine ; alors que Ochirkhuyag (1998) a constaté que l'espèce « *Camelus bactrianus* » en présente trois isoformes. Elles pourraient aussi correspondre à des protéines spécifiques du lait camelin comme signalées par différents auteurs (Farah, 1986 ; Beg *et al*, 1987 ; Merin *et al*, 2000).

Nous pouvons relever de part cet électrophorégramme qu'il n'y a aucune bande de migration équivalente au niveau de la β -Lg bovine, ce qui confirmerait l'absence de cette protéine dans le lait camelin, comme signalé préalablement par d'autres auteurs (Farah, 1986 ; Ochirkhyag *et al.*, 1998 ; Merin *et al.*, 2001 ; Farah *et al.*, 2004). Signalons que Youcef *et al* (2009) ont noté l'absence de cette protéine dans des échantillons de lait issus de dromadaires algériens par le moyen de techniques immunologiques.

Notons que l'absence de la β -Lg a été rapportée dans le lait d'autres espèces tel que le lait humain et le lait des rongeurs (Hambling *et al.*, 1992). Comme cette protéine est fortement allergène, le lait de dromadaire pourrait être destiné de ce fait à la fabrication du lait infantile.

Dans le but d'estimer les masses moléculaires des protéines du lactosérum camelin, ces dernières ont été séparées et examinées dans les conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS (SDS-PAGE ; figure 19B). Il est établi que dans ce type de séparation, les protéines sériques bovines migrent ainsi selon l'ordre décroissant de leur MM : LF < SA < IgG < β -Lg < α -La. Par rapport à ces données, le profil électrophorétique des échantillons de PSc se présente sous quatre bandes majeures, bien distinctes mais n'ayant pas toutes la même intensité (notées de I à IV).

Les masses moléculaires correspondantes sont évaluées respectivement à 66 000 ; 45 000 ; 23 000 et 14 000 Da. Les bandes I et IV, de 66 000 et 14 000 Da, sont intenses, bien focalisées et migrent dans les zones de MM respectives de la SA et de l' α -La bovines.

Par rapport aux conditions natives, l' α -La cameline migre en SDS-PAGE en une seule bande (bande IV), ce qui suggère que les deux variants d' α -La cameline ont des MM très proches comme suggéré par Conti *et al* (1985) qui ont relevé des différences au niveau du pHi (5,1 et 5,3) de ces entités protéiques. Notons également l'absence de bande protéique dans la zone de migration de la β -Lg bovine, de masse moléculaire de 18 000 Da.

Comparés aux données bibliographiques, ces profils sont similaires à ceux rapportés par Farah (1986), qui en examinant les protéines sériques du lait camelin en SDS-PAGE, a révélé quatre bandes protéiques nettement séparées. Parmi ces bandes, celle ayant une MM égale à 66 000 Da serait l'homologue de la SA bovine selon ces auteurs et celle de 14 000 Da à l' α -La. Les autres bandes n'ont pas été identifiées clairement.

Par ailleurs, Ochirkhyag *et al* (1998) dans une étude sur les protéines sériques du lait camelin d'Egypte ont séparé 7 fractions protéiques par chromatographie échangeuse d'anions qu'ils ont par la suite caractérisées par SDS-PAGE. Selon ces auteurs, l'analyse de leur séquence N terminal montre que trois protéines (14 000, 67 000 et 78 000 Da) correspondraient respectivement à l' α -Lactalbumine, l'albumine sérique et la lactoferrine. Une autre protéine de 20 000 Da, très riche en résidus d'acides aminés basiques, a été dénommée protéine basique du sérum de lait de chamelle (*Camel Whey Basic Protein* ; CWBP). Les trois autres (16 000, 43 000 et 54 000 Da) ont été considérées comme étant des protéines spécifiques du lait camelin.

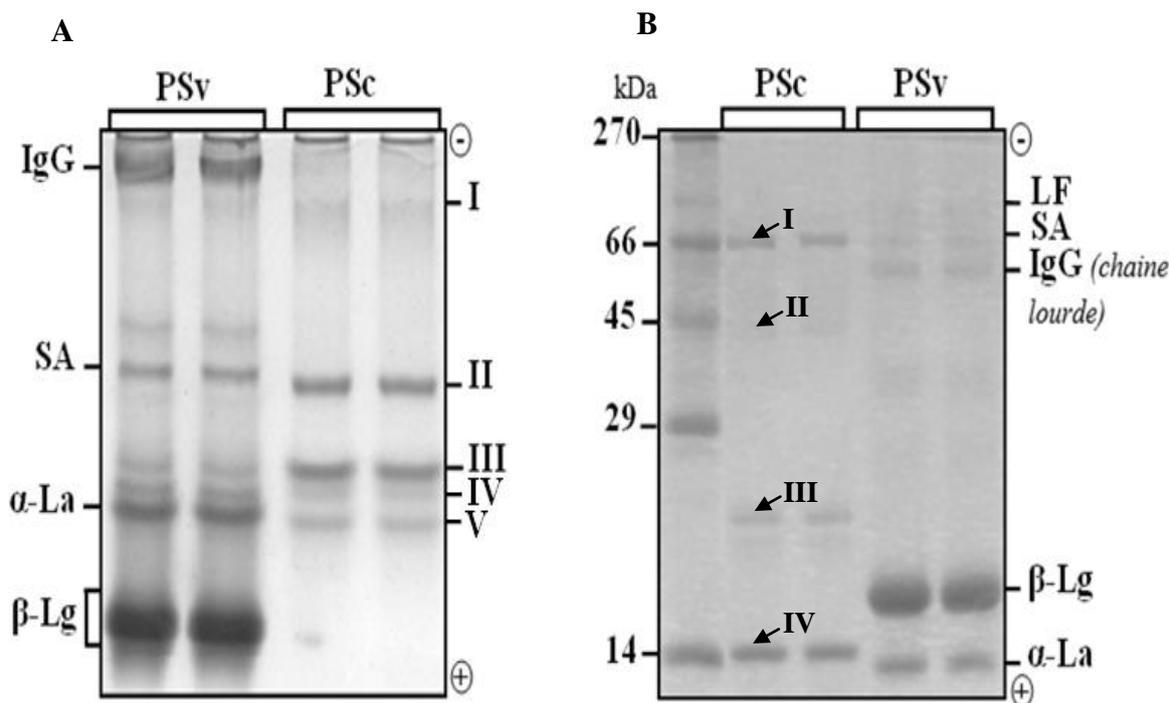


Figure 19. Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alcaline-PAGE ; A) et en présence de SDS (SDS-PAGE ; B) des protéines solubles du lactosérum bovin (PSv) et camelin (PSc).

La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250. IgG : immunoglobulines G ; SA, sérum albumine ; α-La : α-Lactalbumine ; β-Lg : β-Lactoglobuline.

Tableau III : Comparaison des MM (en kDa) des protéines sériques camelines et bovines déterminées par SDS-PAGE avec celles rapportées par différents auteurs.

Protéines sériques	Lait de chamelle					Lait de vache		
	Présente étude	Beg <i>et al</i> (1985)	Farah (1986)	Elagamy (1996)	Ochirkhyag <i>et al</i> (1998)	Présente étude	Zhang <i>et al</i> (2005)	Paty <i>et al</i> (2003)
SA	66	nd	66	69,6	67	67,9	65,4	69
α-La	14	14,6	14	nd	14	13,8	11,2	14,4
β-Lg	-	nd	nd	nd	nd	18	nd	18
Lf	-	nd	nd	79,5	78	79,6	76,9	nd

nd : non déterminé.

3.1.3. Fractionnement des protéines sériques camelines totales

Vu le grand intérêt que présentent les protéines du lactosérum sur le plan fonctionnel et biologique, la mise en œuvre de méthodes d'isolement relativement faciles à mettre en œuvre, peu coûteuses et surtout peu dénaturantes s'avère être une exigence requise dans les différentes investigations.

Dans ce cadre, les méthodes chromatographiques sont la plus part du temps incontournables pour séparer et purifier des entités à partir de mélanges protéiques.

3.1.3.1. Chromatographie échangeuse d'ions

Les PSc sont fractionnées par chromatographie échangeuse d'ions en basse pression, sur une colonne de DEAE-cellulose, grâce à une méthode mise au point au laboratoire lors de précédents travaux.

Le fractionnement permet l'obtention de trois zones principales d'absorption, d'intensité et de volume différents et les fractions collectées correspondantes sont appelées F₁, F₂ et F₃ (Figure 20). Le contenu de chaque fraction est analysé par Alkaline-PAGE (Figure 21).

D'après l'électrophorégramme obtenu, la fraction F₁ contient fortement l' α -La avec quelques contaminants, la fraction F₂ est un mélange de plusieurs bandes de faible intensité qui migrent plus loin que l' α -La cameline. Celles-ci pourraient correspondre à des protéines spécifiques du lait camelin voire à des fragments de protéoses-peptones et la fraction F₃ contient un mélange d'Ig et de SA.

Notons que très peu de travaux sont rapportés sur la séparation des protéines du lait camelin en ayant recours à la chromatographie d'échange d'ions en basse pression. Ces dernières années, la tendance à recourir aux techniques chromatographiques de haute performance est de mise sur le lait bovin mais aussi sur les laits d'autres espèces. C'est ainsi que Ellega *et al* (1999) et Bordin *et al* (2001) ont utilisé la chromatographie d'exclusion moléculaire et la chromatographie en phase inversée pour la séparation des protéines du lactosérum.

Bien que cette méthode, basée sur les différences de charges des molécules à séparer, est assez intéressante pour faire une pré-purification de l' α -La, étant donné qu'elle est obtenue dans les premières fractions éluées, nous avons essayé de voir si un autre paramètre (comme la taille de particules) pourrait être utilisé avantageusement pour séparer ces protéines contenues dans le lactosérum du lait de dromadaire.

3.1.3.2. Chromatographie de perméation sur gel

Les protéines sériques camelines sont séparées sur une colonne Sephacryl S200. Le profil chromatographique obtenu montre l'existence de trois fractions nommées F1, F2 et F3 (Figure 22). Ces fractions sont analysées par Alkaline-PAGE (Figure 23). L'électrophorégramme obtenu montre que la fraction F1 contient essentiellement la SA avec un haut degré de pureté, la fraction F2 contient l' α -La, tandis que, dans la fraction F3, nous constatons la présence de plusieurs bandes de faible intensité ayant une haute mobilité électrophorétique.

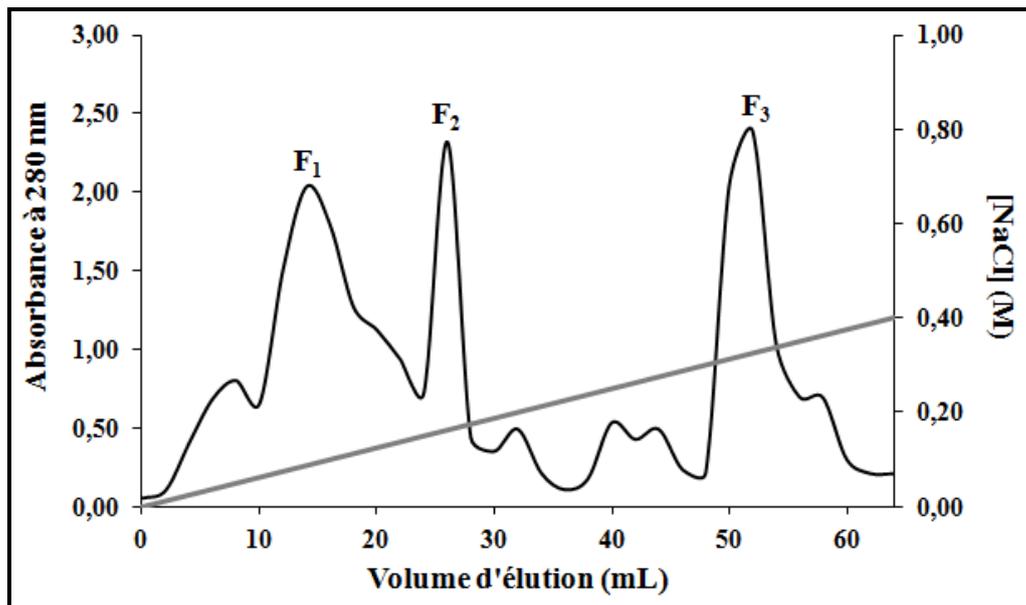


Figure 20. Séparation des protéines sériques camelines totales par chromatographie échangeuse d'ions en basse pression.

Colonne utilisée : DEAE Cellulose ; quantité de dépôt : 30 mg de protéines ; phase mobile (20 mM de tampon Tris-HCl, pH 7,2) ; gradient linéaire de 0 à 0,4 M de NaCl ; débit : 0,5 mL min⁻¹. F₁, F₂ et F₃: fractions collectées.

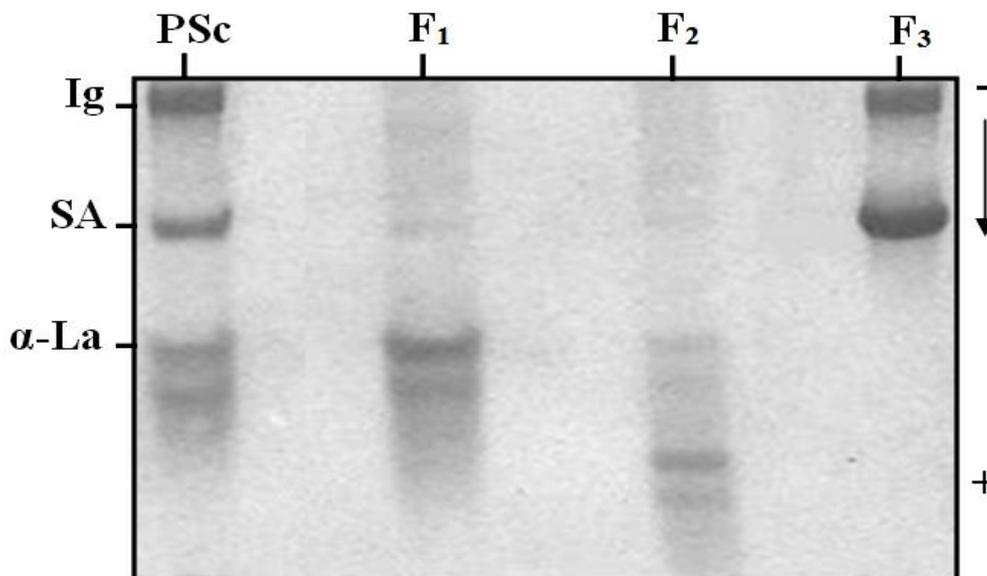


Figure 21. Profils électrophorétiques (Alcaline-PAGE) des fractions F₁, F₂ et F₃ purifiées par chromatographie basse pression sur colonne DEAE-cellulose.

La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250.

PSc : protéines sériques totales du lait camelin.

L'ordre d'éluion des protéines sériques camelines en fonction de la MM montre que la SA présente la MM la plus élevée (66 000 Da), suivi de l' α -La (14 000 Da), dans la deuxième fraction et enfin les protéines de la fraction F₃ qui ont la MM la plus faible (< 14 000 Da). Les résultats de cette chromatographie de perméation sur gel confirment ceux de l'électrophorèse SDS-PAGE où l'ordre de ces protéines en fonction de la MM est établi dans le sens : Ig > SA > α -La.

Le contrôle électrophorétique par Alkaline-PAGE des fractions obtenues (figure 23) révèle l'absence des Ig. Comme ces dernières sont des glycoprotéines, leur partie glucidique pourrait interagir avec le gel de Sephacryl, par les liaisons hydrogènes et hydrophobes entre la protéine et le support utilisé (Bonomo *et al*, 2003).

Levieux *et al* (2005) ont réalisé une séparation des protéines sériques camelines sur gel de Sephadex G200. Les profils obtenus montrent la présence de trois pics majeurs, où les Ig et la SA sont éluées dans la première fraction, la seconde contient la SA et la dernière contient l' α -La avec un haut degré de pureté.

En comparant les résultats des deux types de chromatographie utilisés (échange d'ions et perméation), nous relevons la difficulté de pouvoir séparer des entités protéiques avec un haut degré de pureté en ayant recours seulement à un seul paramètre (charge ou taille).

C'est pour ces raisons que nous avons envisagé dans un premier temps de réaliser une perméation pour la seule fraction F1 afin de purifier davantage l' α -La. Au moment où nous allions entamer ces essais, nous avons eu l'opportunité d'utiliser en France, l'échange d'ions dans les conditions de la haute performance (FPLC) qui avait montré préalablement, selon les travaux de Levieux *et al*. (2005), que l' α -La pouvait être obtenue en une seule étape de séparation avec un haut degré de pureté

3.1.4. Purification de l' α -Lactalbumine par chromatographie FPLC

En éluant les PSc sur une colonne FPLC échangeuse d'ions sur Mono Q, nous obtenons deux fractions majeures. La première notée A₁ contient l' α -La cameline et la seconde contient le reste des protéines qui sont éluées dans le produit de lavage (Figure 24). La pureté de l' α -La cameline contenue dans la fraction notée A₁ est contrôlée par Alkaline-PAGE (Figure 25).

L'absence de sensibilité au réactif de schiff suggère qu'il y'a absence de glycosylation pour cette protéine (résultats non présentés). Cette observation est en accord avec les travaux de Kappeler (1998) et d'Ochirkhuyag *et al*. (1998) qui signalent l'absence de forme glycosylée pour l' α -La cameline, à l'inverse de l'homologue bovin où quatorze structures glycaniques différentes ont été identifiées (Slangen et Visser, 1999).

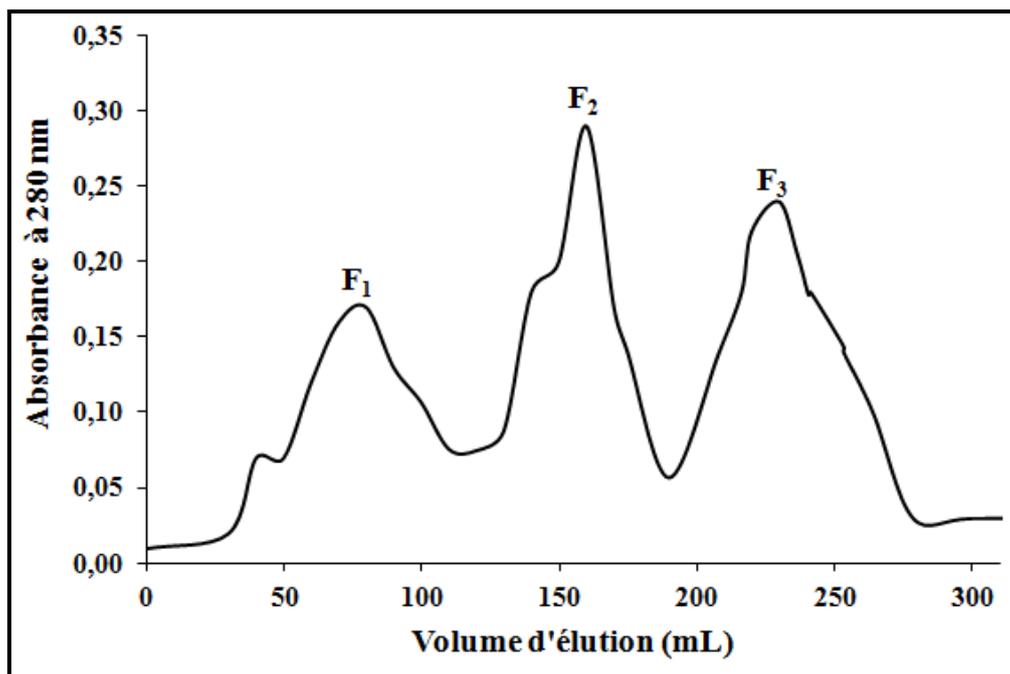


Figure 22. Séparation des protéines sériques camelines totales par chromatographie de perméation sur gel en basse pression.

Colonne utilisée : Sephacryl S200 ; quantité de dépôt : 100 mg de protéines ; phase mobile (20 mM de tampon Tris-HCl, pH 7,4) ; débit : 0,8 mL min⁻¹. F₁, F₂ et F₃ : fractions collectées.

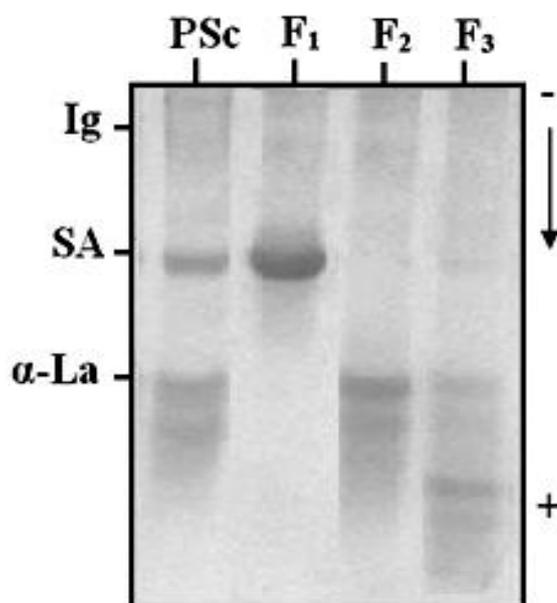


Figure 23. Profil électrophorétique (Alcaline-PAGE) des fractions F₁, F₂ et F₃ purifiées par chromatographie sur Sephacryl S200.

Dépôt : 40 µL correspondant à 40 µg ; révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250.

Levieux *et al.* (2005), sur du lait de dromadaire, avaient montré la présence d'un pic correspondant à l' α -La qui migre dans des conditions natives en deux bandes dont la plus intense se situe au même niveau que son homologue bovin ; tandis qu'en SDS-PAGE, l' α -La migre en une seule bande de 14 kDa.

Le recours à la haute pression dans la séparation en échange d'ions (FPLC) a ainsi permis d'obtenir l' α -La cameline avec un degré de pureté élevé. De plus, cette technique est relativement avantageuse pour le lait de dromadaire étant donné que dans ce cas on évite la plus ou moins grande contamination par la β -Lg qui est absente dans ce lait et qui pose problème dans le cas de la séparation des protéines lactosériques de vache.

Signalons que Jrad *et al.* (2014) ont utilisé une colonne Hitrap-CM pour le fractionnement des lactoprotéines camelines. Selon ces auteurs, le chromatogramme obtenu montre la présence de cinq fractions majeures. Selon ces auteurs, L' α -La cameline est co-éluee en premier avec l'albumine sérique. Étant donné que leurs pHi sont acides, ces protéines ne s'adsorbent pas sur la résine et sont éluées dans le volume mort de la colonne. Le reste des fractions contient, dans l'ordre croissant de leur élution, les immunoglobulines, les protéines sériques basiques (CWBP) et enfin la lactoferrine. Cette dernière étant très basique (pHi de 8,63) elle est éluee avec un haut degré de pureté.

Sur le lait de chamelle aussi, Beg *et al.* (1984 ; 1985) ainsi que Konuspayeva *et al.* (2008) ont utilisé la chromatographie d'exclusion de taille sur un gel de Sephadex pour séparer certaines protéines lactosériques et ils ont complété leur purification en utilisant des échangeurs d'ions sur FPLC.

Cette technique chromatographique est aussi largement utilisée pour le fractionnement des protéines sériques du lait de plusieurs espèces. Ainsi, Felipe et Andrew (1997) ont appliqué le gel Superdex en FPLC pour isoler les séroprotéines du lait de vache, brebis et de chèvre aboutissant à une très bonne séparation de la β -Lg et de l' α -La ; tandis que Yoshida (1990), sur Sephacryl S200, a obtenu 5 pics principaux. Il a affiné par la suite le protocole en ayant recours à des précipitations salines pour la purification de la β -Lg et de l' α -La.

Les protéines lactosériques équines sont séparées en FPLC analytique d'échange d'anions sur une colonne Mono Q en trois fractions majeures F1, F2 et F3. La fraction F1 contient le lysozyme, F2 contient l' α -La équine et F3 correspond à la β -Lg (N'Negue *et al.*, 2006). Les protéines lactosériques bovines ont été fractionnées par les mêmes auteurs en utilisant une colonne semi-préparative TSK-DEAE, deux fractions majeures ont été obtenues correspondant à α -La et la β -LG.

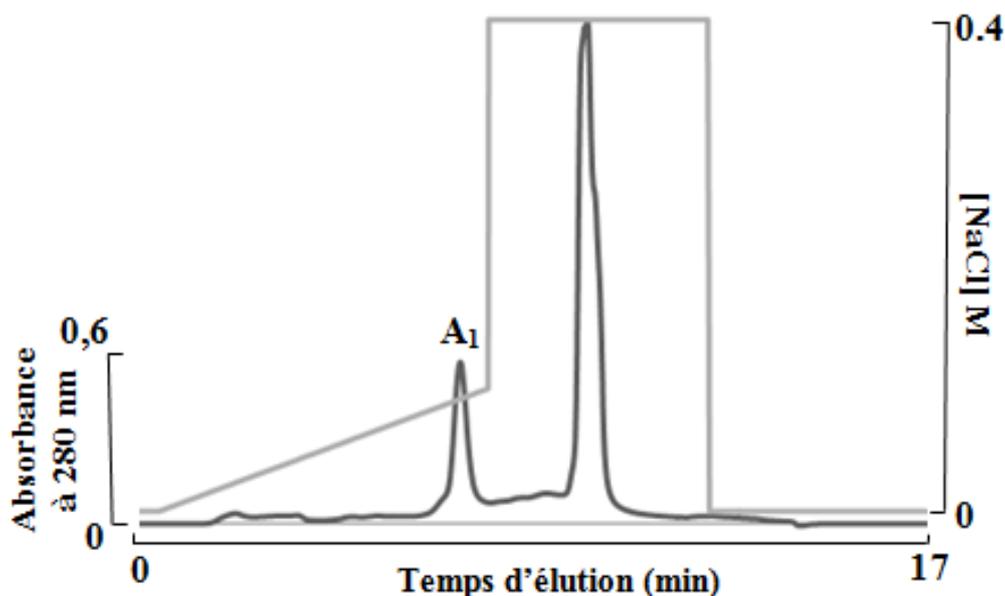


Figure 24. Chromatogramme en FPLC semi-préparative d'échange d'anions des protéines lactosériques camelines.

Colonne utilisée : Mono Q (GL 10/100); quantité de dépôt : 100 mg de protéines ; phase mobile (20 mM de tampon Tris-HCl, pH 7,4); l'éluion est réalisée avec un gradient linéaire de 0 à 0,4 M de NaCl ; débit : 2 mL min⁻¹ ; détection à 280 nm ; A₁ : fraction collectée.

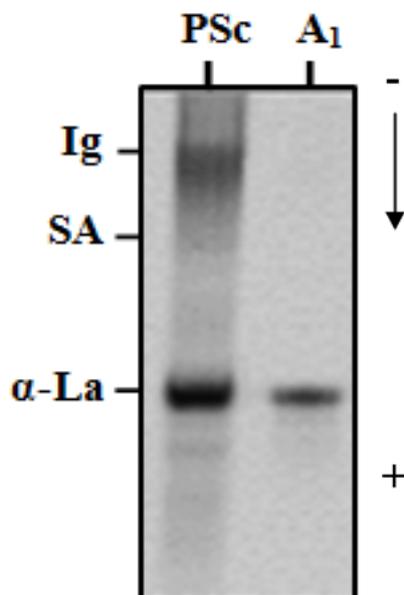


Figure 25. Contrôle de pureté par électrophorèse (Alcaline-PAGE) de la fraction A₁ obtenue par FPLC.

Dépôt : 10 μL correspondant à 20 μg de PSc et 10 μg de la fraction A₁ ; révélation des protéines avec le bleu de Coomassie R250. PSc : protéines lactosériques camelines

Chapitre II : mise en évidence de la désamination non enzymatique de l' α -Lactalbumine et cinétique de la réaction

Etant donné l'hétérogénéité de l' α -La cameline, mise en évidence dans la première partie de cette présente étude, nous avons émis l'hypothèse que cette protéine pourrait être sujette à une modification chimique qui serait à l'origine de l'apparition des deux bandes supplémentaires observées en Alkaline-PAGE.

3.2.1. Modification chimique de l' α -Lactalbumine en fonction du pH

La vitesse de modification de l' α -La A₁ de chamelle, à 37°C, aux pH 7,4 et 8,4 dans un tampon phosphate de sodium 150 mM a été étudiée. Le choix de ce tampon est lié au fait que la désamination non enzymatique est un phénomène qui est plus rapide en tampon phosphate de sodium qu'en tampon Tris-HCl, pour une même molarité et un même pH (Robinson et Robinson, 2004). Selon Robinson et Robinson (2001), à pH 7,4 et à 37°C, un tampon phosphate de sodium 150 mM augmente la vitesse de désamination d'un facteur de 2 à 3 par rapport à un tampon Tris-HCl 150 mM.

Le fait que cette vitesse est plus importante en présence d'ions phosphate que d'ions Tris s'explique qu'à pH 7,4, les groupements phosphates sont chargés négativement, car deux des trois pK_a (environ 2,0, 7,0 et 12,0) sont inférieurs à 7,4. Ces ions phosphates vont déclencher la réaction de désamination en piégeant, à l'aide de l'intervention d'une molécule d'eau, l'hydrogène de l'azote de la liaison peptidique adjacente à un résidu Asn (Figure 24). Le Tris (pK_a = 8,1), sous une forme protonée à pH 7,4, va limiter l'activation de l'azote et par conséquent la désamination du résidu Asn.

3.2.1.1. Suivi de la modification de l' α -La cameline par FPLC

Les chromatogrammes (figures 26 et 27) obtenus par FPLC d'échange d'anions, sur une colonne Mono Q, permettent de suivre la modification au cours du temps de l' α -La du lait camelin respectivement dans un tampon phosphate, pH 7,4 et un tampon Tris-HCl, pH 8,4. Cette méthode est avantageuse, car le temps de l'analyse est très court, ce qui limite les possibles modifications supplémentaires durant le temps d'analyse.

Les profils obtenus aux pH considérés (7,4 et 8,4), montrent, qu'au cours du temps, il y a diminution du pic correspondant à la fraction de l' α -La native, notée A₁, et l'apparition d'un nouveau pic noté A₂, avec un temps de rétention plus long (par rapport à A₁), ce qui révèle une augmentation de la charge négative de A₂. Le reste des PSc camelins sont éliminées dans la fraction de lavage de la colonne.

Ces résultats confirment l'instabilité de l' α -La cameline en tampon phosphate de sodium 150 mM, 37°C aux pH 7,4 et 8,4 et que des charges négatives supplémentaires sont générées plus ou moins spontanément selon le pH au cours de l'incubation, ce qui conduit à l'apparition d'une nouvelle isoforme A₂ issue de la transformation de A₁.

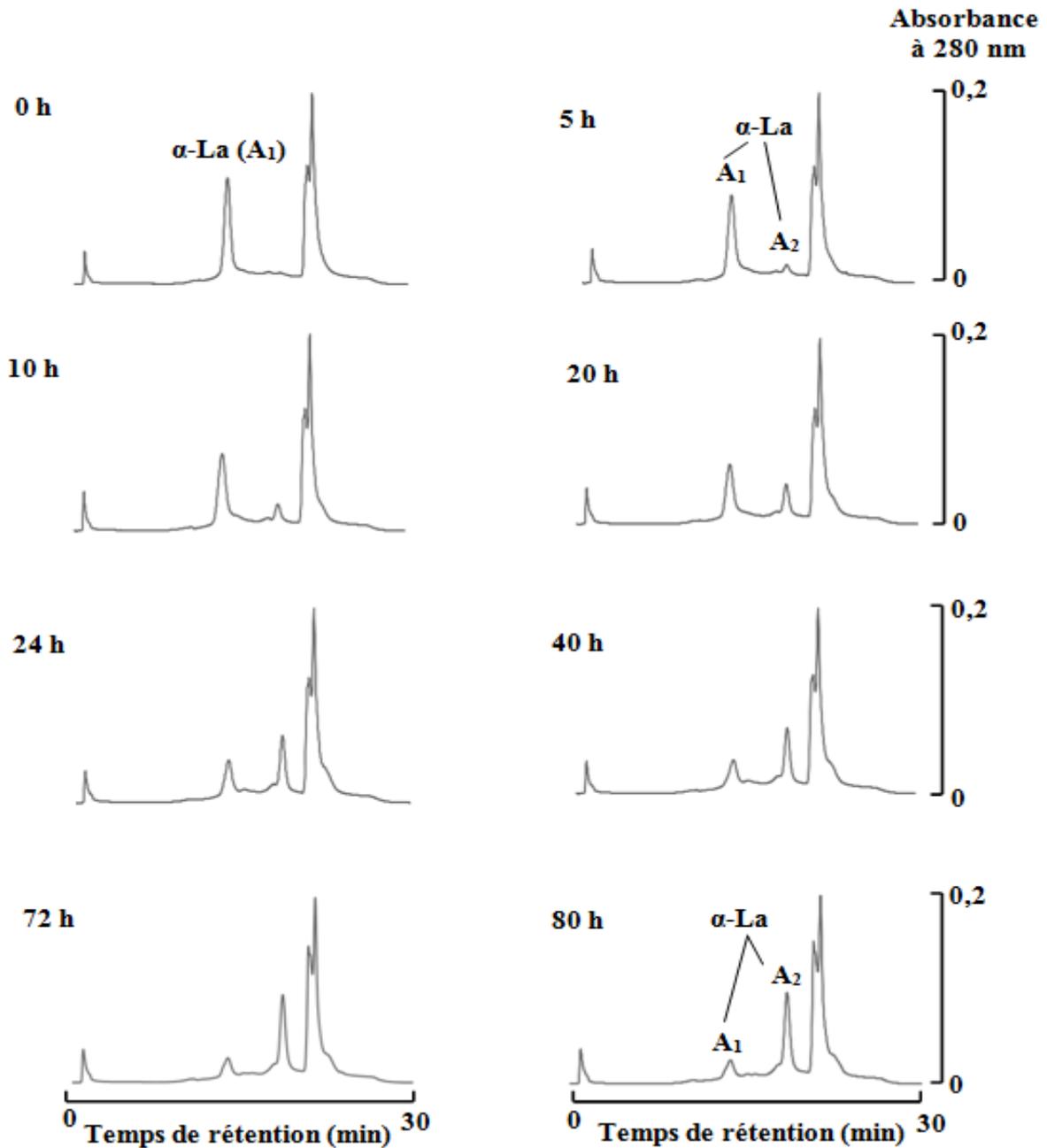


Figure 26. Profils chromatographiques en FPLC d'échange d'anions sur mono Q permettant de suivre la modification de l' α -Lactalbumine cameline A_1 en isoforme A_2 , en fonction du temps d'incubation (0 à 80 h) dans un tampon phosphate de sodium 150 mM, pH 7,4.

Elution : gradient linéaire de 0 à 0,2 M de NaCl ; débit : 1 mL min^{-1} ; détection : 280 nm.

A_1 et A_2 , isoformes 1 et 2 de l' α -Lactalbumine.

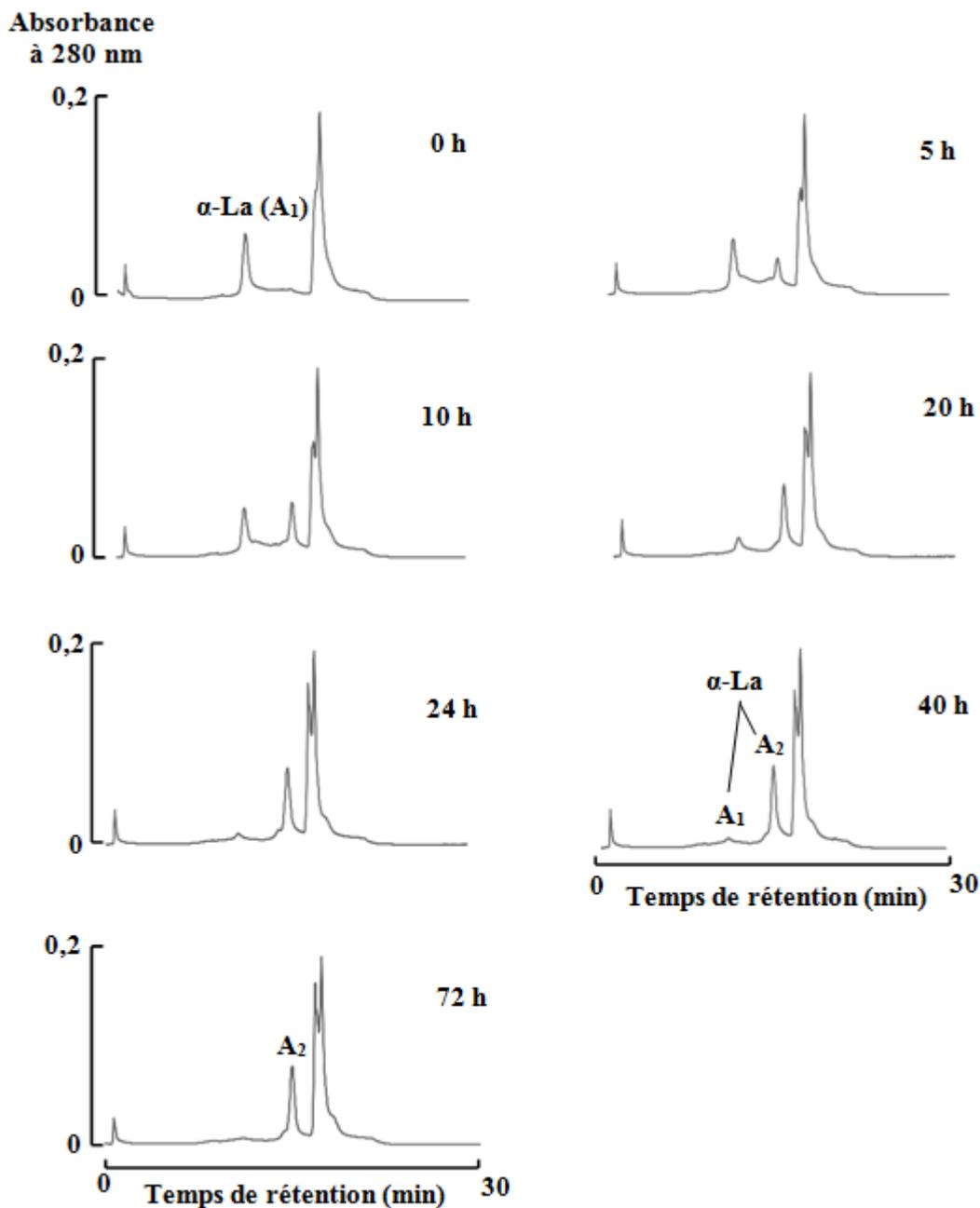


Figure 27. Profils chromatographiques en FPLC d'échange d'anions sur mono Q permettant de suivre la modification de l' α -Lactalbumine cameline A₁ en isoforme A₂, en fonction du temps d'incubation (0 à 72 h) dans un tampon phosphate de sodium 150 mM, pH 8,4.

Elution : gradient linéaire de 0 à 0,2 M de NaCl ; Débit : 1 mL min⁻¹ ; détection : 280 nm.

A₁ et A₂, isoformes 1 et 2 de l' α -Lactalbumine.

En comparant de près les chromatogrammes obtenus aux pH considérés, nous observons que la formation du pic A_2 est plus rapide à pH 8,4 qu'à pH 7,4.

De plus, nous avons montré que l'isoforme A_2 n'est pas générée lorsqu'on incube l' α -La cameline à 37°C pendant 16 h, dans une solution à pH 2,0 contenant 5% (v/v) d'acétonitrile et 0,1 % (v/v) d'acide trifluoroacétique (condition d'HPLC en phase inversée). Ainsi, l'isoforme A_2 pourrait bien être une forme désamidée de l'isoforme native A_1 . L' α -La du lait camelin est de ce fait stable à pH 2,0.

La transformation de l'isoforme A_1 en isoforme A_2 pourrait donc être liée à un processus de désamidation spontanée. Ce phénomène ne peut être dû à la présence ou l'absence du calcium dans l'environnement, comme il a été démontré par Girardet *et al.* (2004). Les études par spectrométrie de masse montrent qu'aucune modification enzymatique ou chimique importante telle qu'une protéolyse, une lactosylation ou une oligomérisation ne peut expliquer la présence des deux isoformes d' α -La équine (N'Negue, 2006).

La désamidation non-enzymatique d'Asn est la modification la plus fréquente qui a pour résultat l'addition de charges négatives à la protéine native (Nonoaka *et al.*, 2008). Comme la présence des deux sites Asn¹⁶-Gly¹⁷ et Asn⁴⁵-Gly⁴⁶ dans la séquence primaire de l' α -La cameline (Figure 1) rend cette protéine sujette à une désamidation non-enzymatique à pH alcalin ou proche de la neutralité, nous avons émis l'hypothèse que l'hétérogénéité observée pour l' α -La cameline est liée à ce phénomène de désamidation non-enzymatique des résidus Asn. D'autant que de nombreuses protéines, qui portent la séquence Asn-Gly ou Asn-Ser, telle que l' α -La du lait équien (Girardet *et al.*, 2004) ou le lysozyme canin (Nonoaka *et al.*, 2008) sont susceptibles à une désamidation non-enzymatique à pH alcalin.

3.2.1.2. Suivi de la modification de l' α -La cameline par électrophorèse

L'expérience de désamidation a été réalisée sur les PSc dans un tampon phosphate de sodium à 150 mM, 37°C à pH 7,4 et 8,4. Des volumes de 100 μ L sont prélevés régulièrement (jusqu'à 96 h) et analysées par Alkaline-PAGE (Figure 28).

Le profil électrophorétique montre que l'intensité de la bande A_1 , qui correspond à l' α -La native du lait camelin, diminue au cours du temps et, en parallèle, nous observons l'apparition de la bande A_2 qui migre plus loin que la bande A_1 et dont l'intensité augmente au cours du temps. Cela est corrélé à l'ordre d'éluion observé par FPLC d'échange d'anions.

Cette nouvelle bande correspond vraisemblablement à la fraction ayant subi une désamidation. Les charges effectives à la surface des protéines A_1 et A_2 sont différentes, puisque leurs comportements électrophorétiques et chromatographiques sont sensiblement différents.

Le profil électrophorétique des PSc incubées à pH 8,4 (Figure 29) montre l'apparition d'une bande supplémentaire, notée A_3 , en plus de A_1 et A_2 , dont l'intensité augmente au cours du temps et qui migre plus loin que les bandes A_1 et A_2 . La bande A_3 n'apparaît pas pour les PSc incubée dans les mêmes conditions à pH 7,4. D'autant plus que les bandes A_2 et A_3 qui apparaissent respectivement à pH 7,4 et 8,4 sont absentes avant la mise en incubation.

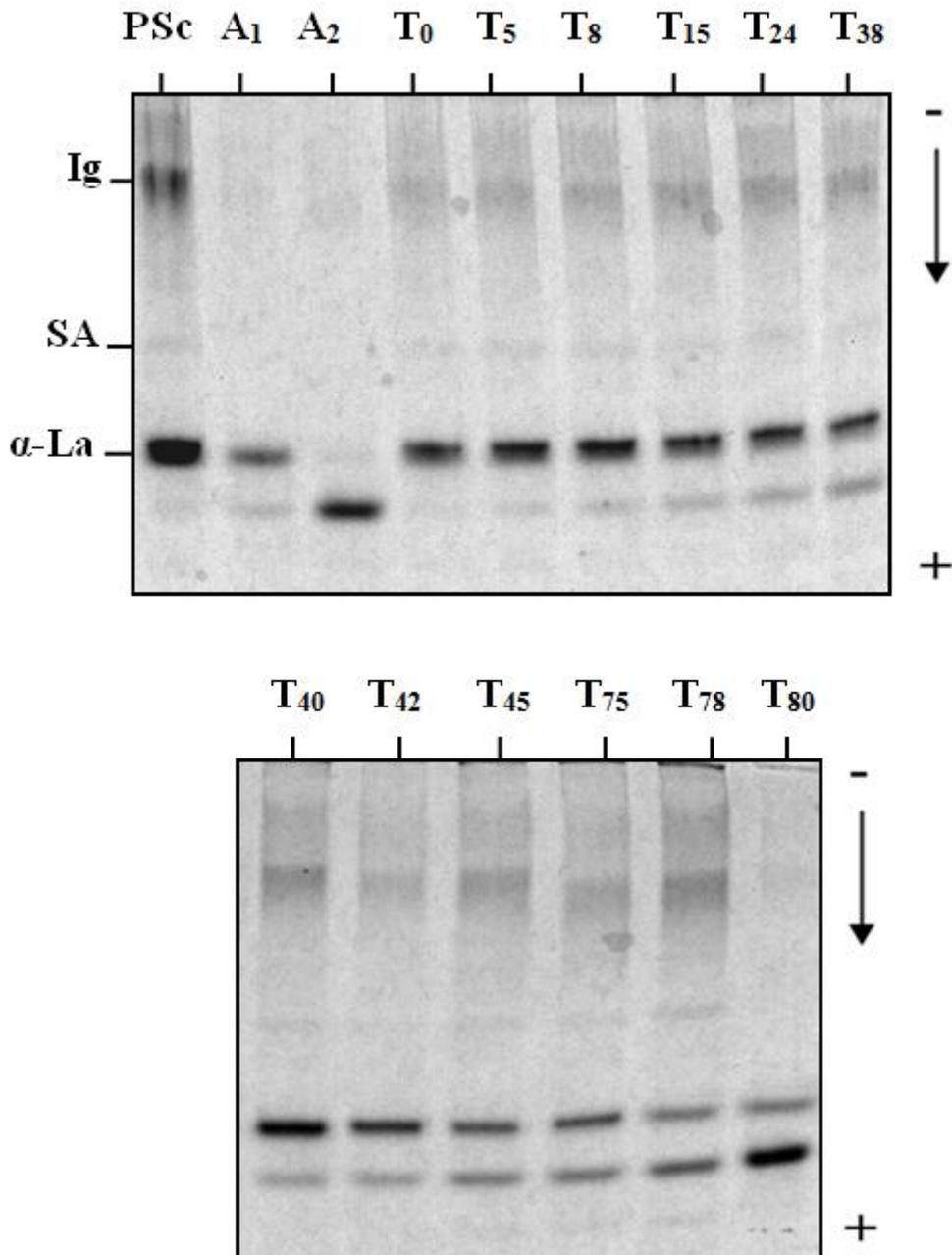


Figure 28. Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc (2 mg mL^{-1}) solubilisées dans le tampon d'échantillon, pH 8,9.

A₁ (native) et A₂ (désamidée) : fractions de l' α -La purifiées par FPLC ;

les puits numérotés correspondent aux protéines sériques camelines incubées à 37°C dans le tampon phosphate 150 mM, pH 7,4 .

10 μL de chaque prélèvement sont additionnés de 20 μL de tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9, contenant 50% (v/v) de glycérol et 0,01% (v/v) de bleu de bromophénol. Des volumes de 10 μL sont déposés dans le gel. Les fractions A₁ et A₂ sont à 1 mg mL^{-1} .

La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250.

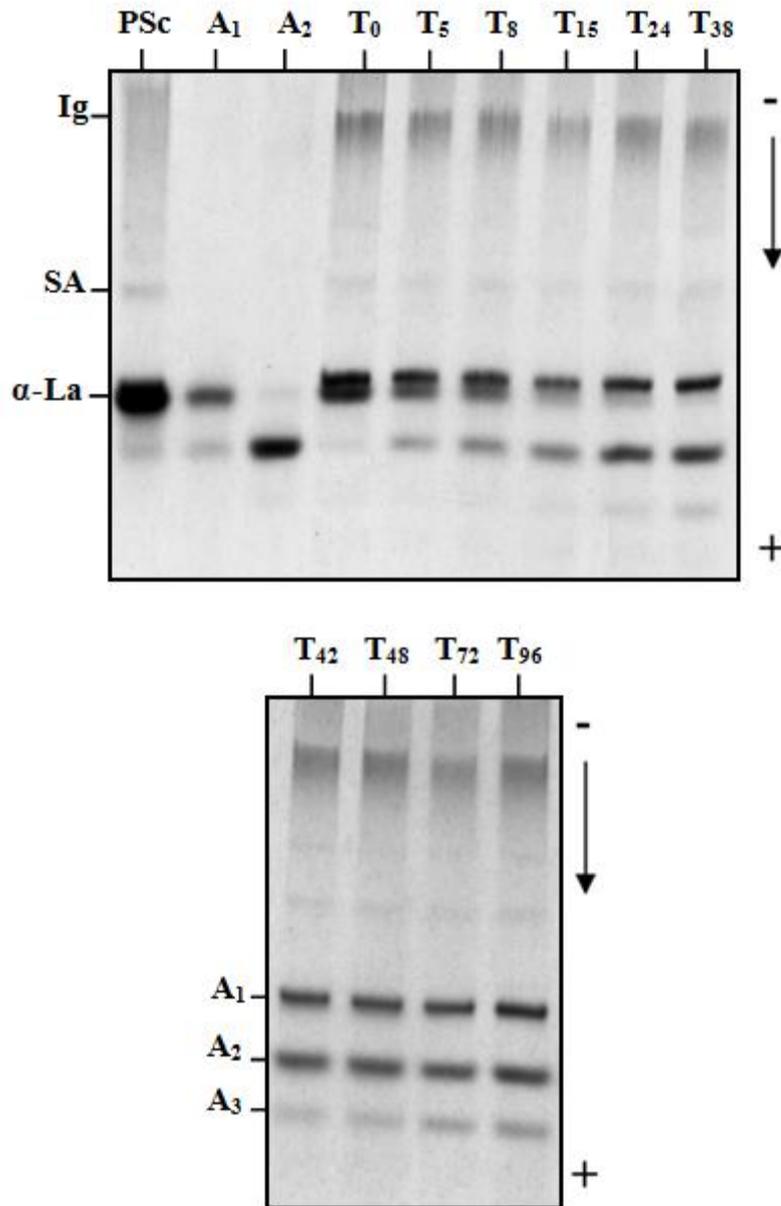


Figure 29. Profils électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alkaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc (2 mg mL^{-1}) solubilisées dans le tampon d'échantillon, pH 8,9.

A₁ (native) et A₂ (désamidée) : fractions de l'α-La purifiées par FPLC ;
 les puits numérotés correspondent aux protéines sériques camelines incubées à 37°C dans le tampon phosphate 150 mM, pH 8,4.
 10 μL de chaque prélèvement sont additionnés de 20 μL de tampon Tris-HCl 0,38 M, pH 8,9, contenant 50% (v/v) de glycérol et 0,01% (v/v) de bleu de bromophénol. Des volumes de 10 μL sont déposés dans le gel. Les fractions A₁ et A₂ sont à 1 mg mL^{-1} .
 La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250.

3.2.2. Purification de l'isoforme A₃

Afin de purifier l'isoforme A₃, nous avons utilisé un gradient linéaire de la force ionique de 42 min au lieu de 30 min utilisé jusqu'au là.

Les profils FPLC obtenus, avec les PSc incubées dans le tampon phosphate 150 mM, 37°C à pH 8,4 (Figure 30) montrent l'apparition, au cours du temps de deux nouveaux pics notés A₂ et A₃ au détriment du pic A₁. La vitesse d'évolution du pic A₃ est très lente. L'aire de ce pic a été déterminée à partir des profils chromatographiques.

Le pic A₃ présente le temps de rétention le plus long comparativement aux pics A₁ et A₂, ce qui révèle une augmentation de la charge négative de A₃. Le reste des PSc camelines sont éliminées dans le lavage de la colonne.

Les trois isoformes (A₁, A₂ et A₃) de l' α -La cameline sont fractionnées dans une colonne Hitrap-CM afin d'éliminer les Ig puis élués sur une colonne Mono-Q. La pureté des trois isoformes est contrôlée par électrophorèse Alkaline-PAGE. La bande de mobilité électrophorétique la plus faible correspond à l' α -La cameline native. Les deux autres bandes correspondent aux isoformes A₂ et A₃ de l' α -La (Figure 31).

L'isoforme A₃, la plus acide, est d'avantage retenue par la colonne Mono Q, car elle pourrait posséder plus de charges négatives effectives que l'isoforme A₁ et l'isoforme A₂. Ceci expliquerait aussi le fait que cette isoforme migre plus rapidement vers l'anode que les isoformes A₁ et A₂ (Figure 31).

Il est à noter, que l'isoforme A₂ est obtenue aux pH 7,4 et 8,4 tandis que l'isoforme A₃ est formée uniquement à pH alcalin (8,4). Ceci peut être expliqué par la position des deux séquences Asn-Gly dans la structure tridimensionnelle de l' α -La du lait camelin, qui reste à vérifier plus loin par une étude de modélisation moléculaire.

La cinétique de désamidation de l' α -La du lait camelin a été aussi étudiée dans les mêmes conditions décrites précédemment en présence d'un agent réducteur, le 2-mercaptoéthanol. Les résultats obtenus (non présentés) ne montrent pas de différences sensibles comparativement à ceux obtenus en absence d'agent réducteur.

3.2.3. Paramètres cinétiques de la désamidation de l' α -La cameline

La réaction de modification chimique de l' α -La suit une cinétique de premier ordre. La constante de vitesse observée (k_{obs}), pour la disparition du résidu Asn est déterminée par la méthode de Song *et al.* (2001) selon l'équation suivante :

$$A/(A+A_0) = A_0 e^{-k_{obs} t}$$

avec : A₀ = l'aire du pic correspondant à l' α -La native ;

A = l'aire du pic correspondant à l' α -La désamidée après incubation

t = le temps d'incubation.

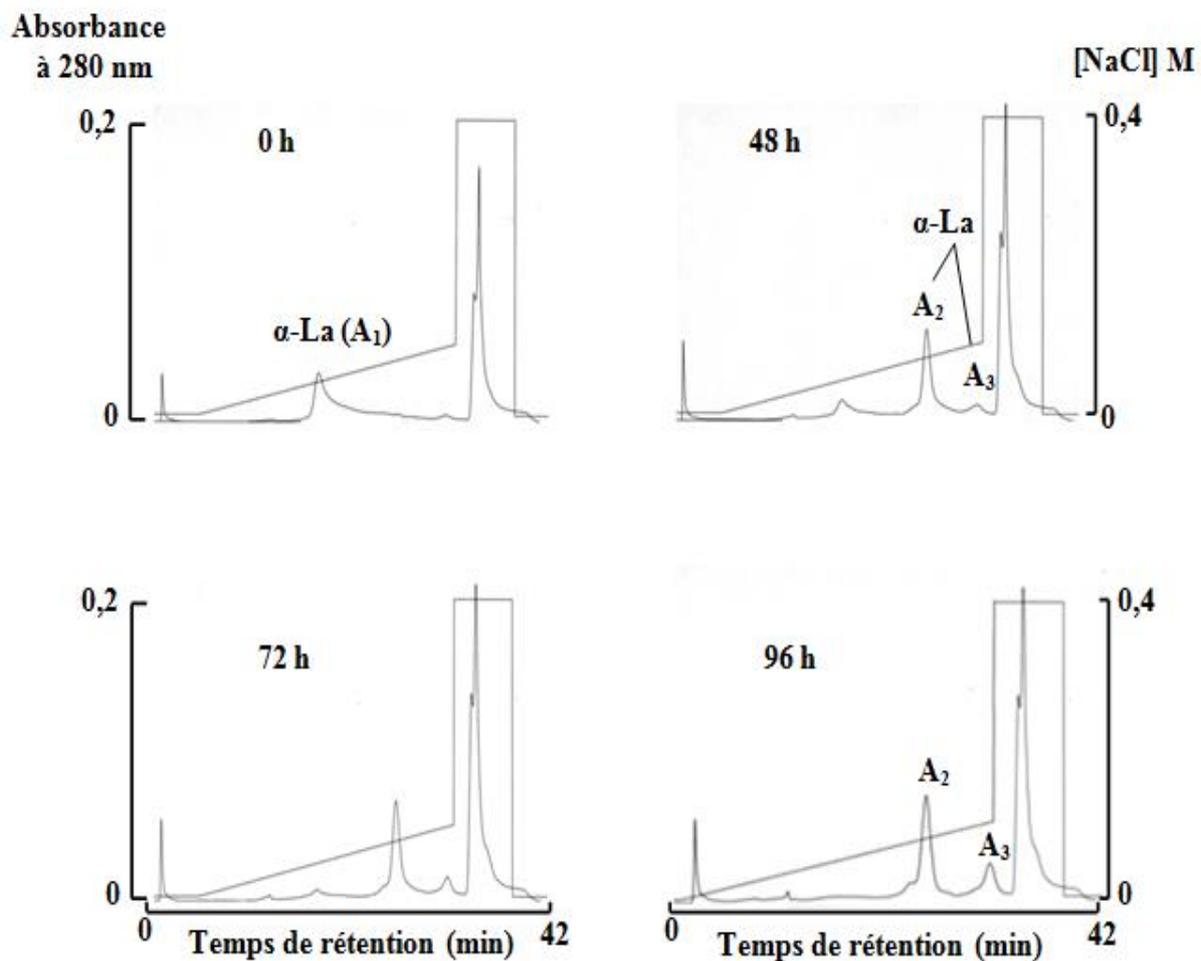


Figure 30. Profils chromatographiques en FPLC d'échange d'anions sur mono Q permettant de suivre la modification de l' α -Lactalbumine cameline A_1 en isoforme A_2 et A_3 , en fonction du temps d'incubation (0 à 96 h) dans un tampon phosphate de sodium 150 mM, pH 8,4. Elution : gradient linéaire de 0 à 0,2 M de NaCl ; Débit : 1 mL min^{-1} ; détection : 280 nm. A_1 , A_2 et A_3 , isoformes 1, 2 et 3 de l' α -Lactalbumine.

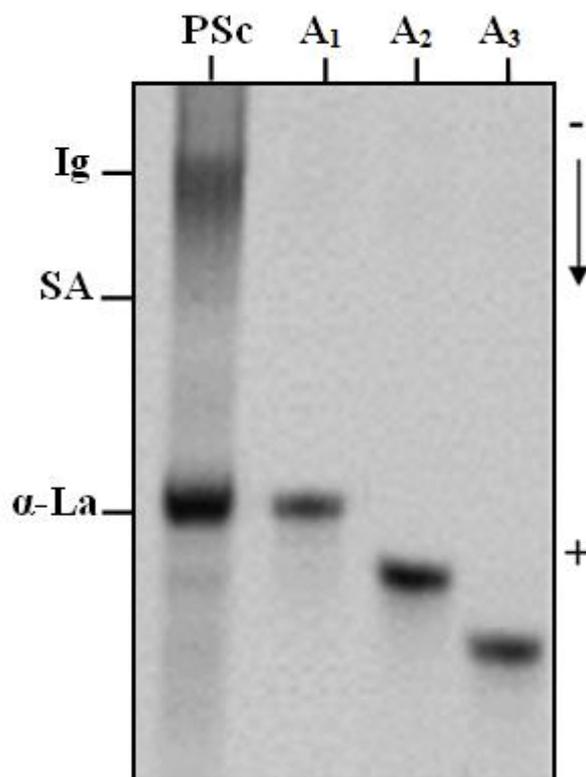


Figure 31. Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (Alcaline-PAGE) des protéines lactosériques camelines PSc (2 mg mL^{-1}), des fractions A₁, A₂ et A₃ (1 mg mL^{-1}) solubilisées dans le tampon d'échantillon, pH 8,9.

A₁ (native), A₂ et A₃ (désamidée) : fractions de l' α -La purifiées par FPLC ;

Des volumes de $10 \mu\text{L}$ sont déposés dans le gel.

La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de Coomassie R250.

Les aires des pics A₁ et A₂ ont été calculées afin d'estimer le rapport A_t/A₀ en fonction du temps. Le rapport A_t/A₀ diminue en fonction du temps selon une fonction logarithmique (Figure 32).

Les résultats de calculs de k_{obs} sont $0,017 \text{ h}^{-1}$ à pH 7,4 (équivalent à 58 h) et $0,055 \text{ h}^{-1}$ (équivalent à 18 h) à pH 8,4 et les temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de désamidation, calculées selon la méthode de Robinson *et al.* (2004) correspondent à 40 h à pH 7,4 et 12 h à pH 8,4. Ce résultat montre que la vitesse de la réaction de désamidation non enzymatique est plus élevée d'un facteur 3,2 à pH basique qu'au pH physiologique (7,4).

A pH 8,4, la vitesse de modification de l' α -La cameline est plus élevée qu'à pH 7,4. L'augmentation du pH de l'environnement favorise la désamidation de l' α -La cameline.

Ceci s'explique par le fait que l'ion phosphate peut dissocier une molécule d'eau en ions hydronium et hydroxyde, l'anion hydroxyde pouvant à son tour arracher un proton de l'azote de la liaison peptidique et ainsi catalyser la réaction de désamidation (Robinson, 2002).

Comparativement à ces résultats, L' α -La équine, possède un site de désamidation spontanée Asn⁴⁵ qui se désamide en Asp⁴⁵ ou isoAsp⁴⁵ rapidement (temps de demi-vie de 12 h) avec libération d'ammoniaque dans le milieu (Girardet *et al.*, 2004).

Des $t_{1/2}$ ont été calculés pour diverses séquences peptidiques (Robinson et Robinson, 2001). La séquence Gly-Xxx-Asn-Gly-Gly possède un $t_{1/2}$ de 1,2 jours tandis que la séquence Gly-Xxx-Asn-Ser-Gly possède un $t_{1/2}$ estimé à 15,9 jours. Ceci montre que la séquence Asn-Gly est plus réactive que la séquence Asn-Ser et que l'absence de chaîne latérale sur Gly permet un faible encombrement stérique, ce qui favorise la réaction.

Les études de Geiger et Clarke (1987) montrent que la séquence Asn-Gly présente un $t_{1/2}$ très court, estimé à environ 1,4 jours. Ce temps est le plus court comparativement à d'autres séquences peptidiques. Il reste corrélé à l'influence d'autres facteurs de l'environnement tel que le pH, La nature du solvant, la force ionique...ect.

Le mécanisme de la réaction de désamidation spontanée est une catalyse basique. A pH 5-8, la vitesse de la réaction est proportionnelle à la concentration d'OH⁻ présente dans l'environnement, ce qui accélère l'ionisation de la liaison peptidique qui devient réactive à l'attaque de la chaîne latérale du résidu Asn (Song *et al.*, 2001).

La désamidation est aussi une réaction hydrolytique, semblable à l'hydrolyse de la liaison peptidique par une protéase. Pour la désamidation, celle-ci est catalysée par la présence d'acides et de bases (nucléophiles) et nécessite la présence de molécules d'eau.

La réaction est marquée par un état de transition avec formation d'un composé intermédiaire cyclique et tétrahédrique (succinimide), qui est stabilisé par un donneur de proton, ce qui augmente la vitesse de la réaction. L'ordre de la réaction de catalyse acido-basique est dépendante de plusieurs facteurs ; en particulier le pH de l'environnement.

Les études de Bhatt *et al.* (1990) et Patel et Borchardt (1990) montrent qu'entre pH 5 à 12, la réaction de désamidation est une catalyse basique, la vitesse de désamidation augmente. Les produits Asp et IsoAsp se forme dans un rapport 1:3 (par déprotonation du -NH- du peptide).

La vitesse de désamidation est aussi fortement influencée par la nature du résidu d'acide aminé adjacent du coté carboxylique de la chaîne du résidu susceptible à se désamider. Les résidus Asn et Gln présents dans les séquences Asn-Gly, Asn-Ser (Geiger et Clarke, 1987 ; Tyler-Cross et Schirch, 1991 ; Robinson et Robinson, 2001) ou Gln-Gly (Robinson 2002) sont les plus exposés à cette réaction.

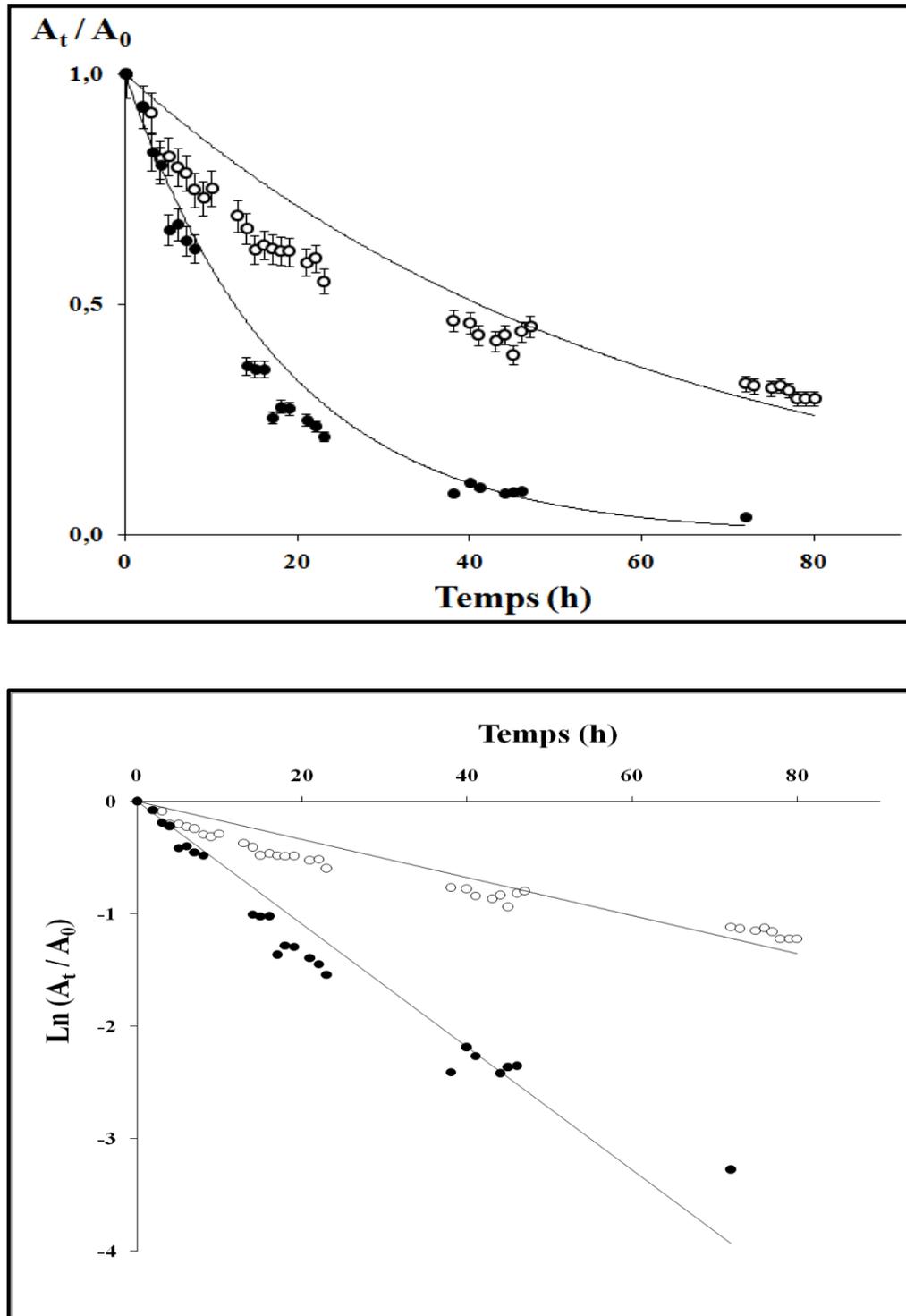


Figure 32. Evolution exponentielle (A) et logarithmique (B) du rapport des aires (à 280 nm) des pics de l' α -Lactalbumine A2 (A_t/A_0) déterminée par FPLC en fonction du temps d'incubation à 37°C dans 150 mM de tampon phosphate de sodium à différent pH. Les protéines lactosériques camelines (15 mg.mL⁻¹) sont solubilisées dans 150 mM de tampon phosphate de sodium à pH 7,4 (○) et pH 8,4 (●). A_t : l' α -Lactalbumine encore intacte après un instant t d'incubation ; A_0 : l' α -Lactalbumine native initiale.

Ainsi, la structure primaire de la protéine joue un rôle primordial dans le processus de désamidation. Les résidus L-isoaspartates sont formés, très souvent dans des séquences où l'acide aminé qui suit immédiatement (n+1) est petit, hydrophile et ne possédant pas de chaîne latérale encombrante (Johnson et Aswad, 1995). En effet, il a été démontré qu'une glycine en position n+1 provoque la formation de résidus L-isoAsp 70 à 100 fois plus rapidement que des résidus d'acides aminés possédant une chaîne latérale hydrophobe et ramifiée (Brennan et Clarke, 1995).

Il y aurait donc une relation directe entre le volume de la chaîne latérale de l'acide aminé en position n+1 et la vitesse de formation de l'intermédiaire succinimide. Ainsi, les acides aminés favorables à la formation d'isoasp sont la glycine, la sérine et l'histidine. Ces derniers accélèrent la déprotonation de l'azote du lien peptidique favorisant l'attaque nucléophile de la chaîne latérale de l'aspartate ou de l'asparagine entraînant ainsi la formation de l'intermédiaire succinimide (Reissner et Aswad, 2003).

Cette étape est donc l'étape limitante du processus de formation des résidus L-isoAsp. De plus, des études ont démontré que l'acide aminé précédant l'aspartate ou l'asparagine n'influence pas la vitesse de formation des résidus isoAsp (Brennan et Clarke, 1995).

Aussi, tel que mentionné précédemment, d'autres facteurs tels que la température et la force ionique peuvent influencer la formation d'isoAsp dans les protéines (Brennan et Clarke, 1995). En effet, à des températures élevées, la chaîne polypeptidique est dénaturée entraînant une conformation plus détendue et favorisant la formation du succinimide et donc la formation d'isoAsp. Aussi, à des pH basiques, la déprotonation de l'azote de la liaison peptidique est augmentée, ce qui accélère également la formation de résidus isoaspartates.

3.2.4. Détermination des points isoélectriques des isoformes d' α -Lactalbumine cameline

Les trois isoformes de l' α -La cameline A₁, A₂ et A₃, purifiées en deux étapes par FPLC et HPLC ont été caractérisées par 2D-PAGE et leurs pHi apparents déterminés. L'utilisation d'une bandelette de type "IPG-strip" dans la gamme de pH de 4,0 à 7,0 permet d'avoir une excellente linéarité du gradient de pH entre 4,5 et 5,5 et permet une détermination précise des pHi apparents des isoformes (N'Négue *et al.*, 2004).

Chaque isoforme se présente sous forme d'un seul spot (Figure 33) d'une MM d'environ 14 kDa. Aucun spot n'est observé aux alentours de 16 kDa, ce qui suggère que l' α -La cameline n'est pas glycosylée.

Aucune forme de glycosylation n'a été mise en évidence pour l' α -La cameline à ce jour. Ceci est lié au fait que la séquence primaire de l' α -La cameline (Beg *et al.*, 1985 ; Figure 1), ne présente aucun motif de N-glycosylation (Asn-Xxx-Ser/Thr).

Les gels de 2D-PAGE de chaque isoforme ont été superposés pour une meilleure visualisation du shift observé et qui correspond au degré de désamidation (Figure 34).

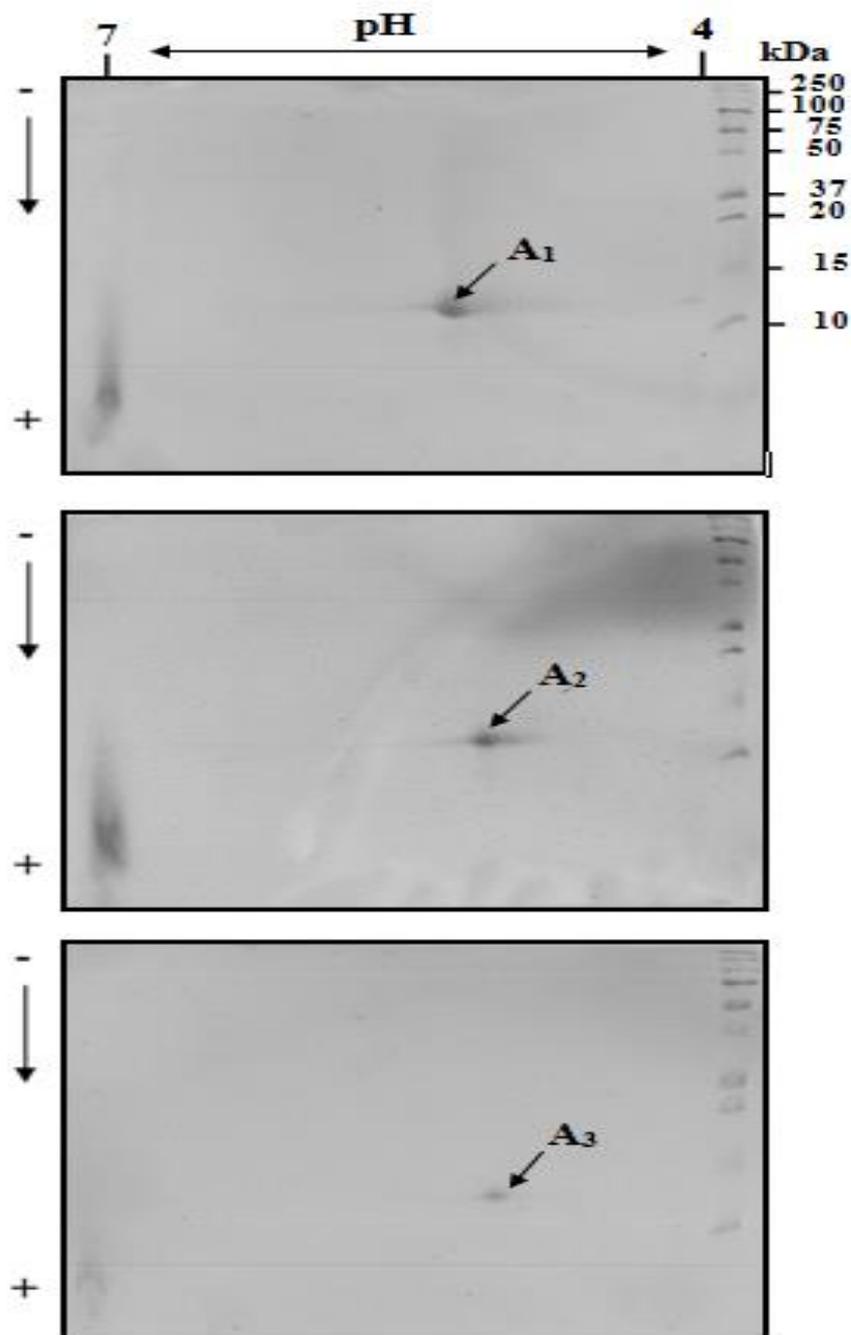


Figure 33. Electrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) des isoformes A₁, A₂ et A₃. 18 µg, 12 µg et 6µg, respectivement, d'α-Lactalbumine de chamelle solubilisés dans 180 µL du tampon d'échantillon de l'isoélectrofocalisation (IEF). Pour la première dimension, des bandelettes ("IPG-strips" de 11 cm) prêtes à l'emploi sont utilisées. Après IEF, Chaque "IPG-strip" est scellé au sommet d'un gel SDS-PAGE. Les gels sont colorés au nitrate d'argent. A₁, A₂ et A₃ : isoformes 1, 2 et 3 de l'α-Lactalbumine purifiées sur ÄKTA-Purifier.

Les pHi apparents des trois isoformes A₁, A₂ et A₃, déterminés par la méthode de Girardet *et al.* (2004) selon l'équation suivante : $pHi = 3.34 d/L + 3.90$ avec : d = la distance en cm parcourue par la protéine séparée par l'IEF depuis le coté acide de la bandelette ; L = longueur totale de la bandelette (11 cm).

Les résultats de ces calculs donnent des valeurs de pHi de 5,63, 5,36 et 5,05 pour les trois isoformes A₁, A₂ et A₃ respectivement. Les valeurs des pHi des trois isoformes sont corrélées avec leur ordre d'éluion observé par FPLC et leur vitesse de migration par Alkaline-PAGE.

La différence de 0,27 unités pH entre les pHi des deux isoformes A₁ et A₂ et de 0,31 unités entre les pHi de A₂ et A₃ sont en accord avec ce qui est observé pour l' α -La équine native et désamidée ($\Delta pH \sim 0,31$; Girardet *et al.*, 2004) et la caséine β équine native et désamidée ($\Delta pH \sim 0,26$; Girardet *et al.*, 2006).

Ce résultat est en accord avec l'apparition d'une charge négative supplémentaire apportée par la formation d'un groupement carboxyle (Lutter *et al.*, 2001). La différence de pHi de 0,58 ($\sim 0,60$) unité de pH entre les pHi des deux isoformes A₁ et A₃ correspondrait à la désamidation spontanée de deux résidus Asn.

Conti *et al.* (1985) ont observé deux formes d' α -La cameline, notées A et B, qui ont des MM similaires mais des pHi différents, 5,1 et 5,3 respectivement, c'est-à-dire un $\Delta pH \sim 0,2$, ce qui pourrait correspondre aux formes native A₁ et désamidée A₂ que nous avons obtenues. L'isoforme A₃ ne peut être obtenue qu'à pH alcalin. De ce fait, il n'a pas été mis en évidence par les travaux de Conti *et al.* (1985).

En caractérisant les protéines du lactosérum d'ânesse, Conti *et al.* (1989) ont mis en évidence l'existence de deux formes d' α -La du lait d'ânesse avec des pHi de 5,48 (forme A) et 5,25 (forme B). En prenant en compte ces présents résultats sur d' α -La du lait camelin et les travaux de Girardet *et al.* (2004) sur l' α -La du lait de jument, ces deux formes d' α -La du lait d'ânesse pourraient en fait correspondre à une forme native (possédant le résidu Asn⁴⁵) et à une forme désamidée (avec Asp⁴⁵ et/ou isoAsp⁴⁵). Par ailleurs, Kaminogawa *et al.* (1984) ont observé que, lors de la caractérisation de l' α -La équine par microséquençage d'Edman, le rendement répétitif chute au niveau du résidu 45 selon un mécanisme inexplicé.

Nous pensons que, du fait de la transformation spontanée du résidu Asn⁴⁵ en résidu isoAsp⁴⁵, le clivage chimique de la liaison pseudopeptidique entre les résidus 44 et 45 ne peut se réaliser et que, par conséquent, le résidu isoAsp (et encore moins le résidu Asn attendu par les auteurs) n'est pas retrouvé lors du séquençage.

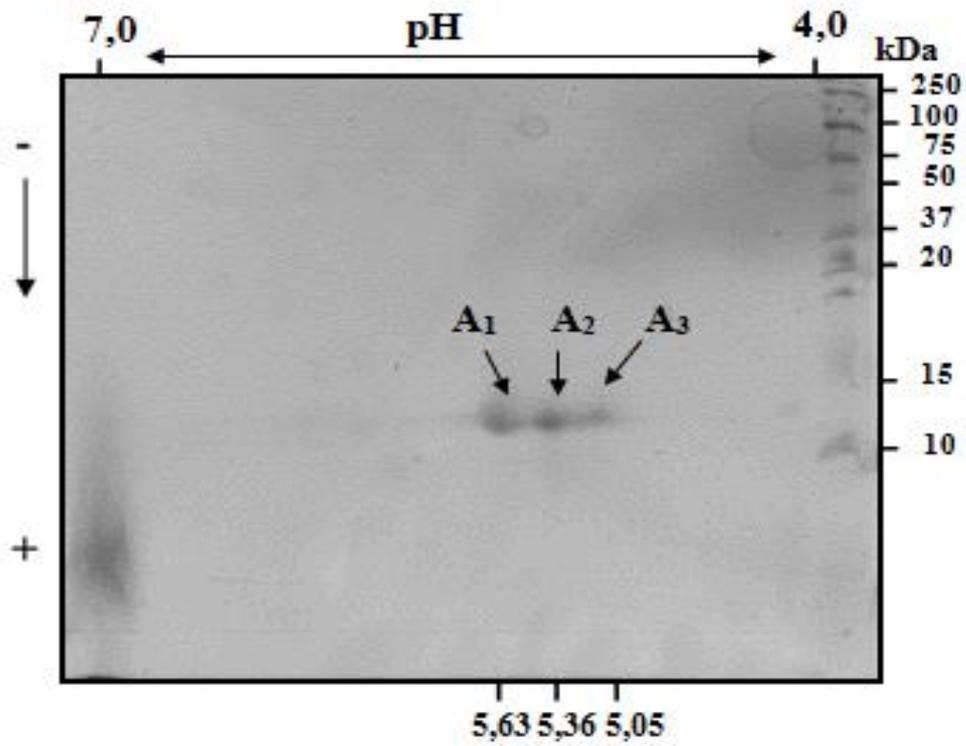


Figure 34. Superposition des trois gels de l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE) des isoformes A₁, A₂ et A₃ d' α -Lactalbumine de chamelle.

3.2.5. Spectrométrie de masse

3.2.5.1. Détermination de la masse exacte des isoformes

La réaction de désamidation non enzymatique d'un résidu d'Asn augmente la masse moléculaire de la protéine de seulement 0,984 Da (le groupement $-NH_2$ est remplacé par un groupement $-OH$). Mais pour mettre en évidence cette différence de masse moléculaire, on ne peut recourir à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dont l'erreur expérimentale est supérieure à 1 Da, mais plutôt à celle de la spectrométrie LTQ-FT-ICR qui offre une très bonne résolution et de plus a été utilisée efficacement par Robinson *et al.*, 2009 ; Robinson *et al.*, 2006 pour mettre en évidence la désamidation des protéines.

En effet, le recours à un spectromètre de masse LTQ-FT-ICR permet de mesurer des masses moléculaires de protéines avec une très haute précision, ce qui est essentiel pour détecter une variation de masse d'environ 1 Da due à la désamidation d'un résidu d'Asn de l' α -La de chamelle. La spectrométrie utilise la mesure du rapport masse sur charge (m/z) des différentes isoformes.

Il est important de noter que la résolution apportée par la spectrométrie de masse FT-ICR permet de déterminer les états de charge de chaque massif isotopique et de déduire la masse monoisotopique de chaque isoforme. La résolution apportée par d'autres instruments de type temps de vol et piège à ions n'aurait pas été suffisante pour résoudre tous les massifs isotopiques observés dans le spectre.

L' α -La cameline native, comme décrite dans la base de données de *SwissProt* sous le numéro d'accès *P00710* contient quatre ponts disulfures et a la formule chimique $C_{631}H_{966}N_{170}O_{196}S_{11}$, correspondant à une masse moléculaire moyenne de 14 422,18 (14 412,78 pour la forme monoisotopique). Les formes désamidées sur un site et sur deux sites correspondent aux formules chimiques $C_{631}H_{965}N_{169}O_{197}S_{11}$ et $C_{631}H_{964}N_{168}O_{198}S_{11}$ respectivement. La distribution isotopique est calculée à base de ces formules.

La figure 35 présente les profils obtenus en spectrométrie de masse pour les trois isoformes A_1 , A_2 et A_3 respectivement correspondant à un état de charge $[M+8H]^{8+}$. La distribution isotopique de l' α -La de chamelle a été calculée avec le logiciel « Molecular Weight Calculator 6.49 » qui a montré que l'espèce la plus abondante est caractérisée par $9C^{13}$. Sur la base de cette information, en considérant que la courbe gaussienne est centrée sur la forme $9C^{13}$, les masses suivantes ont été calculées : 14 421,8659 Da pour la fraction A_1 (Figure 33a), 14422,8569 Da pour la fraction A_2 (Figure 33b) et 14423,8479 Da pour la fraction A_3 (Figure 33c). La masse de A_1 est très proche de la masse théorique possédant les 4 ponts disulfures. Les différences de masse de 0,991 Da entre A_1 et A_2 et de 1,982 Da entre A_1 et A_3 confirment ainsi la présence d'une désamidation non enzymatique sur un site pour A_2 et deux sites pour A_3 .

3.2.5.2. Détermination des sites de désamidation

La spectrométrie de masse LTQ-FT-ICR ne permet pas seulement de déterminer la masse moléculaire d'une protéine donnée mais elle permet aussi d'accéder à sa composition élémentaire.

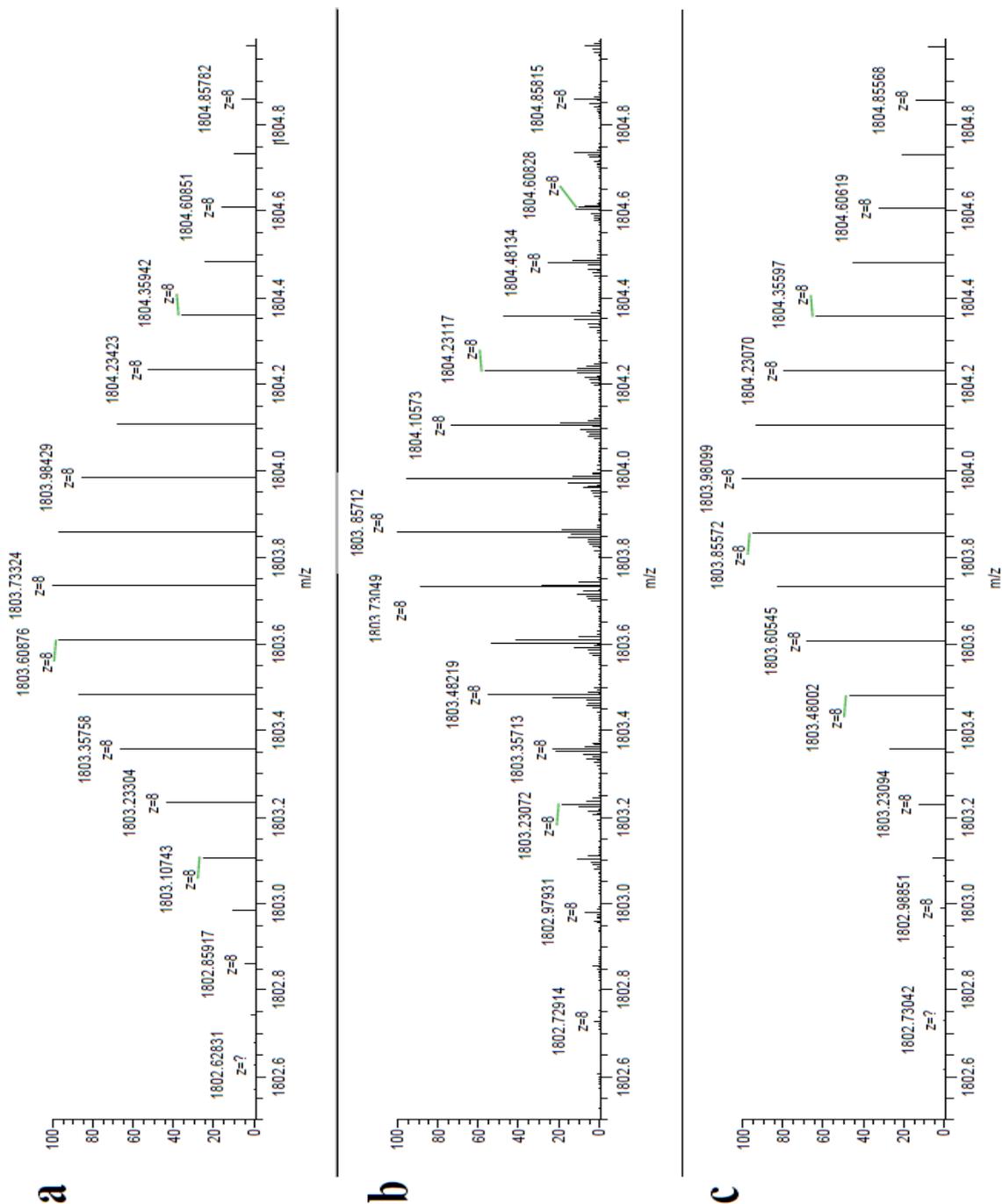


Figure 35. Spectres FT-ICR/MS de la forme ionique majeure $[M + 8H]^{8+}$ de l' α -Lactalbumine native A₁ (a), l'isoforme A₂ (b) et l'isoforme A₃ (c).

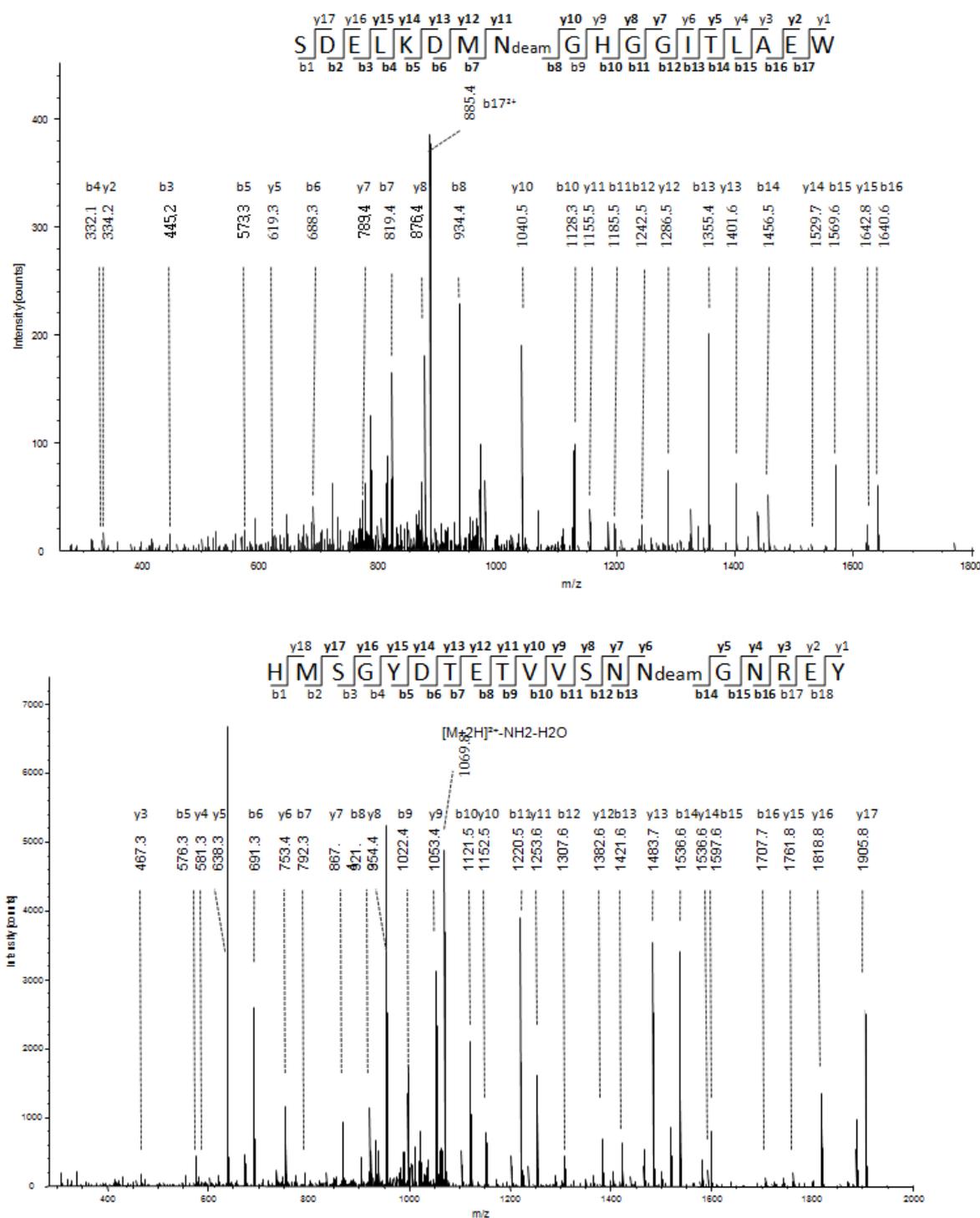


Figure 36. Spectre FT-ICR-MS/MS des peptides 9–26 (1972.89 Da) et 32–50 (2172.90 Da) obtenus par hydrolyse chymotrypsique de l' α -Lactalbumine cameline désamidée A₃. Les séquences des ions fragments, observés sur le spectre, sont désignés par les lettres *b* et *y*.

L'approche MS/MS permet de sélectionner les peptides d'intérêt (obtenus par hydrolyse chymotrypsique des isoformes) et de les séquencer par une seconde étape MS afin de localiser les sites de désamidation non enzymatique, sur les fractions A₁, A₂ et A₃ purifiées par AKTA-FPLC et HPLC en phase inversée.

Pour cela, afin d'obtenir les peptides de petites tailles compatibles avec cette technique et qui contiennent la séquence NG d'intérêt, nous avons procédé à une digestion *in silico* de l' α -La cameline (P00710) par la chymotrypsine. La liste des masses théoriques est obtenue par un logiciel spécifique « Mascot ; tableau IV ».

Les résultats obtenus en MS/MS montrent que le résidu Asn⁴⁵ est retrouvé sous cette forme dans l'isoforme A₁ et sous forme désamidée dans l'isoforme A₂ et A₃, tandis que le résidu Asn¹⁶ est retrouvé inchangé dans l'isoforme A₁ et sous forme désamidée dans l'isoforme A₃ majoritairement par rapport à l'isoforme A₂ (Tableau IV).

De ce fait, nous avons pu confirmer, avec cette approche la présence des deux sites de désamidation Asn¹⁶ et Asn⁴⁵ dont le premier est désamidé dans l'isoforme A₃ et le second dans les isoformes A₂ et A₃.

La différence de la vitesse de désamidation des deux isoformes A₂ et A₃ ne peut être expliquée que par la position de ces résidus (Asn⁴⁵ et Asn¹⁶) dans la structure tridimensionnelle de l' α -La cameline. La structure cristalline de l' α -La cameline n'étant pas disponible dans la banque des données des protéines, nous sommes passés par une approche bio-informatique afin de pouvoir proposer un modèle de structure tridimensionnelle d' α -La cameline par homologie de séquence avec l' α -La humaine.

3.2.6. Modélisation moléculaire de la structure de l' α -Lactalbumine cameline

La modélisation moléculaire permet de déterminer les conformations stables d'une molécule par minimisation de son énergie interne à partir des principes de mécanique et de dynamique moléculaires. Toute molécule étant l'association de différents atomes, la cohésion de cet ensemble sous l'effet des interactions répulsives et attractives entre ces atomes peut être modélisée par un système purement mécanique de forces. L'énergie interne de la molécule est alors exprimée de façon empirique dans un champ de force.

On considère l'énergie intrinsèque de la molécule comme la somme de deux termes, qui décrivent respectivement les interactions entre atomes liés et entre atomes non liés de la molécule. Les données structurales telles que les interactions dipolaires ou les constantes de couplages peuvent être converties en distances inter-protoniques et en angles dièdres, respectivement, et introduites sous forme de termes d'énergie de la molécule. Ainsi, la modélisation moléculaire permet de déterminer des structures tridimensionnelles qui correspondent à un minimum d'énergie.

Tableau IV : Hydrolyse chymotrypsique des isoformes A₁, A₂ et A₃ et identification des peptides obtenus per FT-ICR-MS/MS

Sequence	Position	# MC	PTMs	M + H ⁺ (Da)	A ₁ norm	A ₂ norm	A ₃ norm	Ion Score A ₁	Exp Value A ₁	Ion Score A ₂	Exp Value A ₂	Ion Score A ₃	Exp Value A ₃
NGHGGITLAEW	16-26	1	none	1154.55867	47.78	47.54	25.43	65	2.8 x 10 ⁻⁵	52	5.1 x 10 ⁻⁴	50	8.9 x 10 ⁻⁴
SDELKDMNGHGGITLAEW	09-26	2	N16(Deam)	1973.89241	0.00	0.35	7.14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	78	1.5 x 10 ⁻⁶
SDELKDMNGHGGITLAEW	09-26	2	M15(Ox); N16(Deam)	1989.88235	0.00	3.54	8.92	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	73	3.7 x 10 ⁻⁶
HMSGYDTETVVSNNGNREY	32-50	1	none	2172.92415	11.83	6.53	1.32	112	3.1 x 10 ⁻¹⁰	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HMSGYDTETVVSNNGNREY	32-50	1	M33(Ox)	2188.92043	8.85	0.21	0.00	101	2.8 x 10 ⁻⁹	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HMSGYDTETVVSNNGNREY	32-50	1	M33(Ox); N45(Deam)	2189.90375	10.05	158.87	194.95	108	4.8 x 10 ⁻¹⁰	75	9.4 x 10 ⁻⁷	96	7.2 x 10 ⁻⁹
HMSGYDTETVVSNNGNREY	32-50	1	N45(Deam)	2173.90736	11.56	467.23	493.80	n.s.	n.s.	125	1.1 x 10 ⁻¹¹	88	6.3 x 10 ⁻⁸
SGYDTETVVSNNGNREY	34-50	1	N45(Deam)	1905.80832	21.77	67.47	47.86	87	1.1 x 10 ⁻⁷	77	1.1 x 10 ⁻⁶	81	4.3 x 10 ⁻⁷
SGYDTETVVSNNGNREY	34-50	1	none	1904.82567	34.14	0.21	0.00	71	4.8 x 10 ⁻⁶	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
GYDTETVVSNNGNREY	35-50	1	N45(Deam)	1818.77699	0.00	3.41	3.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	55	1.7 x 10 ⁻⁴
YDTETVVSNNGNREY	36-50	1	N45(Deam)	1761.75475	0.67	0.55	5.19	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	75	1.9 x 10 ⁻⁶
DTETVVSNNGNREY	37-50	0	N45(Deam)	1598.69199	20.67	66.35	230.96	53	3.8 x 10 ⁻⁴	77	1.2 x 10 ⁻⁶	87	1.2 x 10 ⁻⁷
TVVSNNGNREY	40-50	0	N45(Deam)	1253.57447	0.27	2.16	11.58	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	65.24	3.3 x 10 ⁻⁵

#MC: number of missed cleavages; n.s.: not sequenced, Ox: oxidation, Deam: deamidation; norm: normaliser (x10³).

Dans cette étude, un logiciel récent a été utilisé pour la modélisation : Amber 12 Molecular Dynamics Package (Case *et al.*, 2012). Ce programme de calcul permet d'obtenir une minimisation d'énergie dans un champ de force. Le logiciel, qui est l'un des plus utilisés en modélisation moléculaire, considère les molécules comme des ensembles d'atomes libres en utilisant l'équation de Newton de la mécanique classique.

Outre la séquence locale en acides aminés, les structures secondaires et tertiaires de la protéine affectent grandement la désamidation des résidus Asn. En effet, la formation de résidus Asp ou isoAsp survient préférentiellement dans des régions hautement flexibles de la protéine, favorisant ainsi la cyclisation et la formation de l'intermédiaire succinimide (Chazin et Kossiakoff, 1995). La présence de nombreuses liaisons hydrogènes stabilisant les structures secondaires ordonnées (hélices α et brins β) tendent à inhiber la réaction de formation du cycle succinimide (Robinson et Robinson, 2002).

Le modèle obtenu de l' α -La cameline (Figure 37a) montre que le résidu Asn⁴⁵ est localisé dans une boucle en contact avec le solvant aqueux (boucle située entre les deux brins β S1 et S2), ce qui rend facile l'accessibilité du solvant. Le modèle montre que l'oxygène présent sur la fonction amide du résidu Asn⁴⁵ tout comme l'azote de la chaîne latérale du résidu Gly⁴⁶ sont libres, et ne sont impliqués dans aucune liaison hydrogène (Figure 37b). De ce fait, le résidu Asn⁴⁵ peut subir une désamidation spontanée, en condition physiologiques, en résidu Asp⁴⁵ ou isoAsp⁴⁵.

Le site Asn¹⁶-Gly¹⁷ forme une structure rigide, l'analyse du modèle montre que deux liaisons hydrogènes stabiliseraient cette région (Figure 37c). La première s'établirait entre l'oxygène de la fonction amide du résidu Asn¹⁶ avec l'azote du résidu Leu²³ (distance de $0,33 \pm 0,06$ nm), la seconde entre l'azote du résidu Gly¹⁷ avec l'oxygène du groupement carbonyle du résidu Ile²¹ (distance de $0,30 \pm 0,05$ nm). Ces deux interactions possibles sont défavorables pour la formation d'un intermédiaire succinimide entre Asn¹⁶ et Gly¹⁷.

L'augmentation du pH conduit à la déprotonation de la liaison hydrogène, ce qui mène à la formation d'un intermédiaire succinimide (Robinson et Robinson, 2004). Ceci confirme les résultats obtenus, que l'isoforme A₃ ne peut se former qu'à pH basique, d'autant plus que le résidu Asn16 est localisé dans un motif Asn-Gly-Xxx-Gly.

La réaction de désamidation procède *via* un intermédiaire succinimide, qui génère par hydrolyse spontanée, soit le résidu α -Asp soit le résidu β -isoAsp. Le rendement approximatif du rapport α/β est de 1/2 (Aswad *et al.*, 2000) ou de 1/3 (Meinwald *et al.*, 1986).

De façon générale, la formation d'isoAsp peut diminuer l'activité biologique des protéines, diminuer leur susceptibilité à la protéolyse, et susciter des réactions d'auto-immunité (Aswad *et al.*, 2000). Par conséquent, la désamidation des protéines alimentaires est un processus chimique de dégradation important qui doit être pris en compte lors des études de relations structure-fonction de protéines et lors de la recherche de peptides à activité biologique présentant un bénéfice-santé.

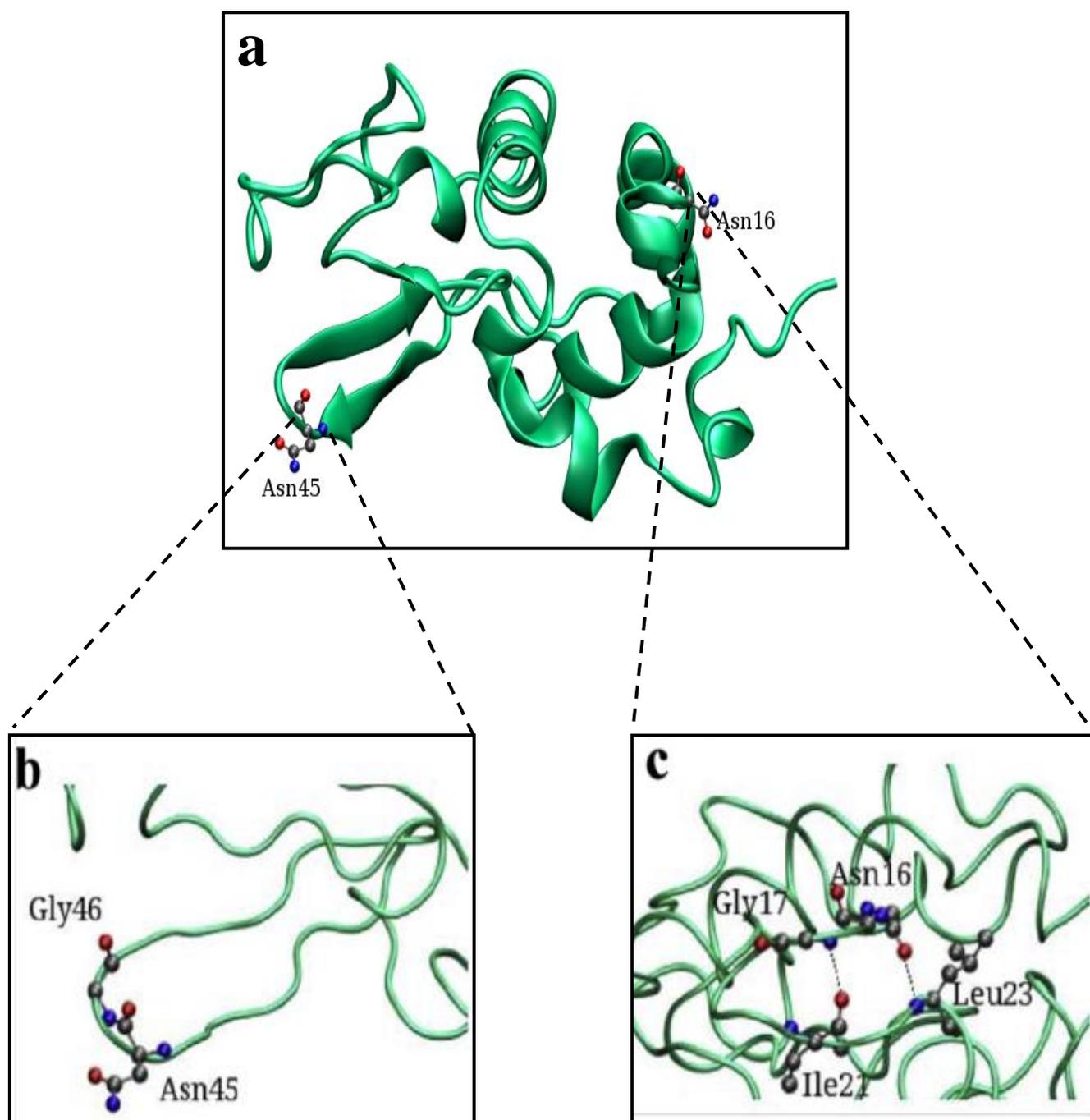


Figure 37. Représentation en ruban de la modélisation dynamique de l' α -Lactalbumine cameline (*Camelus dromedarius*) (a) et la localisation détaillée des deux séquences Asn⁴⁵-Gly⁴⁶ (b) et Asn¹⁶-Gly¹⁷ (c).

Les liaisons hydrogènes sont présentées en pointillés.

Chapitre III : Influence de la désamidation sur les propriétés structurales et thermodynamiques de l' α -Lactalbumine du lait camelin

L'objectif de cette partie est de déterminer dans quelle mesure le phénomène de désamidation non enzymatique de l' α -La du lait camelin a une influence sur sa stabilité structurale. Pour essayer d'avoir des éléments de réponses à cette question, nous avons utilisé trois approches d'investigations : spectrométrie, thermodynamique et protéolytique.

3.3.1. Structures secondaires et tertiaires de l' α -Lactalbumine cameline native et désamidée

L'effet de la désamidation sur la stabilité de la conformation de l' α -La cameline est étudié par dichroïsme circulaire (CD) dans l'UV lointain et l'UV proche pour caractériser respectivement ses structures secondaire et tertiaire. Pour cela, les fractions d' α -La (A_1 , A_2 et A_3), purifiées par FPLC semi-préparative, sont solubilisées dans l'eau ultra-pure, puis directement analysées par CD à 25°C.

Les résultats montrent que l' α -La du lait camelin, qui présente une ellipticité à 270 nm de $-450 \text{ deg.cm}^2.\text{dMol}^{-1}$ (Figure 35A) serait sous la forme *holo*- α -La (qui fixe Ca^{2+}) après purification par FPLC, étant donné que, selon la littérature, la forme *holo*- α -La du lait bovin a une ellipticité à la même longueur d'onde d'environ $-300 \text{ deg.cm}^2.\text{dMol}^{-1}$ à 25°C (Vanderheeren *et al.*, 1996).

La technique chromatographique choisie pour préparer l' α -La n'est donc pas dénaturante comme attendue et ne provoque pas la libération du calcium, ce que Girardet *et al.* (2004) avaient préalablement montré pour la protéine équine purifiée, elle aussi, par FPLC d'échange d'ions.

3.3.1.1. Spectroscopie dans l'UV proche

La spectroscopie CD dans l'UV proche permet d'obtenir des informations sur l'état de la structure tridimensionnelle de la protéine. En effet, des changements spectraux entre 260 et 300 nm résultent d'une modification du micro-environnement des résidus aromatiques Tyr et Trp pouvant être provoqués par un traitement physique tel qu'un traitement thermique ou chimique.

Les spectres CD réalisés dans ces conditions, ne montrent pas de changement sous l'effet de la désamidation non enzymatique. Dans l'UV proche, le spectre de l' α -La désamidée (A_2 et A_3) est similaire à celui de la protéine native (A_1) (Figure 38A).

Ces résultats confirment que la désamidation non enzymatique de l' α -La du lait camelin n'altère pas la structure tertiaire, car les spectres des isoformes A_1 , A_2 et A_3 obtenus dans l'UV proche sont très similaires et aucune incidence significative de la désamidation sur la conformation de la protéine n'est observée. Par conséquent, le micro-environnement des

résidus non polaires (Tyr et Trp) semble inchangé, au cours de la désamidation, entre l'isoforme native et les isoformes désamidées de l' α -La cameline.

Lorsque l' α -La bovine est partiellement désamidée sous l'action d'une glutaminase, qui a pour cible quatre des six résidus Gln de cette protéine, la stabilité de la structure tertiaire de l' α -La est étroitement liée au degré de désamidation enzymatique. Le spectre CD dans l'UV proche de la forme polydésamidée de l' α -La bovine montre un changement dans la structure tertiaire de la protéine modifiée enzymatiquement (Gu *et al.*, 2001). Il faudrait donc que plusieurs résidus soient désamidés pour observer un changement structural notable de l' α -La cameline.

3.3.1.2. Spectroscopie dans l'UV lointain

Les spectres réalisés dans l'UV lointain (Figure 38B) de l' α -La native (A_1) et désamidée (A_2 et A_3) sont caractérisés par deux minimums d'ellipticité molaire à des longueurs d'onde de 208 et 225 nm représentatifs des hélices α et caractéristiques de l' α -La. Ces résultats sont corrélés avec ceux observés par Salami *et al* (2009) sur l' α -La de chamelle.

Le contenu en éléments de structure secondaire de l' α -La A_1 et ses deux isoformes A_2 et A_3 déterminé à partir du spectre dans l'UV lointain en utilisant le logiciel en ligne K2D3 est présenté dans le tableau V. La structure secondaire de l' α -La cameline native (A_1) contient 37,0% d'hélices α et 15,1% de brins β comparativement à l' α -La équine qui contient 31% d'hélices α et 11% de brins β déterminé par N'Negue (2006) avec la même technique. L' α -La bovine, quand à elle, contient 32% d'hélices α et 8% de brins β , déterminés par cristallographie aux rayons X par Chrysina *et al.* (2000).

Le spectre ne montre pas de changement entre les deux formes désamidées A_2 et A_3 , mais une différence est observée entre la forme native et les formes désamidées. La désamidation s'accompagne d'une augmentation de l'ellipticité molaire à une longueur d'onde de 230 nm.

Un gain de 5% en structure secondaire (hélice α) entre la forme native A_1 et la forme désamidée A_2 , et 3% environ entre A_1 et A_3 est observé. Par conséquent, la structure secondaire est légèrement affectée par le phénomène de désamidation. L' α -La désamidée adopte une structure secondaire plus stable par rapport à la forme native.

Il est intéressant de noter que les résultats obtenus par Atri *et al.* (2010) pour la forme *holo*- α -La cameline sont semblables à ce que nous avons eu avec l'isoforme A_2 (42,1% d'hélice α et 12,9% de feuillets β ; tableau V). Ceci tend à montrer que ces auteurs ont travaillé avec la forme monodésamidée spontanément (A_2) dans leurs conditions expérimentales et non avec la protéine native comme ça été décrit.

3.3.2. Thermostabilité de l' α -Lactalbumine cameline native et désamidée

L'étude, par DSC, de l'effet du traitement thermique sur la conformation de l' α -La cameline native (A_1) et désamidée (A_2 et A_3) nous permet de voir que cette modification chimique a pour résultat de rendre l' α -La cameline thermorésistante.

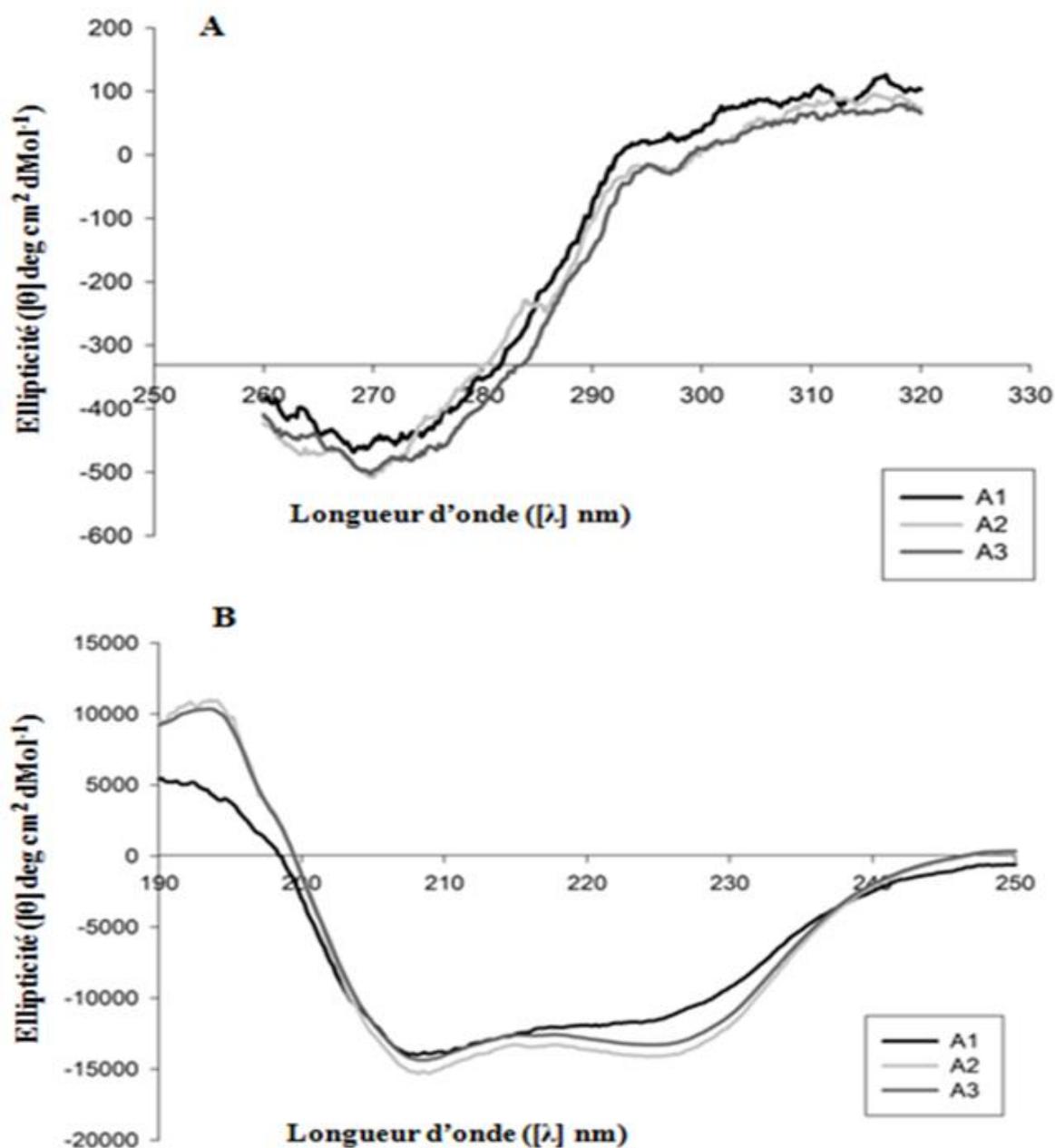


Figure 38. Spectres de dichroïsme circulaire (CD) dans l'UV proche (A) et l'UV lointain (B) de l' α -Lactalbumine cameline native (A₁) et désamidées (A₂ et A₃) purifiées par FPLC semi préparative d'échanges d'ions et solubilisées dans l'eau ultra-pure.

$[\theta]$: ellipticité molaire moyenne par résidu.

Tableau V. Proportion (%)* d'éléments de structure secondaire de l' α -La native (A_1) et désamidée (A_2 et A_3).

	Isoformes	Hélice α (%)	Brin β (%)	Coude β (%)	Structure Désordonnée (%)
Présente étude	A_1	37,0	15,1	16,4	27,8
	A_2	42,1	12,9	15,4	25,4
	A_3	39,7	13,9	15,8	27,0
Lait camelin (Atri <i>et al.</i> , 2010)	<i>Holo-α-La</i>	42,2	13,6	15,8	28,3
	<i>Apo-α-La</i>	34,7	16,5	16,7	32,2
Lait bovin (Atri <i>et al.</i> , 2010)	<i>Holo-α-La</i>	43,1	13,3	15,6	27,9
	<i>Apo-α-La</i>	33,4	16,8	16,7	33,0

*Les pourcentages sont calculés à partir des résultats de dichroïsme circulaire (CD) dans l'UV lointain avec le logiciel en ligne K2D3.

La DSC est la seule méthode directe permettant de déterminer en une seule expérience et de façon simultanée, les paramètres thermodynamiques d'une transformation chimique telle qu'une désamidation non enzymatique. L'analyse de ces courbes permet de déterminer les principaux paramètres thermodynamiques liés à la dénaturation thermique de l' α -La.

Les paramètres thermodynamiques sont présentés sur le tableau VI. La température de dénaturation de l' α -La native et désamidée correspond à la température maximale du pic endothermique. Elle représente la stabilité thermique de la protéine (Barbeau *et al.*, 1996 ; McGuffey, 2004). L'enthalpie de dénaturation (ΔH) de l' α -La native et désamidée obtenue correspond à l'intégration de l'aire du pic de la courbe d'un thermogramme et représente l'énergie thermique nécessaire pour dénaturer les protéines (Barbeau *et al.*, 1996).

Le thermogramme obtenu (Figure 37) montre trois pics de dénaturation correspondants aux trois isoformes étudiées (A_1 , A_2 et A_3). La variation de la chaleur calorifique (C_p) en fonction de la température est une propriété thermodynamique liée à l'exposition en surface, lors de sa dénaturation, des régions hydrophobes de la protéine et la désorganisation de la couche d'hydratation (Gomez *et al.*, 1995).

La valeur de T_m obtenue pour l' α -La A_1 est de 68,7°C. Cette valeur reste proche du T_m de l' α -La bovine (67,4°C) et se trouve inférieure à celui de l' α -La cameline (71,7°C) obtenu par Atri *et al.*, (2009). Les résultats montrent un gain de 3°C pour l'isoforme A_2 (71,9 \pm 0,9) et de 6°C pour l'isoforme A_3 (74,9 \pm 0,2). Nous constatons que les valeurs enregistrées pour l'isoforme A_2 , tout comme celles issues de l'analyse CD, sont similaires à celles obtenues par Atri *et al.*, (2010) pour la forme *holo- α -La* cameline, ce qui renforce l'hypothèse que ces auteurs étudiaient en fait la forme monodésamidée spontanément et non la forme native.

L'élévation de T_m est expliquée par une stabilisation de la structure tridimensionnelle et sa résistance à la dénaturation thermique, ce qui suggère que la désamidation non enzymatique de seulement un ou deux résidus Asn rend l' α -La cameline plus stable.

Contrairement à d'autres protéines, la dénaturation thermique de l' α -La bovine est réversible. En effet, les travaux de Boye *et al.* (1997) en DSC sur la stabilité de cette protéine face à la dénaturation thermique entre 15 et 100°C, montrent des taux de réversibilité de 80-100 % pour l'*holo*- α -La et de près de 50 % pour l'*apo*- α -La, particulièrement en présence de CaCl_2 .

Expérimentalement, l'irréversibilité de la dénaturation thermique se traduit par l'absence d'absorption de chaleur lorsqu'un échantillon, qui a été soumis à un gradient de chaleur, est à nouveau chauffé.

Cependant, plusieurs auteurs s'entendent sur le fait que la température et l'enthalpie de dénaturation de l' α -La bovine native dans l'eau sont respectivement de 58°C et 320 kJ/mol (Relkin & Mulvihill, 1996).

Cette stabilité provient de l'absence d'agrégation et de gélification de l' α -La lors de la dénaturation de la protéine. La stabilité est due à la structure tertiaire de la protéine qui se dénature facilement lors du chauffage, mais qui retrouve sa conformation native en présence de calcium. Elle est également due aux ponts disulfures stables, qui ne s'échangent pas pour former des polymères de protéines et, à terme, un gel protéique. L'absence de groupements thiols, reconnus pour être très actifs dans le processus d'agrégation protéique, limite également l'agrégation de l' α -La (McGuffey, 2004).

Des études en spectroscopie infrarouge (FTIR) semblent montrer que la dénaturation de l'*apo*- α -La, qui s'accompagne quant à elle d'un certain processus d'agrégation lors du chauffage, provoquerait la formation de feuillet β tandis que l'*holo*- α -La adopterait davantage une structure avec une proportion de coudes β accrue, réduisant ainsi les possibilités d'agrégation (Boye *et al.*, 1997).

Pour une analyse thermodynamique plus complète, les valeurs d'enthalpie de dénaturation (ΔH) et de chaleur calorifique (ΔC_p) ont également été déterminées (Tableau VI). Les valeurs d'enthalpie obtenues diminuent entre la forme native et les formes désamidées, ce qui est valable aussi pour les valeurs de ΔC_p obtenues.

Comme il a déjà été observé par De Wit et Klarenbeek (1981), les valeurs de T_m sont dépendantes de la structure tridimensionnelle de la protéine. Le phénomène de désamidation spontanée a pour effet d'augmenter la T_m . Ce type de modification chimique favorise la stabilité de la structure moléculaire.

D'autres auteurs arrivent à la conclusion que les valeurs de T_m augmentent en fonction du pH. Selon McGuffey (2004), les variations de T_m retrouvées dans la littérature s'expliquent surtout par l'utilisation de tampons différents et de très hautes concentrations en protéines pour compenser le manque de sensibilité des appareils.

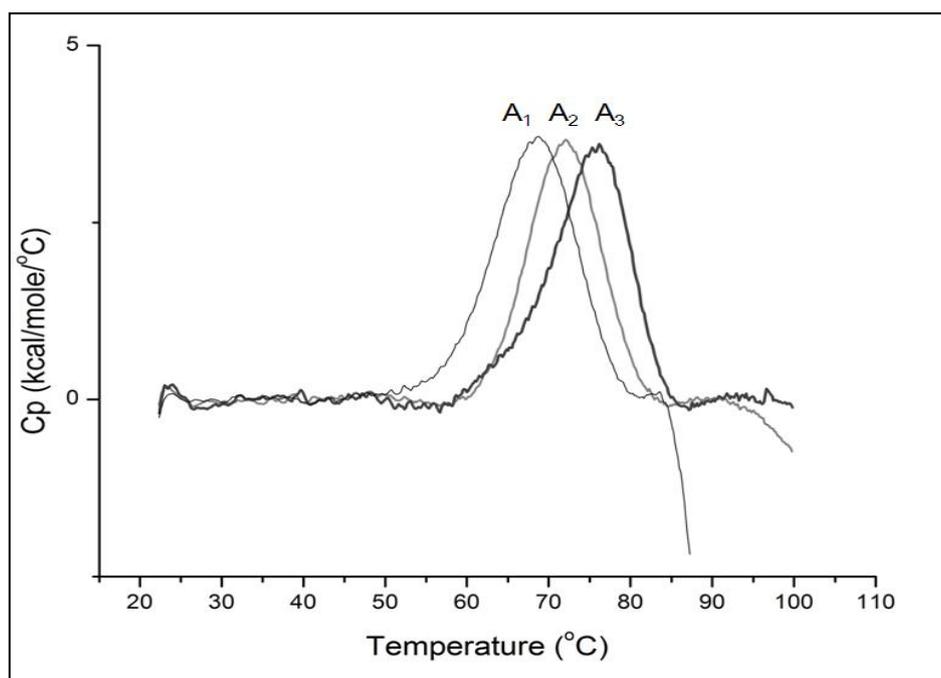


Figure 39 : Thermogrammes obtenus par DSC des isoformes de l' α -La cameline native (A_1) et désamidées (A_2 et A_3). Les courbes illustrées sont la moyenne de trois analyses.

Tableau VI : Paramètres thermodynamiques des isoformes de l' α -Lactalbumine cameline native et désamidées.

	Isoformes	T_m (°C)	ΔH (kJ mol ⁻¹)	ΔC_p (kJ mol ⁻¹ K ⁻¹)
Présente étude	A_1	68,7 ± 0.1	242 ± 13	2,05 ± 0.90
	A_2	71,9 ± 0.9	231 ± 21	0,80 ± 0.20
	A_3	74,9 ± 0.2	229 ± 19	0,40 ± 0.03
Lait camelin (Atri et al., 2010)	<i>Holo-α-La</i>	71,7 ± 0,1	222 ± 38	7,06 ± 1,59
	<i>Apo-α-La</i>	39,6 ± 3,5	72 ± 6	1,13 ± 0,38
Lait bovin (Atri et al., 2010)	<i>Holo-α-La</i>	67,4 ± 2,4	243 ± 4	3,34 ± 0,63
	<i>Apo-α-La</i>	32,4 ± 0,1	134 ± 9	3,72 ± 1,25

T_m : Température de dénaturation

ΔH : Variation de l'enthalpie

ΔC_p : Variation de la chaleur calorifique

C'est d'ailleurs le cas pour cette présente étude où une optimisation de la concentration en α -La et des conditions expérimentales a été nécessaire afin d'obtenir un signal suffisamment élevé de l'appareil DSC.

À des valeurs de pH inférieures à 3,5, il n'est plus possible de détecter de transition thermique, car la conformation de la protéine est modifiée par la perte de sa capacité à lier le calcium (Bernal & Jelen, 1984 ; McGuffey, 2004).

L'enthalpie de dénaturation est généralement reliée à la quantité d'énergie libérée lors du dépliement de la protéine. Cette libération d'énergie est due à la rupture des liaisons hydrogènes et électrostatiques qui maintiennent en place l'organisation de la structure secondaire de la protéine, mais également de sa structure tertiaire (Barbeau *et al.*, 1996 ; Höhne *et al.*, 2003).

La désamidation est une modification chimique qui peut protéger la protéine contre la dénaturation thermique. Ceci ferait varier la quantité d'énergie libérée lors de la dénaturation de l' α -La native et désamidée ce qui s'exprimerait par un temps de dénaturation plus long et par une enthalpie de dénaturation moins élevés entre les isoformes A₁, A₂ et A₃.

Des auteurs ont stipulé que certaines modifications chimiques pourraient contribuer à une baisse de la variation de l'enthalpie totale de dénaturation et l'ont attribué à l'augmentation des interactions hydrophobes qui sont exothermiques (Harwalkar et Kalab, 1985 ; Relkin et Launay, 1990 ; Relkin 1996). Les variations de l'enthalpie obtenues peuvent s'expliquer donc par la contribution de la désamidation à l'augmentation de la stabilité structurale de l' α -La ce qui est corrélé aux résultats obtenus par le biais du dichroïsme circulaire.

3.3.3. Etude de la cinétique d'hydrolyse de l' α -Lactalbumine native et désamidée

L'objectif de cette partie est de compléter par une approche protéolytique l'étude spectroscopique (CD et DSC) de la désamidation non enzymatique de l' α -La cameline et de corréler les résultats de ces deux approches (structurale et protéolytique). Elle vise aussi à voir dans quelle mesure les enzymes digestives (cas de la trypsine) attaquent la protéine après désamidation.

La protéolyse limitée est une technique biochimique qui fournit des informations importantes sur la structure et la dynamique des protéines. Ces dernières sont sujettes à l'hydrolyse selon leur organisation spatiale. Ainsi, il est connu que les protéines globulaires sont résistantes à la protéolyse en conditions physiologiques, car de nombreux sites de coupures protéolytiques ne sont pas exposés, mais enfouis au sein la protéine (Fontana *et al.*, 2004).

L' α -La cameline, comme son homologue bovin, présente une structure spatiale très compactée, ce qui la rend résistante à la protéolyse (Chrysina *et al.*, 2000). Lorsqu'une protéine est soumise à une désamidation non enzymatique, elle pourrait devenir sensible à l'attaque protéolytique, par le fait que lors de la désamidation non enzymatique, les chaînes

latérales chargées négativement (Asp et isoAsp) pourraient ouvrir la structure des protéines par des forces électrostatiques répulsives et par conséquent, celles-ci deviendraient plus sensibles à la protéolyse (Robinson et Robinson, 2004).

3.3.3.1. Action de la thermolysine

La thermolysine est une endopeptidase qui clive les liaisons peptidiques du côté amino-terminal des résidus d'acides aminés hydrophobes encombrants. Une tendance préférentielle pour l'hydrolyse des liaisons Xxx-Leu ou Xxx-Ile est observée lors de l'hydrolyse de l' α -La (N'Negue *et al.*, 2006).

Des cinétiques d'hydrolyse de 1 min à 3 h de l' α -La cameline (A₁, A₂ et A₃) et bovine (α -La Bov) ont été réalisées dans du tampon HEPES (pH 7,2) en présence de 10 mM de CaCl₂ à 37°C. Le calcium est ajouté au milieu réactionnel pour stabiliser la thermolysine (Roche et Voordouw, 1978).

Les résultats obtenus (Figure 40 et 41), montrent qu'en fonction de l'espèce (cameline ou bovine), du degré de désamidation de la protéine cameline, mais aussi selon la durée de l'hydrolyse enzymatique, les peptides formés sont différents et donnent des chromatogrammes en HPLC distincts

A 37°C, et dans des conditions non dénaturantes, l' α -La native ou désamidée est résistante à l'hydrolyse par la thermolysine. Nous remarquons que seules quelques traces de peptides sont observées après 3 h d'hydrolyse. A 30 min d'hydrolyse, les premières fractions peptidiques apparaissent. Après 180 min d'hydrolyse, ces mêmes peptides demeurent durant toute l'hydrolyse mais seule la concentration de ces peptides augmente aux cours du temps.

D'une manière générale, nous pouvons considérer que l' α -La native ou désamidée résiste à l'attaque protéolytique par la thermolysine à la température physiologique. En portant cette dernière à 55°C, N'Negue *et al.* (2006) ont constaté que cette protéine est hydrolysée dans ces conditions plus rapidement et totalement.

Selon Polverino de Laureto *et al.* (2002), l' α -La peut être clivée selon un mécanisme "tout ou rien" (sans passer par des produits d'hydrolyse intermédiaires), si elle adopte un état totalement dénaturé ou déplié (U pour "unfolded"). Fontana *et al.* (2004) ont montré que de petits peptides sont produits lors de l'hydrolyse de cet état U, qui est en équilibre avec l'état natif (N). De plus, selon ces auteurs, la protéolyse des protéines globulaires est limitée, car la concentration de l'état U est très faible en conditions physiologiques par rapport à l'état N.

L'état U de l' α -La pourrait correspondre à la forme apo- α -La, coexistante avec la forme *holo* en solution et mise en évidence par Hendrix *et al.* (2000). En effet, selon ces auteurs, une solution d' α -La à pH 8 et en présence de faibles concentrations de CaCl₂, représenterait en fait un mélange de formes apo et *holo*- α -La.

Selon Griko et Remeta (1999), le calcium rajouté initialement dans le milieu réactionnel peut se lier à l'apo- α -La et lui permettre de revenir vers une conformation native. Et si la concentration de la forme native augmente, les sites de coupures par la thermolysine deviennent moins accessibles et très peu de peptides sont alors obtenus.

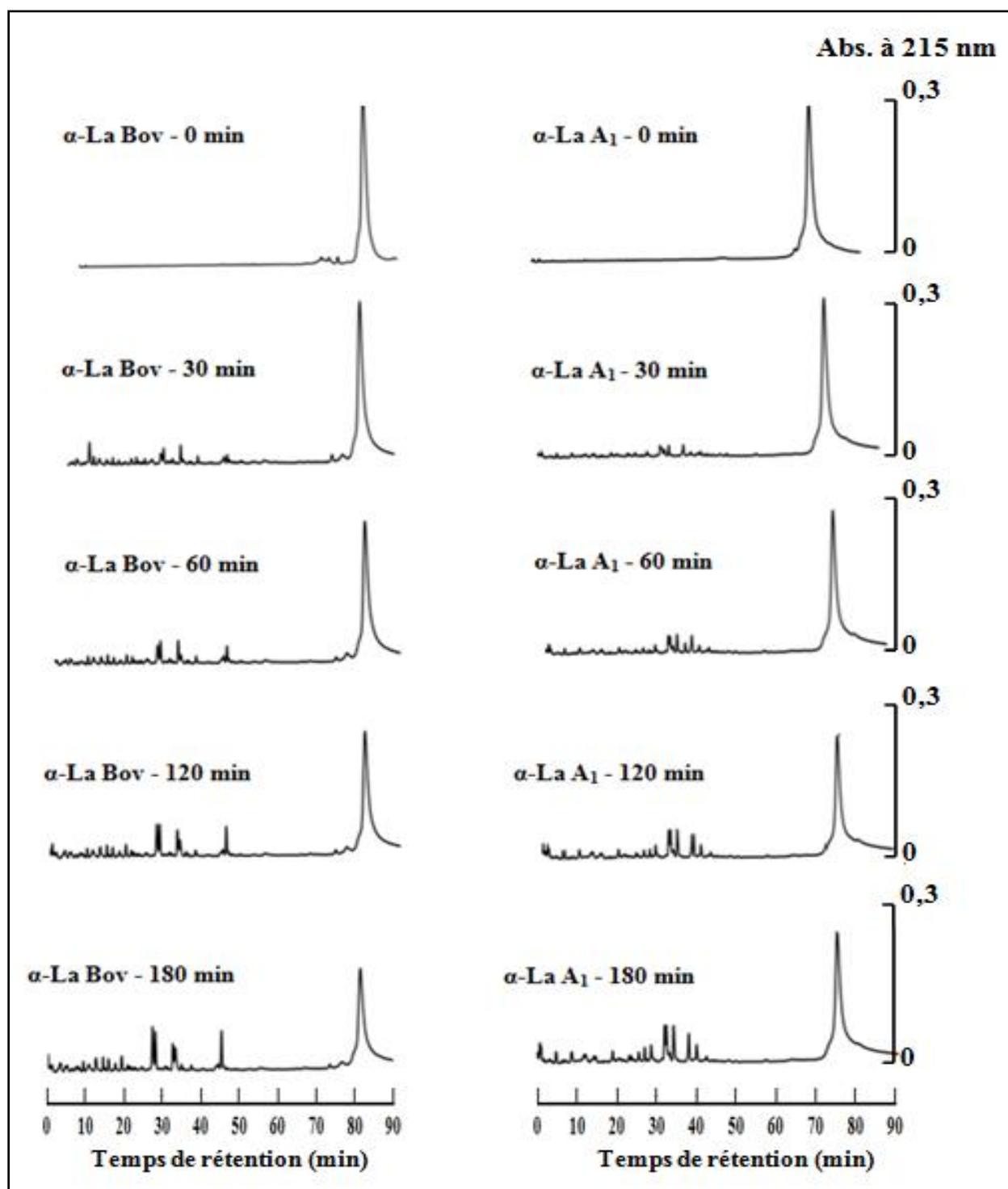


Figure 40. Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine bovine (α -La Bov) et cameline (α -La A₁) traités par la thermolysine (1/80) à 37°C, à différents temps d'incubation (0-180 min).

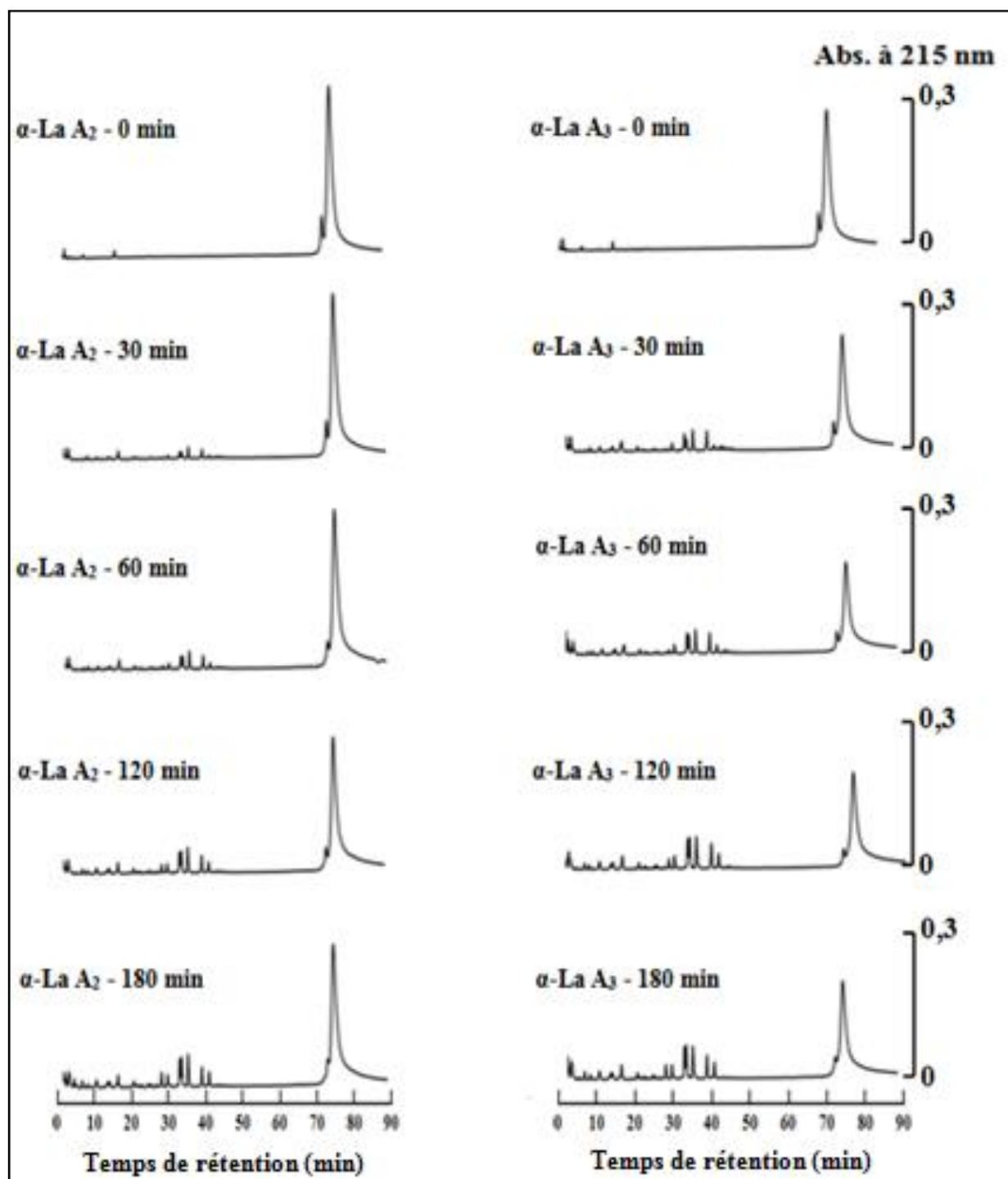


Figure 41. Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline A₂ (α -La A₂) et A₃ (α -La A₃) traités par la thermolysine (1/80) à 37°C, à différents temps d'incubation (0-180 min).

Dans tous les cas, les fragments d'hydrolyse nécessitent, une identification par analyse en spectrométrie de masse associée par la suite à une analyse de la composition en acides aminés afin de localiser les sites de coupures et la localisation des peptides générés par les enzymes protéolytiques à l'intérieur de la structure primaire de l' α -La cameline native et désamidée.

3.3.3.2. Action de la trypsine

Lorsque l'hydrolyse de l' α -La native et désamidée est réalisée en présence de trypsine dans un tampon phosphate, pH 7,8, une quantité d' α -La non hydrolysée est encore présente après 3 h d'hydrolyse (figure 42 et 43).

Des résultats similaires sont apportés par Pintado et Malcata (2000) qui ont montré que les protéines homologues dans les laits caprin et ovin sont hydrolysées très rapidement par la pepsine mais très faiblement par la trypsine. Les produits d'hydrolyse pepsique ont été identifiés. Leurs masses moléculaires varient de 4000 à 8000 Da. Le reste des protéines sériques bovines, notamment la SA, caprines et ovines résistent à l'hydrolyse trypsique et pepsique (Pintado et Malcata, 2000).

Les travaux de Dubois-Deleval (2006) sur l'hydrolyse trypsique de l' α -La bovine ont montré que la catalyse enzymatique à 37°C est beaucoup plus rapide que celle menée à 25°C. Un massif de peptides est apparu à 37°C dès 30 min d'incubation. Puis au fur et à mesure de l'hydrolyse, ce massif disparaît laissant apparaître à sa place d'autres fractions à des temps d'élution plus petits.

Griko et Remeta (1999) et Polverino de Laureto *et al* (2002) ont montré que la température d'incubation ainsi que le milieu réactionnel (en particulier la force ionique) avaient un rôle très important sur la conformation native de l' α -La.

Dans un tampon phosphate de sodium 100 Mm, la cinétique d'hydrolyse montre qu'elle est plus lente que dans un tampon triethanolaminehydrochloride (TRA) 200mM en présence de 20mM CaCl₂ (Dubois-Deleval, 2006). Ceci s'ajoute au rôle du calcium dans la stabilisation de la structure de l' α -La ce qui la rend résistante aux attaques enzymatiques (Chrysina *et al.*, 2000).

Lieske et Konrad (1996) expliquent que l'hydrolyse rapide de l' α -La est liée au pH du milieu. De ce fait, le pH de la transition de l' α -La de sa forme repliée à sa forme dépliée (apo- α -La) par la perte de son ion Ca²⁺ se situe environ à 2. Ceci coïncide avec le pH optimum de la pepsine, mais il reste inférieur aux pH de la trypsine et la thermolysine.

La structure globulaire compacte de l' α -La est aussi à l'origine de la difficulté à l'hydrolyser dans son état natif à pH neutre et à température ambiante. Tout comme la trypsine et la thermolysine, l' α -La native est résistante à l'action de la protéinase K à température ambiante, malgré la large spécificité de substrat de cette enzyme (Lebherz *et al.*, 1986).

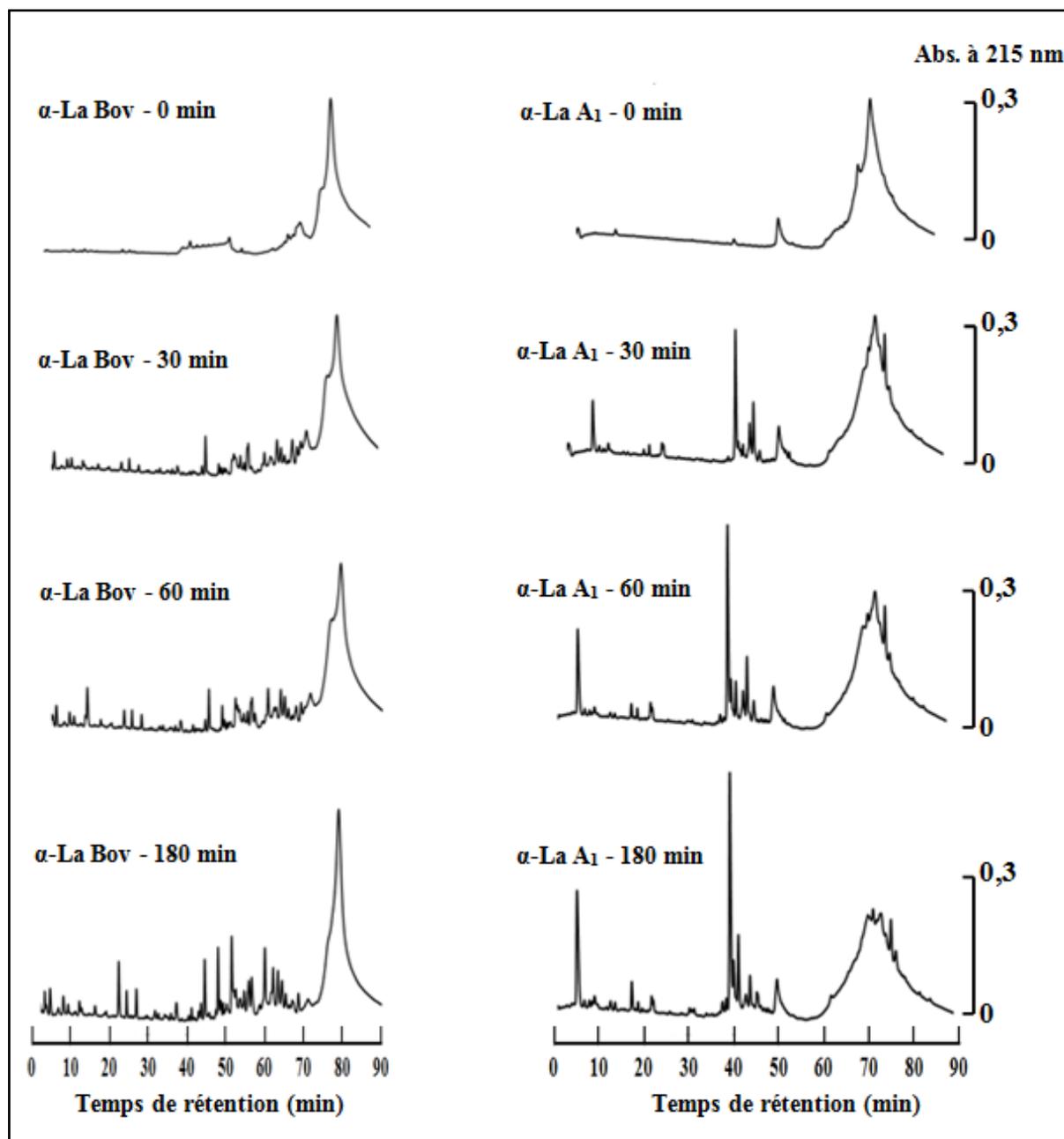


Figure 42. Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine bovine (α -La Bov) et cameline (α -La A₁) traités par la trypsine (1/100) à 37°C, à différents temps d'incubation (0-180 min).

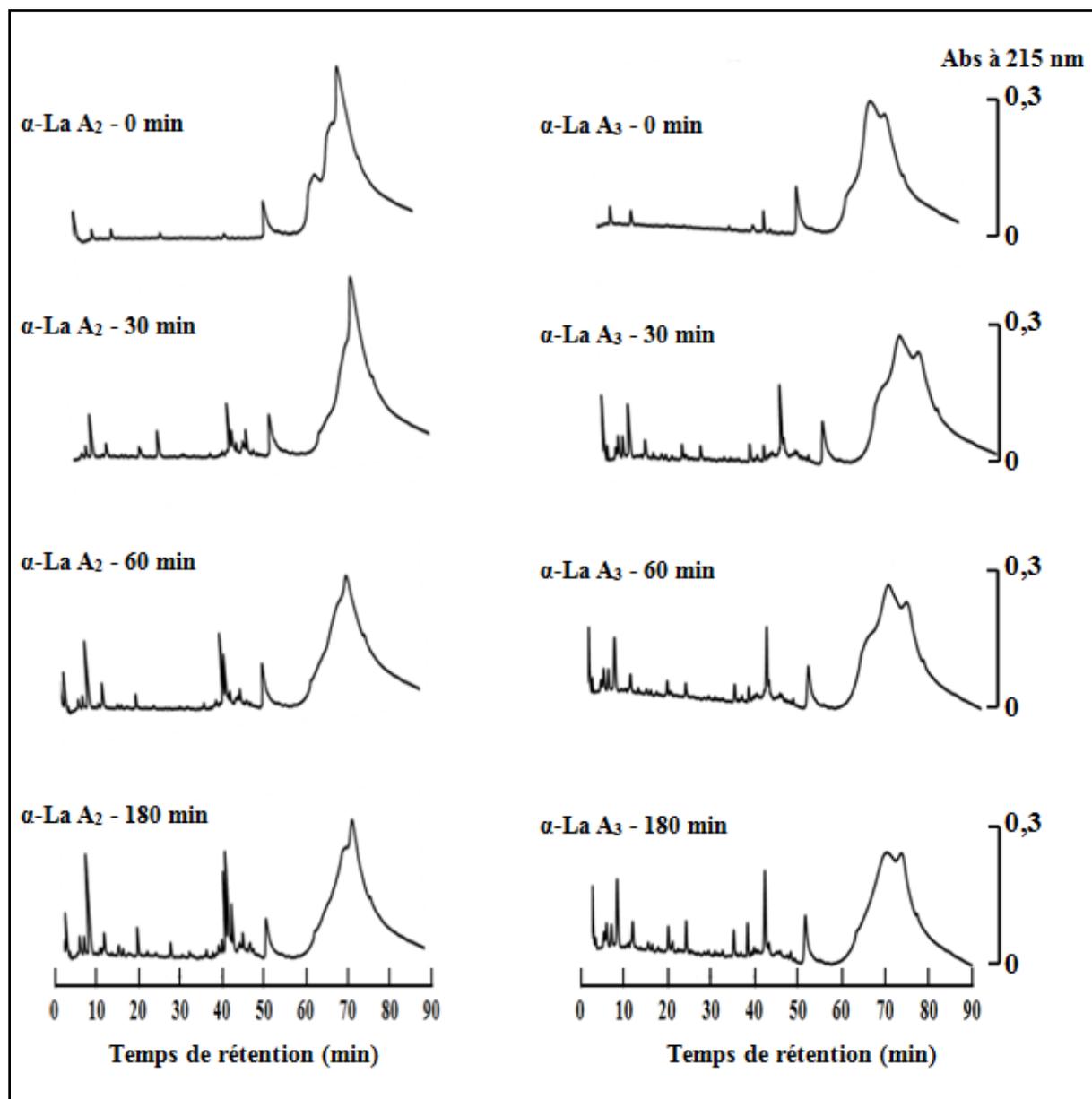


Figure 43. . Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline A₂ (α -La A₂) et A₃ (α -La A₃) traités par la trypsine (1/100) à 37°C, à différents temps d'incubation (0-180 min).

L' α -La est aussi insensible à la papaïne à pH 8 et à 40°C, alors que la β -Lg est rapidement hydrolysée à cette valeur de pH, ce qui suggère que c'est bien la nature compacte de l' α -La à pH 8 qui est la cause de sa résistance à l'hydrolyse (Schmidt et van Markwijk, 1993 ; Lieske et Konrad, 1996). Par contre, à pH 2,5, l' α -La devient hydrolysable par la papaïne.

Une protéolyse limitée est observée lorsque l' α -La est hydrolysée par la pepsine à pH 2 à 20°C (Polverino de Laureto *et al.*, 1995). Ceci indique que l'état déplié de l' α -La (état *molten globule*), obtenu par perte de l'ion calcium à pH acide), est encore suffisamment structuré et rigide pour empêcher une dégradation complète de la protéine (Polverino de Laureto *et al.*, 1995).

3.3.3.3. Comparaison de la digestion par la thermolysine et la trypsine de l' α -Lactalbumine native et désamidée

Afin d'examiner de près l'effet des deux enzymes (thermolysine et trypsine) sur l' α -La native et désamidée, nous avons considérés les profils obtenus après 180 min d'hydrolyse pour un temps de rétention de 15 à 50 min (Figure 44 et 45).

Nous constatons qu'avec la thermolysine, il n'y a pas de différence entre les peptides produits au cours du temps. Cela s'explique par le fait que cette enzyme est de spécificité large, elle dénature et dégrade plus vite la protéine et donc, les sites d'hydrolyse sont tous rapidement accessibles à la thermolysine.

Quant à la trypsine, celle-ci ne peut attaquer que quelques sites qui lui sont accessibles à la surface de l' α -La et qui sont donc plus ou moins accessibles selon que la protéine est native ou désamidée, puisque les peptides produits sont différents. La désamidation aurait donc un effet sur le repliement de la protéine en modifiant sa conformation spatiale. Néanmoins, la protéine conserve majoritairement sa structure globulaire compacte, dans la mesure où seulement une faible proportion de la protéine est hydrolysée.

Il reste entendu que réaliser ces expériences de protéolyses enzymatiques (thermolysine et trypsine) à une température plus élevée aurait certes permis d'hydrolyser totalement la protéine dans un état dénaturé, mais cela ne nous aurait pas permis de discriminer l'effet de la seule désamidation sur l'aptitude à la protéolyse.

Nous concluons qu'une sensibilité à la protéolyse est observée, la forme désamidée est attaquée plus facilement. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse que la digestion dans l'intestin serait plus facile pour des protéines désamidées, ce qui pourra par conséquence libérer des peptides potentiellement responsables de certains cas d'allergie aux protéines du lait (Gall *et al.*, 1996) ou certaines maladies inflammatoires chroniques.

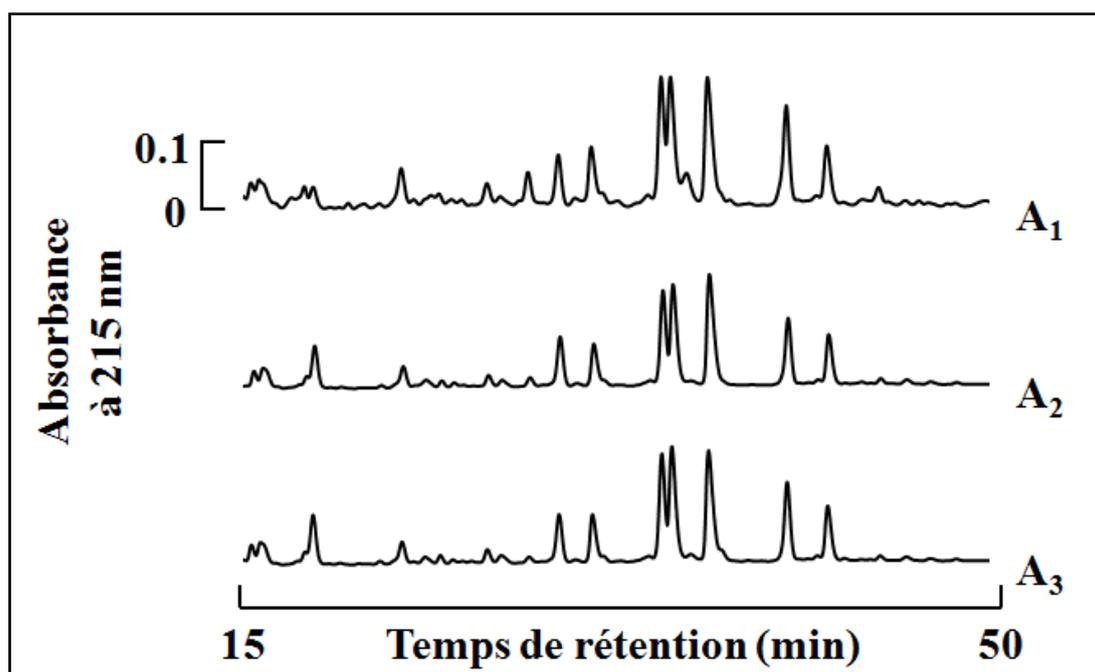


Figure 44. Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline (A₁, A₂ et A₃) traitées par la thermolysine à 37°C après 180 min d'incubation

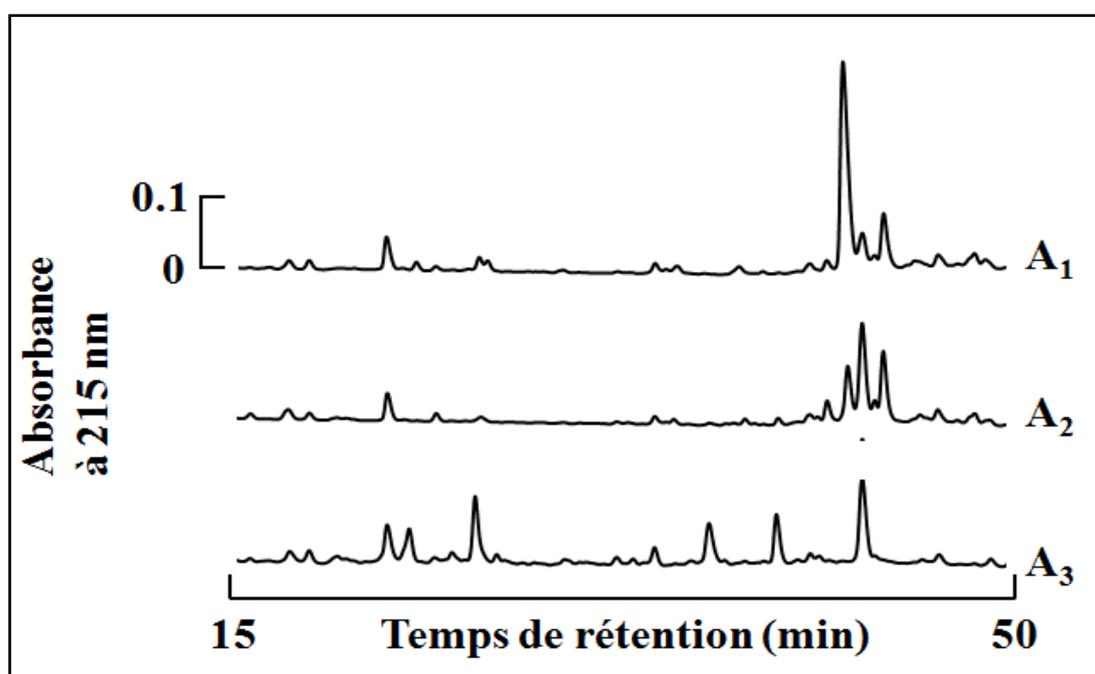


Figure 45. Chromatogrammes par HPLC en phase reverse sur une colonne LichroCart C₁₈ des hydrolysats de l' α -Lactalbumine cameline (A₁, A₂ et A₃) traitées par la trypsine à 37°C après 180 min d'incubation.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Le lait de dromadaire est un produit alimentaire important pour les populations de certaines régions arides du monde, particulièrement en Afrique et en Asie, car c'est l'un des rares laits produits qui, en plus d'avoir une bonne valeur nutritionnelle, ne s'altère pas aussi vite que les autres laits, mieux, il est doté de vertus thérapeutiques et cosmétiques, qui font actuellement l'objet d'investigations scientifiques de par le monde pour infirmer ou confirmer ses biens fondés. Etant donné l'intérêt que suscite ce produit, il nous a semblé nécessaire d'approfondir les connaissances concernant les composés protéiques de ce lait, notamment les protéines sériques qui sont la source de peptides d'intérêts nutritionnel et biofonctionnel.

Les protéines sériques, isolées du lait camelin collecté dans la région de Ouargla par précipitation à pH 4,3, ont été caractérisées par leurs comportements électrophorétiques sur gel de polyacrylamide (tant en conditions natives, qu'en conditions dissociantes et dénaturantes). Les profils obtenus ont confirmé la présence de protéines camelines homologues à celles du lait bovin (α -La, SA, IgG) à l'exception de la β -Lg qui n'est pas détectée dans les échantillons de lait étudié. Nous avons relevé des différences de mobilités électrophorétiques par rapport au lait de référence, suggérant la présence de différences d'ordre structural notables (composition et disposition des acides aminés, modifications post-traductionnelles) qui pourraient avoir des conséquences sur les comportements physico-chimiques de ces protéines et sur leur propriétés techno-fonctionnelles.

Pour l'isolement et la purification des protéines camelines individuelles, particulièrement l' α -La, qui fait l'objet de ce présent travail, nous avons entamé le fractionnement en examinant l'apport de deux méthodes chromatographiques (échange d'anions sur DEAE Cellulose et perméation ou exclusion moléculaire sur Sephacryl S200).

Aucune de ces deux méthodes n'a permis de séparer totalement l' α -La des autres protéines sériques. Même si la combinaison des deux était envisageable pour affiner la purification, nous avons eu l'opportunité d'isoler cette protéine et de l'obtenir en une seule étape de fractionnement avec un haut degré de pureté en ayant recours à la chromatographie rapide d'échange d'ions (FPLC) sur mono Q. L' α -La ainsi obtenue migre en une seule bande en SDS-PAGE et en deux bandes en Alkaline-PAGE.

Partant du fait que la structure primaire de l' α -La cameline présentait deux sites potentiels de désamidation spontanées Asn-Gly: Asn¹⁶-Gly¹⁷ et Asn⁴⁵-Gly⁴⁶, nous avons voulu mettre en évidence cette modification chimique en suivant par FPLC sur mono Q son comportement quand elle est incubée dans un tampon phosphate de sodium 20 mM, aux pH 7,4 et 8,4 pendant des temps variables (0-80h) à 37°C. Les résultats ont montré que, contrairement à l' α -La du lait bovin, celle provenant du lait de dromadaire, reste instable dans les conditions physiologiques à 37°C, à pH neutre (7,4) ou à pH plus basique (8,4).

L'incubation de l' α -La cameline dans un tampon phosphate 150 mM à 37°C et l'étude des paramètres cinétiques de la réaction ont montré la formation de deux nouvelles isoformes : A₂ (qui apparaît rapidement aux pH 7,4 et 8,4) et A₃ (qui n'apparaît que lentement

à pH 8,4). De même, en déterminant les constantes catalytiques, il apparaît que la transformation de l' α -La cameline native (A_1) en isoforme A_2 est plus rapide que sa transformation en isoforme A_3 . Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) est de 40 h pour l'isoforme A_2 (plus stable) et 12 h à pour l'isoforme A_3 (le moins stable). Ainsi, l'augmentation du pH de l'environnement favorise la désamidation de l' α -La cameline.

La modélisation moléculaire réalisée pour comprendre pourquoi les deux sites Asn¹⁶-Gly¹⁷ et Asn⁴⁵-Gly⁴⁶ ne se désamident pas à la même vitesse et dans les mêmes conditions a révélé que le résidu Asn⁴⁵ est localisé dans une boucle en contact avec le solvant aqueux et n'est impliqué dans aucune liaison hydrogène, alors que le résidu Asn¹⁶ est présent dans une structure secondaire impliquée dans la formation de deux liaisons hydrogènes qui stabilisent cette région et qui sont, par voie de conséquences, défavorables pour la réaction de désamidation, car elles rigidifient la liaison peptidique impliquée dans le mécanisme de désamidation. Ce dernier, à la différence du cas de Asn⁴⁵, n'est donc pas spontané pour Asn¹⁶.

Les trois isoformes de l' α -La cameline A_1 , A_2 et A_3 , purifiées en deux étapes, par FPLC puis par HPLC, ont été caractérisées par 2D-PAGE et leurs pHi apparents déterminés. Chaque isoforme se présente sous forme d'un seul spot d'une MM d'environ 14 kDa. Leurs pHi sont estimés à 5,63 (A_1), 5,36 (A_2) et 5,05 (A_3). Ces valeurs sont corrélées avec leur ordre d'élution observé en FPLC et leur vitesse de migration en Alkaline-PAGE.

Comme la désamidation non enzymatique d'une protéine fait augmenter sa MM de 0,981 Da, cette différence nécessite le recours à un spectromètre de masse très sensible telle la spectrométrie à transformée de Fourier (FT-ICR), dont l'utilisation nous a donné les masses moléculaires suivantes : 14 421,8659 (A_1), 14 422,8569 (A_2) et 14 423,8479 Da (A_3). Les différences de masse de 0,991 Da entre A_1 et A_2 et 1,982 Da entre A_1 et A_3 confirment la présence d'une désamidation non enzymatique sur un site pour A_2 et deux sites pour A_3 .

L'analyse par spectrométrie de masse en tandem (FT-ICR-MS/MS) a permis de montrer de façon irréfutable qu'il s'agit bien des résidus Asn¹⁶ et Asn⁴⁵ qui étaient sujets au phénomène de désamidation chimique et que cela ne touche pas les résidus Asn qui ne sont pas suivis de résidu Gly.

Le dernier point de l'étude a porté sur l'effet de la désamidation sur la stabilité de la conformation de l' α -La cameline. Nous avons développés trois approches complémentaires (spectrométrie, thermodynamique et protéolytique) pour essayer d'avoir des éléments de réponses à cette question.

Les résultats montrent que la désamidation non enzymatique de l' α -La cameline rend la structure tridimensionnelle beaucoup plus stable. Nous avons observé un gain de 5% en structure secondaire (hélice α) entre la forme native A_1 et la forme désamidée A_2 et 3% environ entre A_1 et A_3 . Ceci est corrélé avec les résultats de la DSC qui montrent une augmentation de la température de fusion de 3°C pour l'isoforme A_2 et 6°C pour l'isoforme A_3 par rapport à A_1 .

Les résultats de la protéolyse par la thermolysine n'ont montré aucune différence sensible entre les peptides produits au cours du temps. Quant à la trypsine, celle-ci ne peut attaquer que quelques sites qui lui sont accessibles à la surface de l' α -La et qui sont donc plus ou moins accessibles selon que la protéine est native ou désamidée, puisque les peptides produits sont différents. La désamidation aurait donc un effet sur le repliement de la protéine en modifiant sa conformation spatiale. Néanmoins, la protéine conserve majoritairement sa structure globulaire compacte, dans la mesure où seulement une faible proportion de la protéine est hydrolysée.

En plus de ces résultats ainsi exposés, nous avons pu réaliser la structure tridimensionnelle aux RX après cristallisation de l' α -La du lait camelin. Cela a pu être rendu possible grâce à la connaissance du phénomène de désamidation que nous avons élucidé, ce qui explique au même temps pourquoi la structure spatiale de cette protéine n'a jamais été réalisée auparavant, car ce mécanisme de désamidation n'avait pour l'heure pas été mis en évidence.

Cette structure tridimensionnelle va nous permettre de valider la modélisation moléculaire qui reste encore à l'état d'hypothèse pour expliquer la différence de désamidation des 2 résidus Asn.

Notre investigation sera aussi complétée par une étude RMN afin de déterminer la nature chimique du résidu désamidé, soit Asp soit isoAsp. D'autres études plus poussées nous semblent aussi importantes. Telles qu'une étude de la biodisponibilité et de la toxicité potentielle de peptides issus de la digestion de l' α -La cameline contenant des séquences Asn-Gly. Ces peptides susceptibles de se désamider spontanément dans l'intestin, car ils se retrouveraient dans un environnement légèrement basique, à 37°C et tout étant potentiellement dépourvus de structure secondaire ordonnée inhibitrice de la réaction de désamidation.

Il y a lieu aussi d'envisager une étude sur la capacité qu'un peptide issu de la digestion de cette α -La cameline altérée puisse provoquer des réactions auto-immunes lors de sa désamidation, et qui pourrait être source d'allergie après ingestion de produits à base de lait de chamelle.

Il nous semble aussi intéressant d'étudier l'effet des peptides désamidés sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), qui se caractérisent par l'inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif (liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif), source de lésions destructrices (ulcérations).

L'étude de la biodisponibilité des peptides désamidés et leur interaction avec l'épithélium intestinal pourra être envisagée en chambre de Ussing où un morceau de tissu est placé entre deux demi-chambres, de manière à délimiter deux compartiments : le compartiment luminal ou muqueux, en contact avec la bordure en brosse des cellules épithéliales et le compartiment basolatéral ou séreux, en contact avec la couche musculaire du tissu intact.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abu-Lehia I. H. (1987).** Composition of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42(6), 368-371.
- Abu-Lehia I. H. (1989).** Physical and chemical characteristics of camel milk fat and its fractions. *Food Chemistry*, 34, 261-271.
- Al-Saleh A. A. (1996).** Heat coagulation of camel milk. *Journal of King Saud University*, 8, 107-117.
- Alim N., Fondrini F., Bonizzi I., Feligini M. and Enne G. (2005).** Characterization of casein fractions from Algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(2), 112-116.
- Anderson P. J., Brooks C. L. and Berlinger L. J. (1997).** Functional Identification of calcium binding residues in bovine α -Lactalbumin. *Biochemistry*, 36, 11648-11643.
- Araki F., Nakamura H., Nojima N., Tsukumo K. and Sakamoto S. (1989).** Stability of recombinant human epidermal growth factor in various solutions. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 37(2), 404-410.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. and Schwede T. (2006).** The Swiss-Model workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22, 195-201.
- Aswad D. W. (1984).** Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 10714-10721.
- Aswad D. W. (1995).** Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins. *CRC Series in Analytical Biotechnology*, 65-90.
- Aswad D.W., Paranandi M. V. and Schurter B. T. (2000).** Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 1129-1136.
- Athmer L., Kindrachuk J., Georges F. and Napper S. (2002).** The influence of protein structure on the products emerging from succinimide hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30502-30507.
- Atri M. S., Saboury A. A., Yousefi R., Dalgalarondo M., Chobert J. M., Haertlé T. and Moosavi-Movahedi A. A. (2010).** Comparative study on heat stability of camel and bovine apo and holo alpha-lactalbumin. *Journal of Dairy Research*, 77(1), 43-49.
- Attia H., Kherouatou N., Fakhfakh N., Khorchanl T. and Trigui N. (2007).** Dromedary milk fat: biochemical, microscopic and rheological characteristics. *Journal of Food Lipids*, 7(2), 95-112.
- Barbeau J., Gauthier S. F. and Pouliot Y. (1996).** Thermal stabilization of β -Lactoglobulin by whey peptide fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3939-3945.
- Barten D. M. and O'Dea R. F. (1990).** The function of protein carboxyl methyltransferase in eucaryotic cells. *Life Science*, 47, 181-194.
- Bayoumi S. (1990).** Studies on composition and rennet coagulation of camel milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 42(1), 3-8.
- Beg O. U. (1986).** Characterization of camel milk whey proteins. Ph.D. Thesis, University of Karachi, Pakistan.
- Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H. and Jörnvall H. (1984).** A small camel protein rich in cystein / half cystine. *Bioscience Reports*, 4, 1065-1070.
- Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H. and Jörnvall H. (1985).** The primary structure of α -Lactalbumin from camel milk. *European Journal of Biochemistry*, 147, 233-239.

- Beg O. U., Bahr-Lindström H. V., Zaidi Z. H. and Jörnvall H. (1987).** Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. *Federation of European Biochemical Societies*, 216(2), 270-274.
- Belizy S., Nasarova I. N, Procof'ev V. N., Sorokina I. A., Puschkina N. V. and Lukach A. I. (2001).** Changes in antioxidative properties of lactoferrin from women's milk during deamidation. *Biochemistry*, 66, 576-580.
- Benkerroum N. (2008).** Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *African Journal of Biotechnology*, 7, 4856-4867.
- Bennett E. J., Bjerregaard J. J., Knapp E., Chavous D. A., Friedman A. M., Royer W. E. and O'Connor C. M. (2003).** Catalytic implications from the Drosophila protein L-isoaspartyl methyltransferase structure and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 42, 12844-12853.
- Bhatt N. P., Patel K. and Borchardt R. T. (1990).** Chemical pathways of peptide degradation. I. Deamidation of adrenocorticotrophic hormone. *Pharmacological Research*, 7, 593-599
- Bican P. (1995).** The application of the high-performance ion-exchange chromatography for the analysis of bovine milk proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 41(7), 958-962
- Boivin D., Bilodeau D. and Béliveau R. (1995).** Immunochemical characterization of L-isoaspartyl-protein carboxyl methyltransferase from mammalian tissues. *Biochemical Journal*, 309, 993-998.
- Bonomo, R. C. F., Saraiva S. H., Coimbra J. S., Minim V. P., Minim L. A. and Fontan R. C. (2003).** Multicomponent adsorption of whey proteins by ion exchange. *Brazilian Journal of Food and Technology*, 6(2), 323-326.
- Bordin G., Cordeiro Raposo F., Calle B. and Rodriguez A. R. (2001).** Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 928, 63-76.
- Boye J. I., Alli I. and Ismail A. A. (1997).** Use of differential scanning calorimetry and infrared spectroscopy in the study of thermal and structural stability of α -Lactalbumin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1116-1125.
- Brahms S. and Brahms J. (1980).** Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Journal of Molecular Biology*, 138, 149-78.
- Bramaud C., Aimar P. and Daufin G. (1997).** Whey protein fractionation : Isoelectric precipitation of α -Lactalbumin under gentle heat treatment. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 391-397
- Brennan T. V. and Clarke S. (1995).** Deamidation and isoaspartate formation in model synthetic peptides: The effects of sequence and solution environment ; in: «*Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*». Aswad D. W, ed. Ann Arbor, Michigan.
- Brinkmann C. R., Thiel, S. and Otzen D. E. (2013).** Protein-fatty acid complexes: biochemistry, biophysics and function. *Federation of the Societies of Biochemistry and Molecular Biology Journal*. 280, 1733-1749.
- Bushmarina N. A., Blanchet C., Vernier G. et Forge, V. (2005).** Repliement des protéines: exemple de l' α -Lactalbumine. *Journal de Physique IV (Proceedings)*, 130, 209-228.
- Capasso S., Mazzarella L., Sica F. and Zagari A. (1989).** Solid-state conformations of aminosuccinyl peptides: Crystal structure of tertbutyloxycarbonyl-L-leucyl-L-aminosuccinyl-L-phenylalaninamide. *Biopolymers*, 28, 139-147.
- Case D. A., Darden T. A., Cheatham T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E. and Merz K. M. (2012).** AMBER 12, *University of California*, San Francisco.
- Caussin F. and Bouhallab S. (2004).** Environnement minéral et propriétés fonctionnelles des protéines sériques ; in : «*Minéraux et Produits Laitiers*». Gaucheron F, ed. Tec & Doc, Paris.

- Chavous D. A., Jackson F. R. and O'Connor C. M. (2001).** Extension of the *Drosophila* lifespan by overexpression of a protein repair methyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 14814-14822.
- Chazin W. J. and Kossiakoff A. K. (1995).** The role of secondary and tertiary structure in intramolecular déamidation of proteins ; in : «*Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*». Aswad, D. W. ed. Boca Raton, Michigan.
- Chi E. Y., Krishnan S., Randolph T. W. and Carpenter J. F. (2003).** Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation, *Pharmaceutical Research*, 20, 1325-1336.
- Chrysina E. D., Brew K. and Acharya K. R., (2000).** Crystal structures of *apo*- and *holo* bovine alpha-lactalbumin at 2.2 Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biology and Chemistry*, 275(47), 37021-37029.
- Clarke S. (1987).** Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 30(6), 808-821.
- Clarke S. (2003).** Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. *Ageing Research Reviews*, 2, 263-285.
- Conti A., Godovac-Zimmermann J., Napolitano L. and Liberatori J. (1985).** Identification and characterization of two α -lactalbumin from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*). *Milchwissenschaft*, 40(11), 673-675.
- Conti A. Napolitano L., Lai P., Pinna W. and Godovac-Zimmermann J. (1989).** Isolation of donkey whey proteins and N-terminal amino acid sequence of α -Lactalbumins A and B, β -Lactoglobulins I and II and lysozyme. *Milchwissenschaft*, 44, 138-141.
- Corredig M. and Dalgleish D. G. (1995).** A differential microcalorimetric study of whey proteins and behaviour in oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 411-422.
- Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N. and Deroanne C. (2000).** Evolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait : Synthèse bibliographique. *Lait*, 80, 209-222.
- Darrington R. T. and Anderson B. D. (1995).** Evidence for a common intermediate in insulin deamidation and covalent dimer formation: effects of pH and aniline trapping in dilute acidic solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(3), 275-282.
- Davies D. T. and Law A. J. R. (1980).** Content and composition of protein in creamy milk in South-West Scotland. *Journal of Dairy Research*, 47, 83-90.
- Debois-Delval V. (2006).** Préparation de peptides antimicrobiens à partir de l'hydrolyse enzymatique de deux protéines : l'hémoglobine bovine et l' α -lactalbumine bovine. Thèse de Doctorat Science de l'université de Lille, France.
- Demarest S. J., Boice J. A., Fairman R. and Raleigh D. P. (1999).** Defining the core structure of the α -lactalbumin molten globule state. *Journal of Molecular Biology*, 294 213–221.
- Demarest S. J., Zhou S. Q., Robblee J., Fairman R., Chu B. and Raleigh D. P. (2001).** A comparative study of peptide models of the α -domain of α -lactalbumin, lysozyme, and α -lactalbumin/lysozyme chimeras allows the elucidation of critical factors that contribute to the ability to form stable partially folded states. *Biochemistry*, 40 2138–2147.
- Desmet J. and Van Cauwelaert F. (1988).** Calorimetric experiments of Mn^{2+} -binding to alpha-lactalbumin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 957(3), 411-419.
- Desmet J., Hanssens I. and Van Cauwelaert F. (1987).** Comparison of the binding of Na^+ and Ca^{2+} to bovine alpha-lactalbumin. *Biochimica and Biophysica Acta*, 912(2), 211-219.

- Desrosiers R. R. and Fanélus I. (2011).** Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues in aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT. *Current Aging Science*, 4(1), 8-18.
- De Wit J. N. (1989).** Fonctionnal properties of whey proteins ; in «*Developments in Dairy Chemistry*». Fox P.F. ed. Elsevier Science, New-York.
- De Wit, J. N. (1998).** Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *Journal of Dairy Science*, 81, 597-608.
- De Wit J. N. and Klarenbeek G. (1981).** A differential scanning calorimetric study of the thermal behavior of bovine β -lactoglobulin at temperatures up to 160°C. *Journal of Dairy Research*, 48, 293-302.
- Di Donato A., Ciardiello M. A, de Nigris M., Piccoli R., Mazzarella L. and D'Alessio G. (1993).** Selective deamidation of ribonuclease A: Isolation and characterization of the resulting isoaspartyl and aspartyl derivatives. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(7), 4745-4751.
- Diliberto E. J. and Axelrod, J. (1976).** Regional and subcellular distribution of protein carboxymethylase in brain and other tissues. *Journal of Neurochemistry*, 26, 1159-1165.
- Dolgikh D. A., Abaturov L. V., Bolotina I. A., Brazhnikov E. V., Bychkova V. E., Gilmanshin R. I., Lebedev Y., Semisotnov G. V., Tiktopulo E. I. and Ptitsyn O. B. (1985).** Compact state of a protein molecule with pronounced small-scale mobility: Bovine α -lactalbumin. *European Biophysics Journal*, 13, 109-121.
- Eigel W. N., Butler J. E., Ernstrom C. A., Farrell H. M. Jr., Harwalkar V. R., Jenness R. and Whitney R. M. (1984).** Nomenclature of proteins of cow's milk: Fifth revision. *Journal of Dairy Science*, 67, 1599-1631.
- El-Agamy E. I. (2000).** Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cows' and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, 68, 227-232.
- El-Agamy E. I., Abou-Shloue Z. I. and Abdel-Kader Y. I. (1998).** Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, 43, 57-70.
- El-Agamy E. I., Nawar M., Shamsia S. M., Awad S. and Haenlein G. F. W. (2009).** Are camel milk proteins convenient to the nutrition of cow milk allergic children. *Small Ruminant Research*, 82, 1-6.
- EL-Hatmi H., Girardet J. M., Gaillard J. L., Khorchani T. and Attia H. (2006).** Therapeutic potential of whey proteins of camel colostrums. *Microbiologie et Hygiène Alimentaire*, 18(53), 70-76.
- Elamin F. M. and Wilcox C. J. (1992).** Milk composition of Majaheim camels. *Journal of Dairy Science*, 75, 3155-3157.
- Ellega K. H., Gammelga-Larsen C., Srensen E. S. and Fedosov S. (1999).** Process scale chromatographic isolation, characterization and identification of tryptic bioactive casein phosphopeptides. *International Dairy Journal*, 9, 639-652.
- Farag S. I. and Kabary K. M. (1992).** Chemical composition and physical properties of camel's milk and milk fat ; in «*Proceedings of the 5th Egyptian Conference on Dairy Science and Technology*». Caire, Egypt.
- Farah Z. (1986).** Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, 41(12), 763-765.
- Farah Z. (1993).** Composition and characteristics of camel milk: Review article. *Journal of Dairy Research*, 60, 603-626.
- Farah Z. (1996).** Camel milk properties and products. *Center for Developments Cooperation in Technology and Management*, Switzerland, Swiss.

- Farah Z. and Atkins D. (1992).** Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 59, 229-231.
- Farah Z. and Bachmann M. R. (1987).** Rennet coagulation properties of camel milk. *Milchwissenschaft*, 42, 689-692.
- Farah Z. and Farah-Riesen M. (1985).** Separation and characterization of major components of camel milk casein. *Milchwissenschaft*, 40, 669-671.
- Farah Z. and Rüegg M. W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8, 211-216.
- Farah Z. and Rüegg M. W. (1991).** The creaming properties and size distribution of fat globules in camel milk. *Journal of Dairy Science*, 74(9), 2901-2904.
- Farah Z., Rettenmaier R. and Atkins D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal of Vitamin and Nutrition Research*, 62, 30-33.
- Farah K., Nyariki D., Ngugi R., Noor I. and Guliye A. (2004).** The Somali and the camel: Ecology, management and economics. *Anthropologist*, 6, 45-55.
- Felipe X. and Andrew J. R. L. (1997).** Preparative scale fractionation of bovine, caprine and ovine whey proteins by gel permeation chromatography. *Journal of Dairy Research*, 64, 459-464.
- Fontana A., Polverino de Laureto P., Spolaore R., Frare E., Picotti P. and Zambonin M. (2004).** Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochimica Polonica*. 51, 299-321.
- Forge V., Wijesinha R. T., Balbach J., Brew K., Robinson C.V., Redfield C. and Dobson C. M. (1999).** Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine α -lactalbumin. *Journal of Molecular Biology*, 288 673-688.
- Fox P. F. (1989).** The milk protein systems ; in : «*Developments in Dairy Chemistry*». Ed Applied Science Publishers, New York.
- Gall H., Kalveram C. M., Sick H. and Sterry W. (1996).** Allergy to the heat-labile proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin in mare's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 1304-1307.
- Gassem M. A. and Abu-Tarboush H. M. (2000).** Lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* in camel's and cow's wheys. *Milchwissenschaft*, 55, 374-378.
- Geiger T. and Clarke S. (1987).** Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. *Journal of Biology Chemistry*, 262, 785-794.
- Gingras D., Ménard P. and Béliveau R. (1991).** Protein carboxyl methylation in kidney brush border membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1066, 261-267.
- Gingras D., Boivin D., Bilodeau D., Pelletier J. et Béliveau R. (1994).** Les protéines carboxyle méthyltransférase des eucaryotes: deux classes distinctes d'enzymes. *Médecine/Science*, 10, 55-64.
- Girardet J. M., Saulnier F., Gaillard J. L., Ramet J. P. and Humbert G. (2000).** Camel (*Camelus dromedarius*) milk PP3: evidence for an insertion in the amino-terminal sequence of the camel milk whey protein. *Biochemistry and Cell Biology*, 78, 19-26.
- Girardet J. M., N'Negue M. A., Egito A. S., Campagna S., Lagrange A. and Gaillard J. L. (2004).** Multiple forms for equine α -lactalbumin: evidence of N-glycosylated and deamidated forms. *International Dairy Journal*, 14, 207-217.
- Girardet J. M., Miclo L., Florent S., Mollé D. and Gaillard J. L. (2006).** Determination of the phosphorylation level and deamidation susceptibility of equine β -casein. *Proteomics*, 6, 3707-3717.
- Goff H. D. and Hill, A. R. (1993).** Chemistry and Physics. Ed. Dairy Science and Technology Handbook, New York.

- Gómez J., Hilser V. J., Xie D. and Freire E. (1995).** The heat capacity of proteins. *Proteins: Structure., Function and Bioinformatics*, 22, 404–412.
- Griko Y. V. and Remeta D. P. (1999).** Energetics of solvent and ligand-induced conformational changes in alpha-lactalbumin. *Protein Science*, 8(3), 554-561.
- Griko Y. V., Freire E. and Privalov P. L. (1994).** Energetics of the α -lactalbumin states: A calorimetric and statistical thermodynamic study. *Biochemistry*, 33, 1889–1899.
- Grill J. D. and Cummings J. L. (2010).** Current therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(5), 711-28.
- Gu Y. S., Matsumura Y., Yamaguchi S. and Mori T. (2001).** Action of protein-glutaminase on α -lactalbumin in the native and molten states. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5999-6005.
- Gurgel V. P., Carbonell G. R., Swaisgood E. H. (2001).** Studies of the binding of α -lactalbumin to immobilized peptide ligands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5765-5770.
- Haddadin M. S. Y., Gammoh S. I. and Robinson R. K. (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research*, 75, 8-12.
- Hakansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., Sabharwal H. and Svanborg C. (1995).** Apoptosis induced by a human milk protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 8064-8068.
- Hamada J. S. (1992).** Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins. *Journal of Food Science*, 56(6), 1725-1728.
- Hambling S. G., Ac Alpine A. S. and Sawyer L. (1992).** B-Lactoglobulin ; in «*Advanced Dairy Chemistry*». Fox P. F., ed. Elsevier Applied Science, London.
- Harwalkar V. R. and Kalab M. (1985).** Thermal denaturation and aggregation in solution. Electron microscopic study. *Milchwissenschaft*, 40, 65-68.
- Hendrix T., Griko Y. V. and Privalov P. L. (2000).** A calorimetric study of the influence of calcium on the stability of bovine alpha-lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, 84(1), 27-34.
- Herbert B. K., Molloy M. P., Gooley A. A., Walsh B. I., Bryson W. G. and Williams K. L. (1998).** Improved protein solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis*, 19, 845-851.
- Hill R. L. and Brew K. (1975).** Lactose synthetase. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 43, 411-489.
- Höhne G. W. H., Hemminger W. F. and Flammersheim H. J. (2003).** Introduction In Differential Scanning Calorimetry. 2 ed, Springer, Berlin, Germany.
- Huebscher K. J., Lee J., Rovelli G., Ludin B., Matus A., Stauffer D. and Furst P. (1999).** Protein isoaspartyl methyltransferase protects from Bax-induced apoptosis. *Gene*, 240, 333-341.
- Ingrasso D., Cimmino A., D'Angelo S., Alfinito F., Zappia V. and Galletti, P. (2002).** Protein methylation as a marker of aspartate damage in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes: role of oxidative stress. *European Journal of Biochemistry*, 269, 2032-2039.
- Jelen P. and Rattray W. (1995).** Thermal denaturation of whey proteins ; in «*Heat-Induced Changes in Milk*». Fox P.F. Ed. International Dairy Federation, Brussels.
- Johnson B. A. and Aswad D. W. (1995).** Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of purified proteins ; in «*Deamidation and Isoaspartate Formation In Peptides and Proteins*». Aswad D. W. ed. Boca Raton, Michigan.
- Johnson W. C. Jr. and Tinoco I. Jr. (1972).** Circular dichroism of polypeptide solutions in the vacuum ultraviolet. *Journal of the American Chemical Society*, 94(12), 4389-4481.

- Jrad Z., El Hatmi H., Adt I., Girardet J. M., Cakir-Kiefer C., Jardin J., Degraeve P., Khorchani T. and Oulahal N. (2014).** Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science and Technology*, 94, 205-224.
- Kaminogawa S., McKenzie H. A. and Shaw D.C. (1984).** The amino acid sequence of equin α -lactalbumin. *Biochemistry*, 9, 539-546.
- Kamoun M. (1994).** Evolution de la composition du lait de dromadaire durant la lactation : conséquences technologiques. *Actes du Colloque*, 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Kappeler S. (1998).** Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland.
- Kappeler S., Farah Z. and Puhan Z. (1998).** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research*, 65, 209-222.
- Kappeler S., Farah Z. and Puhan, Z. (1999).** Alternative splicing of lactophorin mRNA from lactating mammary gland of the camel (*Camelus dromedarius*). *Journal of Dairy Science*, 82, 2084-2093.
- Kappeler S., Farah Z. and Puhan Z. (2003).** 5-Flanking regions of camel milk genes are highly similar to homologue regions of other species and can be divided into two distinct groups. *Journal of Dairy Science*, 86, 498-508.
- Karray N. L., Danthine S., Blecker C. and Attia H. (2006).** Contribution to the study of camel milk fat globule membrane. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57(5/6), 382-390
- Karue C. N. (1998).** The dairy characteristics of the Kenyan camel. Actes du colloque Dromadaires et chameaux, animaux laitiers. Nouakchott, Mauritanie.
- Kelleher S. L., Chatterton D., Neilsen K. and Lönnerdal B. (2003).** Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant rhesus monkeys. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1261-1268.
- Khan B. B. and Iqbal, A. (2001).** Production and composition of camel milk: A review. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 38, 64-68.
- Khaskheli M., Arain M. A., Chaudhry S., Soomro A. H. and Qureshi T. A. (2005).** Physico-chemical quality of camel milk. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 2, 164-166.
- Kherouatou N., Nasri M. and Attia H. (2003).** A study of the dromedary milk casein micelle and its changes during acidification. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6, 237-244.
- Kiefer F., Arnold K., Kunzli M., Bordoli L. and Schwede T. (2009).** The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 37, 387-392.
- Kihal M. Chekroun A., Bensoltane A., Kheroua O. and Saidi D. (1999).** Characterization of Algerian raw camels milk : proteins content and native lactic acid bacteria. 1^{ères} Journées sur la Recherches Cameline, 25 au 27 mai, ITAS, Ouargla, Algérie.
- Kim S. (1973).** Purification and properties of protein methylase II. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 157, 476-484.
- Kim S., Choi J. and Jun G. J. (1983).** Purification and characterization of protein methylase II from human erythrocytes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 8, 9-14.
- Kindrachuk J., Parent J., Davies G. F., Dinsmore M., Attah-Poku S. and Napper S. (2003).** Overexpression of L-isoadipate O-methyltransferase in *Escherichia coli* increases heat shock survival by a mechanism independent of methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 50880-50886.

- Köhler C., Gogvadze V., Håkansson A., Svanborg C., Orrenius S. and Zhivotovsky B. (2001).** A folding variant of human alpha-lactalbumin induces mitochondrial permeability transition in isolated mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 268(1), 186-191.
- Konuspayeva G., Faye B., Loiseau G. and Levieux D. (2007).** Lactoferrin and immunoglobulin contents in camel's milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and hybrids) from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*, 90, 38-46.
- Konuspayeva G., Lemarie E., Faye B., Loiseau G. and Montet D. (2008).** Fatty acid and cholesterol composition of camel's (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedaries* and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Science and Technology*, 88, 327-340.
- Konuspayeva G., Faye B., and Loiseau G. (2009).** The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 95-101.
- Koo M. W. (1994).** The effects of milk and calcium on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Pharmacological Research*. 29, 217-224.
- Kossiakoff A. A. (1988).** Tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation. *Science*, 240(4849), 191-195.
- Kunz C. and 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.
- Kuwajima K. (1989).** The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins: Structure and Function*, 6, 87-103.
- Kuwajima K. (1996).** The molten globule state of α -lactalbumin: a review. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 10, 102-109.
- Laemmli D. K. and Favre M. (1973).** Maturation of the head of bacteriophage T4 DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*. 80, 575-599.
- Laleye L. C., Jobe B. and Wasesa A. A. H. (2008).** Comparative study on heat stability and functionality of camel and bovine whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 91, 4527-4534.
- Larsson-Raznikiewicz M. and Mohamed M. A. (1986).** Why difficult to make cheese from camel milk ; in «*Proceedings of the 22nd International Dairy Congress*», Dordrecht, Netherlands.
- Leberherz H.G., Burke T., Shackelford J. E., Strickler J. E. and Wilson K. J. (1986).** Specific proteolytic modification of creatine kinase isoenzymes. Implication of C-terminal involvement in enzymic activity but not in subunit-subunit recognition. *Journal of Biochemistry*, 233, 51-56.
- Leu D. J., O'Byrne W. I., Zawilinski L., McVerry J. G. and Everett-Cacopardo H. (2009).** Expanding the new literacies conversation. *Educational Researcher*, 38, 264-273.
- Levieux D., Levieux A., El-Hatmi H. and Rigaudière J. P. (2005).** Immunochemical quantification of heat denaturation of camel (*Camelus dromedarius*) whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 72, 1-9.
- Liberatori J., Morisio-Guidetti L., Conti A. and Napolitano L. (1979).** β -Lactoglobulin in the mammary secretions of camel (*Camelus dromedarius*) and She-Ass. Immunological detection and preliminary physico-chemical characterization. *Bollettino di Società Italiano di Biologia*, 55, 1369-1373.
- Lieske B. and Konrad G. (1996).** Interrelation between pH and availability of α -lactalbumin and β -lactoglobulin for proteolysis by papain. *International Dairy Journal*, 6, 359-370.
- Lindner H. and Helliger W. (2001).** Age-dependent deamidation of asparagine residues in proteins. *Experimental Gerontology*, 36, 1551-1563.
- Lopez C., Karray N., Lesieur P. and Ollivon M. (2005).** Crystallisation and melting properties of dromedary milk fat globules studied by X-ray diffraction and differential

- scanning calorimetry. Comparison with anhydrous dromedary milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(9), 673-683.
- Lorient D., Closs B. et Courthaudon. (1991).** Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. *Lait*, 71, 141-171.
- Lowenson J. D. and Clarke S. (1992).** Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 5985-5995.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.
- Lutter P., Meyer H. E., Langer M., Witthohn K., Dormeyer W. Sickmann A. and Bluggel M. (2001).** Investigation of charge variants of rViscumin by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22, 2888-2897.
- MacLaren D. C., Kagan R. M. and Clarke S. (1992).** Alternative splicing of the human isoaspartyl protein carboxyl methyltransferase RNA leads to the generation of a C-terminal -RDEL sequence in isozyme II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185, 277-283.
- Malacarne M., Martuzzi F., Summer A. and 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, 869-877.
- Mamula M. J., Gee R. J., Elliott J. I., Sette A., Southwood S., Jones P. J. and Blier P. R. (1999).** Isoaspartyl posttranslational modification triggers autoimmune responses to self-proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22321-22327.
- Manning M. C., Patel K. and Borchardt R. T. (1989).** Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceutical Research*, 6, 903-918.
- Markus C. R., Olivier B. and De Haan E. F. (2002).** Whey protein rich in α -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improve cognitive performances in stress-vulnerable subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 1051-1056.
- Matéos A., Girardet J. M., Mollé D., Dary A., Miclo L. and Gaillard J. L. (2009).** Two-dimensional cartography of equine β -casein variants achieved by isolation of phosphorylation isoforms and control of the deamidation phenomenon. *Journal of Dairy Science*, 92, 2389-2399.
- Mati A., Girardet J-M., Xenakis D. and Linden G (1991).** Isolement and caractérisation de la fraction hydrophobe des protéose-peptones des laits bovin, ovin and caprin. *Lait*, 71, 259-273.
- Matsumoto H., Shimokawa Y., Ushida Y., Toida T. and Hayasawa H. (2001).** New biological function of bovine alpha-lactalbumin: protective effect against ethanol- and stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 1104-11.
- McFadden P. N. and Clarke S. (1987).** Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: implications for the cellular repair of damaged proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 2595-2599
- McGuffey M. K. (2004).** Thermal stability of α -lactalbumin. Ph.D. Thesis, North Carolina State University.
- Mehaia M. A. (1987).** Studies on camel milk casein micelles. Treatment with soluble and immobilized pepsin. *Arab Gulf Journal of Scientific Research*, 3, 391-400.
- Mehaia M. A. (1994).** Vitamin C and riboflavin content in camel milk : effect of heat treatment. *Food Chemistry*, 50, 153-155.

- Mehaia M. A., Hablas M. A., Abdel-Rahman K. M. and El-Mougy S. A. (1995).** Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 52, 115-122.
- Meinwald Y. C., Stimson E. R. and Scheraga H. A. (1986).** Deamidation of the asparaginyl-glycyl sequence. *International journal of peptide and protein research*, 28(1), 79-84.
- Merin U., Bernstein S., Bloch-Damti A., Yagil R., Creveld C., Lindner P. and Gollop N. (2000).** A comparative study of milk serum proteins in camel milk (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrum. *Livestock Production Science*, 67(3), 297-301.
- Merin U., Bernstein S., Van Creveld C., Yagil R. and Gollop N. (2001).** Camel (*Camelus dromedarius*) colostrum and milk composition during the lactation. *Milchwissenschaft*, 56, 70-74.
- Meyer J. P., Stanley D. J., Herscovitch L. and Topolnytsky L. (2002).** Affective, continuance and normative commitment to the organization: A Meta-analysis of antecedents, correlates, and consequences. *Journal of Vocational Behavior*, 61, 20-52.
- Minoia P., Garicci A. C., Massari S., Bozzetti M., Dell'aquila M. E. and Lacalandra G. M. (1994).** Isolation and characterization of dromedary camel κ -casein cDNA. Actes du Colloque, 24-26 octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- Mohamed A. (1993).** Characterization of camel milk b-casein. Ph.D. Thesis, University of Karachi, Pakistan.
- Mohamed M. A., Mursal A. I. and Larsson-Raznikiewicz M. (1989).** Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. *Milchwissenschaft*, 44, 278-280.
- Mok K. H., Pettersson J., Orrenius S. and Svanborg, C. (2007).** HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354, 1-7.
- Murakami K., Andree P. J. and Berliner L. J. (1982).** Metal ion binding to alpha-lactalbumin species. *Biochemistry*, 21, 5488-94.
- Murray E. D. and Clarke S. (1984).** Synthetic peptid substrates for the erythrocyte protein carboxyl methyltransferase. Detection of a new site of methylation at isomerized L-aspartyl residues. *Journal of Biological Chemistry*. 259, 10722-10732.
- Nilsson M. R., Driscoll M. and Raleigh D. P. (2002).** Low levels of asparagine deamidation can have a dramatic effect on aggregation of amyloidogenic peptides: Implications for the study of amyloid formation. *Protein Science*, 11, 342-349.
- N'Negue M. A. (2006).** Étude de la structure et de la susceptibilité à la protéolyse de l'alpha-lactalbumine bovine en fonction des paramètres de la dénaturation thermique. Activités biologiques des peptides formés. Thèse de l'Université Henri Poincaré, France.
- N'Negue M. A., Miclo L., Girardet J. M., Campagna S., Molle D. and Gaillard J. L. (2006).** Proteolysis of bovine alpha-lactalbumin by thermolysin during thermal denaturation. *International Dairy Journal*, 16 (10), 1157-1167.
- Nonaka Y., Aizawa T., Akieda D., Yasui M., Watanabe M., Watanabe N., Tanaka I., Kamiya M., Mizuguchi M., Demura M. and Kawano K. (2008).** Spontaneous asparaginyl deamidation of canine milk lysozyme under mild conditions. *Proteins*, 72(1), 313-22.
- Noriyoshi M., Ryota K. and Ohgi T. (2015).** Glycolic Acid-Catalyzed Deamidation of Asparagine Residues in Degrading PLGA Matrices: A Computational Study. *International Journal of Molecular Science*, 16(4), 7261-7272.
- Nurminen M. L., Sipola M., Kaarto H., Pihlanto-Leppälä A., Piilola K., Korpela R., Tossavainen O., Korhonen H. and Vapaatalo H. (2000).** Alpha-lactorphin lowers blood pressure measured by radiotelemetry in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, 66(16), 1535-1543.

- Ochirkhuyag B., Chobert J. M., Dalgarrondo M., Choiset Y. and Haertle T. (1997).** Characterization of caseins from Mongolian yak, khainak and bactrian camel. *Lait*, 77, 601-613.
- Ochirkhuyag B., Chobert J. M., Dalgarrondo M., Choiset Y. and Haertle T. (1998).** Characterization of whey proteins from Mangolian yak, khainak and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 105-124.
- Ohri S. P. and Joshi B. K. (1961).** Composition of camel milk. *Indian Veterinary Journal*, 38, 514-516
- Omer R. H. and Eltinay A. H. (2009).** Changes in chemical composition of camel's raw milk during storage. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 6076610.
- Pâquet D., Nejjar Y. and Linden G. (1988).** Study of a hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose-peptone. *Journal of Dairy Science*. 71, 1464-1471.
- Patel K. and Borchardt R. T. (1990).** Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical Research*, 7(7), 703-11.
- Paty E., Chedevergne F., Scheinmann P., Wal J.-M. et Bernard H. (2003).** Allergie au lait de chèvre et de brebis sans allergie associée au lait de vache. *Revue Française d'Allergologie*, 43(7), 455-462
- Peitsch M. C. (1995).** Protein modelling by E-Mail. *Biotechnology*, 13, 658-660.
- Permyakov E. A. and Berliner L. J. (2000).** α -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473, 269-274.
- Permyakov E. A., Kalinichenko L. P., Morozova L. A., Yarmolenko V. V., Burstein E. A. (1981).** Alpha-Lactalbumin binds magnesium ions: study by means of intrinsic fluorescence technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 102(1), 1-7.
- Permyakov E. A., Morozova L. A. and Burstein E. A. (1985).** Cation binding effects on the pH, thermal and urea denaturation transitions in alpha-lactalbumin. *Biophysical Chemistry*, 21(1), 21-31.
- Phadungath C. (2005).** Casein micelle structure: a concise review. *Journal of Science Technology*, 27(1), 201-212.
- Pike A. C. W., Brew K. and Acharya K. R. (1996).** Crystal structures of guinea-pig, goat, and bovine α -lactalbumin highlight the enhanced conformational flexibility of regions that are significant for its action in lactose synthesis. *Structure*, 4, 691-703
- Pintado M. E. and Malcata F. X. (2000).** Hydrolysis of ovine, caprine and bovine whey proteins by trypsin and pepsin. *Bioprocess Engineering*, 23(3), 275-282.
- Polverino de Laureto P., De Filippis V., Di Bello M., Zambonin M. and Fontana A. (1995).** Probing the molten globule state of α -lactalbumin by limited proteolysis. *Biochemistry*, 34, 12596-12604.
- Polverino de Laureto P., Frare E., Gottardo R. and Fontana A. (2002).** Molten globule of bovine α -lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: a comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Proteins*, 49, 385-397.
- Prioult G., Pecquet S. and Fliss I. (2004).** Stimulation of interleukin-10 production by acidic β -lactoglobulin-derived peptides hydrolysed with *Lactohacillus paracasei* NCC2461 peptidases. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11, 266-271.
- Radkiewicz J. L., Zipse H., Clarke S. and Houk K. N. (2001).** Neighboring side chain effects on asparaginyl and aspartyl degradation: an ab initio study of the relationship between peptide conformation and backbone NH acidity. *Journal of the American Chemical Society* 123, 3499-3506.

- Ramakrishnan B., Boeggeman E. and Qasba P.K. (2002).** Beta-1,4-galactosyltransferase and lactose synthase: molecular mechanical devices. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(5), 1113-1118.
- Ramet J. P. (2001).** The technology of making cheese from camel milk (*Camelus dromedary*). *Animal Production and Health Paper*, 113. Rome, Italy: F.A.O.
- Reissner K. J. and Aswad D. W. (2003).** Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 1281-1295.
- Relkin P. (1996).** Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 36(6), 565-601.
- Relkin P. and Launay B. (1990).** Concentration effects on the kinetics of β -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids*, 4 (1), 19-32.
- Relkin, P. and Mulvihill, D. M. (1996).** Thermal unfolding of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin. A thermodynamic approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36, 565-601.
- Relkin P., Launay B. and Eynard L. (1993).** Effect of sodium and calcium addition on thermal denaturation of apo-lactalbumin: a differential scanning calorimetry study. *Journal of Dairy Science*, 76, 36-47.
- Ren J. and Stuart D. I. (1993).** α -lactalbumin possesses a distinct binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 19292-19298.
- Robin O., Turgeon S. and Paquin P. (1993).** Functional properties of milk proteins. Ed. Dairy Science and Technology Handbook. New-York.
- Robinson N. E. (2002).** Protein deamidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 5283-5288.
- Robinson N. E. and Robinson A. B. (2001).** Molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 944-949.
- Robinson N. E. and Robinson A. B. (2004).** Amide molecular clocks in drosophila proteins: potential regulators of aging and other processes. *Mechanisms of Ageing and Development*. 125, 259-267.
- Robinson A. B. and Rudd C. J. (1974).** Deamidation of glutamyl and asparaginyl residues in peptides and proteins. *Current Topics in Cellular Regulation*, 8, 247-95.
- Robinson A. B., Mc Kerrow J. H. and Cary P. (1970).** Controlled deamidation of peptides and proteins: an experimental hazard and a possible biological timer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 753-7.
- Robinson A. B., Scotchler J. W. and McKerrow J. H. (1973).** Acceleration of the rate of deamidation of GlyArgAsnArgGly and of human transferrin by addition of L-ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(7), 2122-2125.
- Robinson N. E., Robinson Z. W., Robinson B. R., Robinson A. L., Robinson J. A., Robinson M. L. and Robinson A. B. (2004).** Structure-dependent nonenzymatic deamidation of glutamyl and asparaginyl pentapeptides. *Journal of Peptide Research*, 63, 426-436.
- Roche R. S. and Voordouw G. (1978).** The structural and functional roles of metal ions in thermolysin. *Critical Reviews in Biochemistry*, 5, 1-23.
- Ryttersgaard C., Griffith S. C., Sawaya M. R., MacLaren D. C., Clarke S. and Yeates T. O. (2002).** Crystal structure of human L-isoaspartyl methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 10642-10646.
- Salami M., Yousefi R., Ehsani M. R., Razavi S. H., Chobert J. M., Haertlé T., Saboury A. A., Atri M. S., Niasari-Naslaji A., Ahmad F. and Moosavi-Movahedi A. A. (2009).**

- Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α -lactalbumin: possible significance for use in infant formula. *International Dairy Journal*, 19, 518-523.
- Sawaya W. N., Khalil J. K., Al-Shalhat A. and Al-Mohammad, H. (1984).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science*, 49, 744-747.
- Schlimme E. (1990)** ; in “*Composition and characteristics of camel milk: Review article*”; Farah, Z. (1993). *Journal of Dairy Research*, 60, 603-626.
- Schmidt D. G. and Van Markwijk B. W. (1993).** Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 47, 15-22.
- Scotchler J. W. and Robinson A. B. (1974).** Deamidation of glutamyl residues: dependence on pH, temperature, and ionic strength. *Analytical Biochemistry*, 59(1), 319-22.
- Shih F. F. and Kalmar A. D. (1987).** SDS-catalyzed deamidation of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 35, 672-675.
- Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H. and Shirasawa T. (2000).** Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 381, 225-234.
- Shuiep E. S., El Zubeir I. E. M., El Owni O. A. O. and Musa H. H. (2008).** Influence of season and management on composition of raw camel (*Camelus dromedarius*) milk in Khartoum state, Sudan. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8, 101-106.
- Siboukeur O., Mati A. et Hesses B. (2005).** Amélioration de l’aptitude à la coagulation du lait camelin (*Camelus dromedarius*): utilisation d’extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires. *Cahiers Agricultures*, 5(14), 473-478.
- Sindayikengera S. and Xia W. (2006).** Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two différent proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 77-97.
- Slangen C. J. and Visser S. (1999).** Use of mass spectrometry to rapidly characterize the heterogeneity of bovine α -lactalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 4549-4556.
- Smith C. G., Carson M., Friedmap A. M., Skinner M. W., Delucas L., Chantalat L., Weise L., Shirasawa T. and Chattopadhyay D. (2002).** Crystal structure of human L-isoaspartyl-O-méthyltransferase with S-adenosyl homocysteine at 1.6 Amstrong resolution and modeling of an isoaspartyl-containing peptide at the active site. *Protein Science*, 11(3), 625-635.
- Song Y., Schowen R. L., Borchardt R. T. and Topp E. M. (2001).** Effect of 'pH' on the rate of asparagine deamidation in polymeric formulations: 'pH'-rate profile. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(2), 141-56.
- Squier T. C. (2001).** Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Experimental Gerontology*, 36, 1539-1550.
- Sreerama N. and Woody R. W. (2004a).** Computation and analysis of protein circular dichroism spectra, *Methods In Enzymology*, 383, 318-351.
- Sreerama N. and Woody R. W. (2004b).** On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra, *Protein Science*, 13, 100-112.
- Stahl T., Sallmann H. P., Duehlmeier R. and Wernery U. (2006).** Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrums. *Journal of Camel Practice and Research*, 13, 53-57.
- Stephenson R.C and Clarke S. (1989).** Succinimide formation from aspartyl and asparaginyll peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 6164–6170.

- Stevenson C. L., Friedman A. R., Kubiak T. M., Donlan M. E. and Borchardt R. T. (1993).** Effect of Secondary Structure on the Rate of Deamidation of Several Growth Hormone Releasing Factor Analogs. *International Journal of Peptide Research*, 42(6), 497–503.
- Svensson M., Sabharwal H., Hakansson A., Mossberg A. K., Lipniunas P., Leffler H., Svanborg C. and Linse S. (1999).** Molecular characterization of α -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 6388-6396.
- Svensson M., Hakansson A., Mossberg A. K., Linse S. and Svanborg C. (2000).** Conversion of α -lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4221-4226.
- Swaigood H. E. (1982).** Chemistry of milk protein ; in : « *Development in Dairy Chemistry* ». Ed. Applied Science Publishers, London.
- Teshima G., Hancock W. S. and Canova-Davis E. (1995).** Effects of désamidation and isoaspartate formation on the activity of proteins ; in : « *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins* ». Aswad D. W. Ed. Boca Raton, Michigan.
- Tyler-Cross R. and Schirch V. (1991).** Effects of amino acid sequence, buffers, and ionic strength on the rate and mechanism of deamidation of asparagine residues in small peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 22549-22556.
- Vanderheeren G. and Hanssens I. (1994).** Thermal unfolding of bovine alpha-lactalbumin. comparison of circular dichroism with hydrophobicity measurements. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7090-7094.
- Vanderheeren G., Hanssens I., Meijberg W. and Van Aerschot A. (1996).** Thermodynamic characterization of the partially unfolded state of Ca^{2+} loaded α -lactalbumin: evidence that partial unfolding can precede Ca^{2+} release. *Biochemistry*, 35, 16753–16759.
- Velusamy V. and Palaniappan L. (2011).** Compositionnal analysis α -lactalbumin. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1, 106-120
- Wakankar A. A. and Borchardt R. T. (2006).** Formulation considerations for proteins susceptible to asparagine deamidation and aspartate isomerization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(11), 2321-2357.
- Wangoh J., Farah Z. and Puhan, Z. (1998).** Composition of milk from three camel (*Camelus dromedarius*) breeds in Kenya during lactation. *Milchwissenschaft*, 53 (3), 136-139.
- Watanabe Y., Iwaki T., Shimono Y., Ichimiya A., Nagaoka Y. and Tamai Y. (1999).** Characterization of the $\text{Na}^{(+)}$ -ATPase gene (ZENA1) from the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(2), 136-42.
- Wernery U. (2006).** Camel milk, the white gold of the desert. *Journal of Camel Practice and Research*, 13, 15-26.
- Wernery U. (2008).** Camel milk-new observations. *International Camel conference. Recent trends in camel research and future strategies for saving camels*. Bikaner, India.
- Wernery U., Johnson B. and Abraham A. (2005).** The effect of short-term heat treatment on vitamin C concentrations in camel milk, *Milchwissenschaft*, 60, 266-267.
- Wijesinha-Bettoni R., Dobson C.M. and Redfield C. (2001).** Comparison of the structural and dynamical properties of *holo* and *apo* bovine α -lactalbumin by NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 307, 885-898.
- Wright H. T (1991).** Sequence and structure determinants of the nonenzymatic deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins. *Protein Engineering*, 4(3), 283-94.
- Wright H. T. and Robinson A. B. (1982).** In «*From Cyclotrons to Cytochromes* ». Kaplan N. O. and Robinson A. B. Ed. Academic Press, Orlando.

- Xie M. and Schowen R. L. (1999).** Secondary structure and protein deamidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 8-13.
- Yagil R. (1982).** Camels and camel milk. *Animal production and health report*. Rome, Italy.
- Yagil R. and Etzion Z. (1980).** Effect of drought condition on the quality of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 47, 159-166.
- Yagil R., Saran A. and Etzion Z. (1984).** Camels milk: for drinking only? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78A, 263-266.
- Yagil R., Zagorski O., Von Creveld C. and Saran A. (1994).** Science and camel milk production ; in «*Chameaux et Dromedaires, Animeaux Laitiers*». Saint-Martin, G. Ed. Expansion Scientifique Française, Paris.
- Yamamoto A., Takagi H. and Kitamura D. (1998).** Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 18, 2063-2074.
- Youcef N., Saidi D., Mezemaze F., El-Mecherfi K. E., Kaddouri H., Negaoui H., Chekroun A. and Kheroua O. (2009).** Cross Reactivity between Dromedary Whey Proteins and IgG Anti Bovine α -Lactalbumin and Anti Bovine β -Lactoglobulin. *American Journal of Applied Sciences*, 6 (8), 1448-1452.
- 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 of Dairy Science*, 73(9), 2292-2298.
- Young W. G., Hoofring S. A., Mamula M. J., Doyle H. A., Bunick G. J., Hu Y. and Aswad D. W. (2005).** Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Catalyzes in Vivo Racemization of Aspartate-25 in Mammalian Histone H2B. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 26094-26098.
- Yutanit K. and Ogasahara K. (1992).** Absence of the Thermal Transition in Apo- α -Lactalbumin in the Molten Globule State : A Study by Differential Scanning Microcalorimetry. *Journal of Molecular Biology*, 228, 347-350.
- Zhang H., Yao J., Zhao D., Liu H., LI J. and Guo M. (2005).** Changes in chemical composition of alxa bactrian camel milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 88(10), 3402-3410.

ANNEXES

Annexe 01 : Classification de *Camelus dromedarius*

Famille : *Camelidés*

Genre : *Camelus*



Camelus bactrianus



Camelus dromedarius



Camelus ferus

Genre : *Lama*



Lama glama



Lama guanicoe



Lama pacos



Vicugna vicugna

Annexe 2 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Lowry *et al.* (1951)**1. Solutions :****Solutions alcalines A**

- Soude 0.1 N.....500 ml
- Carbonate de sodium anhydre (Na₂CO₃).....10 g

Solution cuivrique B

- CuSO₄, 5H₂O (0.32 g/ 100ml).....2 ml
- Tartrate double de Na et de K (1 g/100ml).....2 ml

Solution C

- Solution A50 ml
- Solution B.....1 ml

Solution mère de BSA

- BSA.....10 mg
- Eau distillée100 ml

Gamme étalon

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

Concentration en BSA µg/ml	0	10	25	50	75	100
Solution mère de BSA (µl)	0	100	250	500	750	1000
Eau distillée (µl)	1000	900	750	500	250	0

2. Méthode

- 1 ml d'échantillon contenant 100 µg de protéine maximum et 25 µg minimum
- ajouter 5 ml de solution C et mélanger ;
- laisser 10 mn à température ambiante ;
- ajouter 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu ;
- laisser 30mn à l'obscurité ;
- lire la DO à 750 nm.

3. Expression des résultats

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

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

Annexe 3 : Publications et communication internationales

Une partie de ce travail a fait l'objet de communications internationales et publications suivantes :

Communications internationales

Si Ahmed Zennia, S., Mati, A., Miclo, L., Girardet, J.-M. (2014). Study of the spontaneous deamidation of camel's milk alpha-lactalbumin. 7th International Whey Conference, 07-09 septembre, Rotterdam, Pays-Bas

Si Ahmed Zennia, S., Girardet, J.-M. et Mati, A. (2015). Modification chimique de l' α -lactalbumine de chamelle : impacte sur sa thermostabilité. 3^{èmes} Journées Scientifiques de l'Agroalimentaire « JSAA » de l'Association Méditerranéenne des Industries Agroalimentaires (AMIAA), 15-18 Mars, Hammamet, Tunisie

Publications

Si Ahmed Zennia, S., Almi, D., Senoussi, C., Boudjenah, S., and Mati, A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 283–290.

Saliha Si Ahmed Zennia, Abderrahmane Mati , Franck Saulnier , Yann Verdier, Giovanni Chiappetta, Guillermo Mulliert, Laurent Miclo, Joëlle Vinh, Jean-Michel Girardet. (2015). Identification by FT-ICR-MS of *Camelus dromedarius* α -lactalbumin variants as the result of nonenzymatic deamidation of Asn-16 and Asn-45. *Food Chemistry*, 187, 305–313

REGULAR ARTICLE

Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*)

Si Ahmed Z. Saliha¹, Almi Dalila¹, Senoussi Chahra¹, Boudjenah H. Saliha² and Mati Abderrahmane^{1*}

¹Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB). Université M. Mammeri de Tizi Ouzou, Algérie

²Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-arides; Université K. Merbah de Ouargla, Algérie

Abstract

To characterize major protein fraction in Algerian dromedary's milk, two samples from Sahraoui population collected from two different regions were analyzed using electrophoretic and chromatographic techniques. Casein components and whey proteins were separated by DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephacryl S200 permeation gel chromatography respectively, and then identified by polyacrylamide gel electrophoresis which looked different from the corresponding patterns of the caseins and whey proteins from cow milk. Differences in casein composition between camel and bovine milk may influence their digestibility, hydrolysis of camel milk caseins using four different proteases (trypsin, chymotrypsin, pepsin and papain) was studied. Caseins were more rapidly hydrolyzed by pepsin because of the greater number of potential pepsin cleavage sites present in the primary structures of camel caseins.

Key words: Camel milk, Enzymatic hydrolysis, Protein characterization

Introduction

The camel is one of the most important domesticated animals in the arid and semiarid zones of tropical and sub-tropical countries. Not only can camels survive under conditions of severe water and heat stress, but they also provide an important source of nutrients in desert communities, especially important during periods of prolonged drought (Farah, 1993). Available information concerning dromedary milk (Farah and Farah-Riesen, 1985; Beg et al., 1984, 1986a, b, 1987; Mehaia, 1987; Mohammed and Larsson-Raznikiewicz, 1989, 1991; Farah, 1993; Alim et al., 2005; Zhang et al., 2005; Konuspayeva et al., 2009; Al-Haj et al., 2010; Ereifej et al., 2011) is related mainly to the Arabian dromedary *Camelus dromedarius* species. The present work has been carried out in order to present a more description of

the major milk proteins from Algerian dromedary's milk. This paper describes the separation of the caseins and the whey proteins by different chromatography and characterized by polyacrylamide gel electrophoresis. The sensitivity of camel's casein to the action of four proteases (trypsin, chymotrypsin, pepsin and papain) has been reported in the present work.

Materials and Methods

Preparation of milk samples

Two samples of dromedary milk from *Sahraoui* type were collected in Ouargla and Ghardaia regions. They were defatted by centrifugation 4000g at 4°C for 15 min.

Separation of the protein fraction into caseins and whey proteins was conducted according to a modified method from Ochirkhuyag et al. (2000). Specifically, whole casein was obtained from skimmed milk by isoelectric precipitation (pH 4.3) at 22°C using 1N HCl. The precipitate was washed twice with distilled water at pH 4.3, solubilized at pH 7 by addition of 1M NaOH, precipitated again at pH 4.3 with 1N HCl and washed three times with distilled water. Finally, the whole casein was solubilized at pH 7, freeze-dried and stored at -20°C. The supernatant, containing the whey proteins was dialyzed against distilled water and then freeze dried and kept at -20°C until used.

Received 13 March 2012; Revised 08 May 2012; Accepted 30 May 2012; Published Online 06 December 2012

*Corresponding Author

Mati Abderrahmane
Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et
Biotechnologies (LABAB). Université M. Mammeri de Tizi
Ouzou, Algérie

Email: mati_bio@yahoo.com

Fractionation of caseins and whey proteins

The individual caseins were separated by ion-exchange chromatography on DEAE-Cellulose (DE52, Watman, France) column (26 mm i.d x 26 cm) equilibrated with 10 mM imidazole/HCl buffer, pH 7.0, containing 3.3 mM urea and 10 mM 2-mercaptoethanol, and the bound proteins were eluted from the column with a linear gradient of 0-1M NaCl, at room temperature, at a flow of 0.3 mL min⁻¹ (Larsson-Raznikiewicz and Mohamed, 1986). The ion exchange chromatography was carried out on a low-pressure chromatography system (Bio-Rad, France). Fractionation of the whey proteins was performed by gel permeation chromatography on Sephacryl S200 (Amersham Biosciences) equilibrated with 0.02M Tris-HCl buffer pH 8.6 at room temperature, at a flow of 0.3 mL min⁻¹. The fraction size of collected eluate was about 1 mL. The absorbance of the fractions was determined at 280 nm. The fraction absorbance was plotted against elution volume using the LP Data View software.

Electrophoresis

Native PAGE with the vertical slab gel unit SE-250 series (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco) according to Hillier (1976) with a 12% (w/v) polyacrylamide gel in 0.75M Tris-HCl buffer, pH 8.9. Samples (2 mg mL⁻¹) were solubilised in 75 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, containing 10% (v/v) glycerol, and 0.01% (w/v) bromophenol blue.

Urea-PAGE was performed according to Andrews (1983) with an 8.2% (v/v) polyacrylamide gel in 75 mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, in the presence of 4M urea. Samples (2 mg mL⁻¹) were solubilised in 75mM Tris-HCl buffer, pH 8.9, containing 4M urea, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, and 0.01% (w/v) bromophenol blue.

SDS-PAGE was performed on a 4.9% (w/v) polyacrylamide in 0.125M Tris-HCl buffer, pH 6.8 stacking gel and a 15.4% (w/v) polyacrylamide in 0.38M Tris-HCl buffer, pH 8.8 containing 0.1% (w/v) SDS separation gel (Laemmli and Favre, 1973). Samples were dissolved at 2 mg mL⁻¹ in 0.125M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 0.1% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, and 0.01% (w/v) bromophenol blue. After heating at 100°C for 3 min, 20 µL of sample was loaded in the gel. The molecular mass standards (Sigma chemical CO, Missouri, USA) were Urease (270.0 kDa), bovine serum albumin (66.0 kDa), egg albumin (45.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa) and bovine lactalbumin (14.0 kDa). For both

electrophoretic methods, volumes of 20 µL of samples were loaded in the gel,

proteins were fixed with 12% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) for 30 min and then, stained for 60 min with 0.5% (w/v) R-250 Coomassie blue dissolved in a mixture of 50% (v/v) ethanol and 12% (w/v) TCA, followed by an overnight destaining in a solution containing 30% (v/v) ethanol, 7.5% (v/v) acetic acid, and 5% (w/v) TCA.

In vitro proteolysis of camel whole caseins

The *in vitro* hydrolysis were performed as follows: a) chymotrypsin (EC 3.4.21.1; activity 45 U mg⁻¹ protein) and trypsin (EC 3.4.21.4; activity 13500 U mg⁻¹ protein): enzyme/protein ration 1/200 (w/w) in 0.1M sodium phosphate buffer (pH 8) at 40°C; b) pepsin (EC 3.4.23.1; activity 400-800 U mg⁻¹): enzyme/protein ration 1/250 (w/w) in 0.01N HCl (pH 2) at 37°C; c) papain (EC 3.4.22.2; activity 12 U mg⁻¹): enzyme/protein ration 1/800 (w/w) in 0.5M Tris-HCl buffer (pH 7) at 37°C and the final concentration of caseins was always 10 mg mL⁻¹. The reaction was stopped at different times by diluting the digestion mixture with the same volume of sample buffer (0.125M Tris-HCl buffer, pH 6.8 containing 0.1% (w/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoethanol, 10% (v/v) glycerol, and 0.01% (w/v) bromophenol blue, and then heating for 10 min at 100°C. Controls containing whole casein but without addition of enzymes, was also sampled.

Protein assay

The protein concentration was measured using Lowry's method with bovine serum albumin (BSA) as standard (Lowry et al., 1951); each measurement was done three times.

Results and Discussion

Electrophoretic and chromatographic separation of camel whey proteins

Samples of camel milk whey proteins from two different regions as well as cow milk were examined to determine whether they present differences or have similar composition as proteins from bovine milk. In order to identify the different whey proteins in camel and bovine milk, native-PAGE electrophoresis of whey camel samples from the two regions were compared to bovine whey proteins. In Figure 1 lane 1 (bovine whey) Ig, BSA, α -lactalbumin and β -lactoglobulin were observed. Several faint bands probably correspond to α -lactalbumin dimers and β -lactoglobulin octamers (Merin et al., 2001). Lane 2 and 3 are camel whey. Similar band to BSA and α -lactalbumin was observed. This result showed that α -lactalbumin

can exist in two forms, as seen previously in milk of *Camelus dromedarius* (Conti et al., 1985), with a slight difference in their amino acid composition and isoelectric point (5.1 and 5.3 respectively). Conti et al. (1985) reported that the two forms of α -lactalbumin in *Camelus dromedarius* whey differed at the first N-terminal position. The presence of small amount of a third α -lactalbumin was also reported by Ochirkhuyag et al (1998). β -lactoglobulin appears only in bovine milk, which is in agreement with published data (Farah, 1986; Ochirkhuyag et al., 1998). Lack of β -lactoglobulin is also reported for milk of other species including human milk (Jenness, 1985) and is not due to preparation artifact, since in the SDS-PAGE electrophoresis (Figure 2) no band in the vicinity of 18 kDa was detected in camel whey.

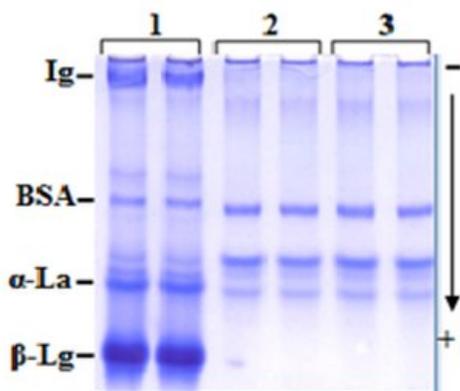


Figure 1. Native-PAGE of camel and bovine whey proteins.

(1) Bovine whey, (2), (3) camel whey from Ouargla and Ghardaia respectively.

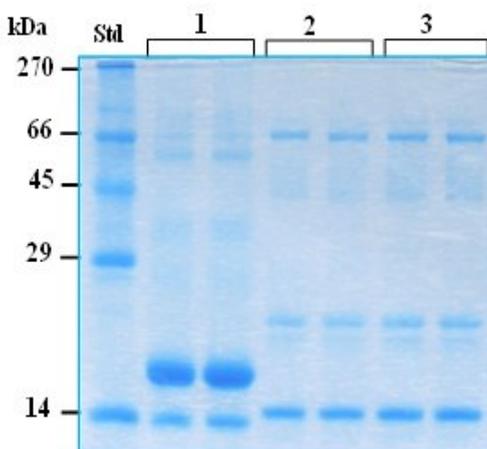


Figure 2. SDS-PAGE of camel and bovine whey proteins.

(1) Bovine whey, (2), (3) camel whey from Ouargla and Ghardaia respectively, (4) molecular weight standard.

SDS-PAGE of cow and camel milk whey proteins (Figure 2) showed four bands in the two camel milk samples. Their MWs were estimated at 66.0, 43.0, 29.0 and 14.0. Two major bands (66.0 and 14.0) were identified as serum albumin and α -lactalbumin by comparing the observed electrophoretic profiles with those reported by Ochirkhuyag et al. (1998). The two forms of α -lactalbumin have identical molecular weight according to their mobility in SDS-PAGE at pH 8.0.

A chromatogram of camel whey is presented in Figure 3. Camel whey proteins were separated into 3 fractions. As observed by native-PAGE (Figure 4), serum albumin was eluted in fraction 1, the two forms of α -lactalbumin were eluted in fraction 2 and the third peak contained no identified proteins which could correspond to heterogeneous camel milk whey proteins (Beg et al., 1987). It is assumed that other whey components such as lactoferrin (75-76 kDa), lactoperoxidase (69 kDa) and the 43 kDa fraction (Kappeler, 1998) will not be separated on the columns used in this work. It would be reasonable to assume that the whey proteins of camel and bovine that appear at similar elution times are actually identical as was presented by sequencing of the different camel whey proteins by Ochirkhuyag et al. (1998).

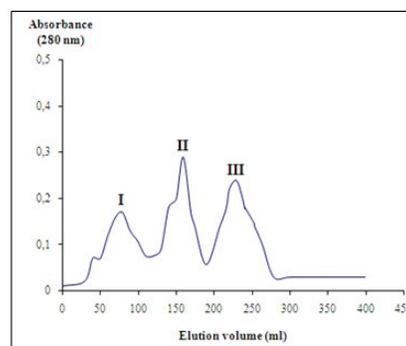


Figure 3. Elution pattern of permeation chromatography on sephacryl S200 of camel whey proteins. The column was equilibrated in 0.02M Tris-HCl buffer pH 8.6. the flow rate was of 0.3 mL min⁻¹. The fraction size was 1 mL.

Electrophoretic and chromatographic separation of camel milk caseins

Characterization of cow and camel milk caseins were performed by urea-PAGE (Figure 5) and the electrophoretic patterns show the same main bands of equal intensity and mobility for the two camel milk samples from different regions. The electrophoretic pattern showed two sharp and distinguishable main bands in camel milk.

According to their increasing electrophoretic mobility, in comparison with cow milk casein, the two bands can be regarded as a possible homologue to bovine. The last band of cow milk sample which corresponding to α_s doesn't appear in the whole camel casein fraction. No protein bands homologous to bovine κ -casein could clearly be detected in the electrophoretic pattern. Compared with cow milk caseins, camel's casein presented a lower mobility, than that of their bovine counterparts. This is probably depending on the degree of their phosphorylation (Mohamed and Larsson-Raznikiewicz, 1991). Mohamed and Larsson-Raznikiewicz (1991) and Ochirkhuyag et al. (1997) have obtained dromedary β -like casein band with a migration similar to that of cow κ -casein. Neither a band corresponding to κ -casein, nor proteins with mobility similar to bovine casein fractions could be detected. SDS dissociates proteins into their constituent polypeptide chains and has been used for the separation of the proteins according to their molecular weight. SDS-PAGE patterns of camel caseins are presented in Figure 6. The marker proteins with molecular weight between 14 200 and 270 000 were excellently separated in the selected acrylamide gel concentration (15.4%). the molecular masses of the camel casein bands estimated from calibration curve, are 32 000 and 35 500. This is considerably higher than the possible homologous bovine caseins which are estimated at 24 000 for β -casein and 22 000 to 27 000 for α_s -casein.

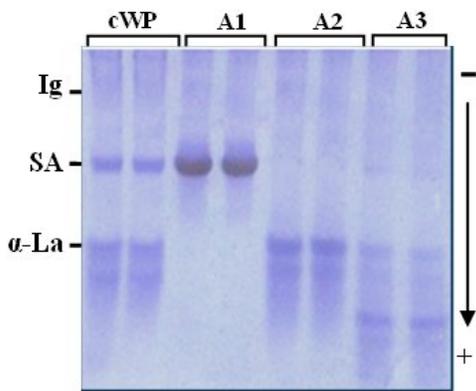


Figure 4. Native-PAGE patterns of fractions issued from permeation chromatography on Sephacryl S200 of camel milk whey proteins.
cWP : camel whey proteins; A1, A2 and A3: whey protein fractions.

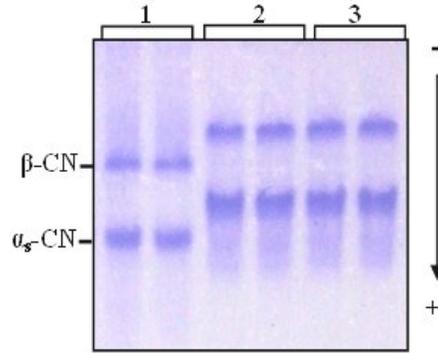


Figure 5. Urea-PAGE of camel and bovine casein. (1) Bovine casein, (2), (3) casein from Ouargla and Ghardaia camel milks.

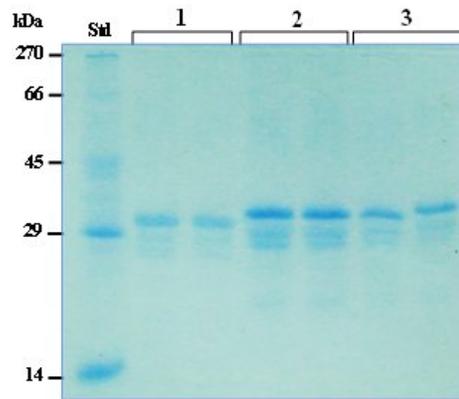


Figure 6. SDS-PAGE of camel bovine casein. (1) Bovine casein, (2), (3) casein from Ouargla and Ghardaia camel milks, std: molecular weight standard.

Acid-precipitated of whole casein from dromedary milk were separated by anion-exchange chromatography on DEAE-cellulose column (Figure 7). As already know, classical anion exchange chromatography on DEAE-cellulose column resolved whole bovine casein into different fractions containing γ , κ , β , α_{s2} α_{s1} respectively (Mercier et al., 1968). As shown in figure 7 caseins were eluted in four peaks at 0.08, 0.16, 0.23 and 0.26 mol L⁻¹ NaCl respectively. The electrophoretic pattern of each peak obtained by anion exchange chromatography (Figure 8) suggest that peak 1 contained β -, peak 2 and 3 contained α_{s1} - and peak 4 contained α_{s2} -casein which was co-eluted with α_{s1} -caseins. In comparison to the results from Kappeler et al. (1998), in which κ -casein was eluted faster than other caseins, the most prominent finding is the absence of a chromatographic peak referable to κ -casein. It may therefore be difficult to fractionate them in a single run of anion-exchange in which proteins are fractionated based on their charge.

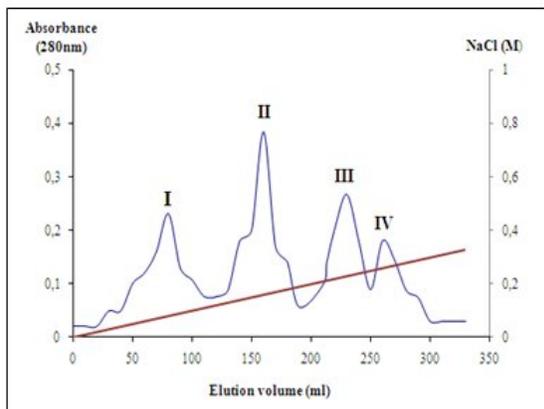


Figure 7. Elution pattern of ion exchange chromatography on DEAE cellulose of camel casein. The column was equilibrated in 10mM imidazole/HCl buffer, pH 7.0, containing 3.3 mM urea and 10mM 2-mercaptoethanol, eluted with a linear gradient of 0-1 M NaCl, at room temperature, at a flow of 0.3mL min⁻¹.

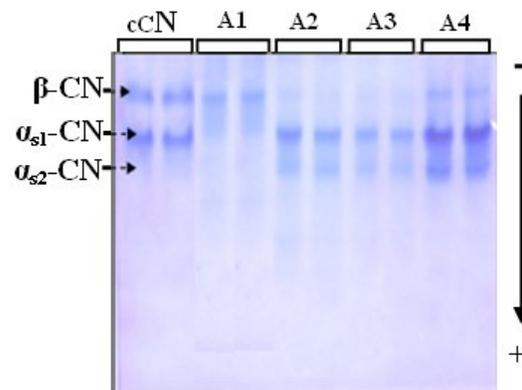


Figure 8. Urea-PAGE patterns of fractions issued from ion exchange chromatography on DEAE cellulose of camel milk caseins.
 cCN: camel whole casein; A1, A2, A3 and A4: casein fractions eluted at 0.08, 0.16, 0.23 and 0.26 mol L⁻¹ NaCl respectively.

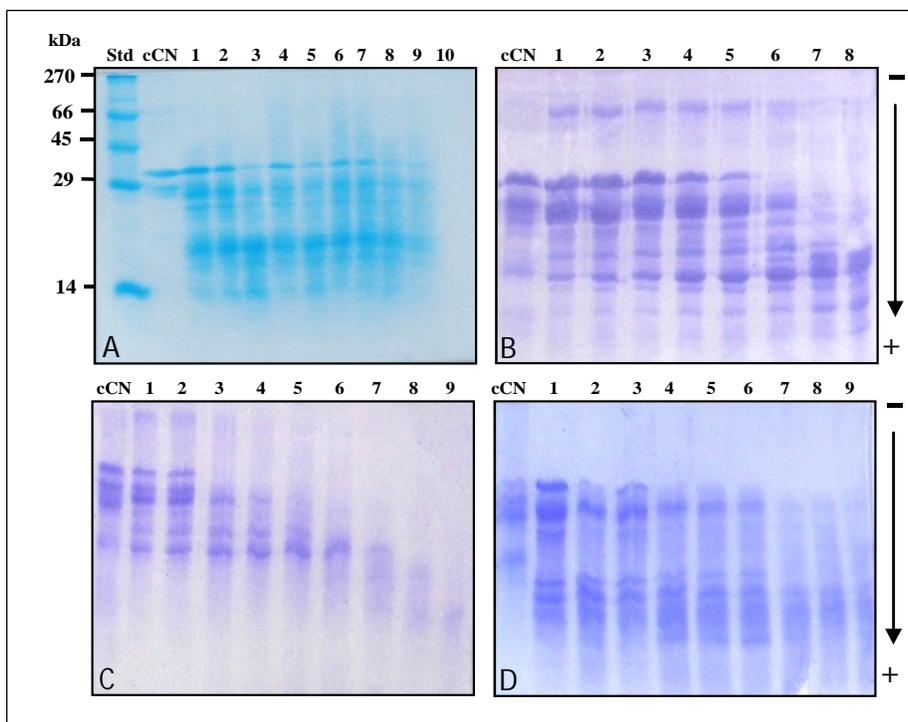


Figure 9. SDS-PAGE analysis of the kinetics of chymotrypsin (A), trypsin (B), pepsin (C) and papain (D) hydrolysis of camel whole casein. Std: molecular weight standard; cCN : camel whole casein, 1,2,3,4,5,6,7,8,9: Hydrolysis times at 5, 10, 15, 20, 30, 45,60, 120, 180 min.

Enzymatic hydrolysis of whole camel casein

In order to study the degree of hydrolysis of camel milk caseins, the enzyme-treated and untreated protein samples of whole CNs were analyzed by SDS-PAGE for pepsin, trypsin, chymotrypsin and papain assays (Figure 9). The

α_{S1} -CN was almost fully degraded by both enzymes after 10 min of incubation; it appears like sharp and diffuse band; whereas hydrolysis of β -CN was complete after 5 min of hydrolysis by pepsin, 30 min by trypsin and papain and 48h by chymotrypsin. β -CN from camel milk were more

resistant to trypsin, chymotrypsin and papain digestion, it's very quickly hydrolyzed by pepsin. After 5 min of hydrolysis of camel CNs by chymotrypsin, trypsin and papain, some peptide fragments were still detected on SDS-PAGE, which were stable up to 4h of incubation with chymotrypsin, trypsin and papain, but which pepsin, peptide fragments were disappeared completely after 60 min of incubation. Similar peptide fragments were not obtained when CNs were treated with different proteases. The major protein components of camel milk, α_{S1} - and β -CNs, contain different numbers of covalently attached phosphate groups bound to residues of serine and threonine (Dickson and Perkins, 1971; Medina et al., 1992). The bound phosphate groups influence many functional properties of these proteins, including their digestibility, bioavailability of divalent cations and immunogenicity (Tezcucano et al., 2007). As reported previously, covalently bound phosphate groups of CNs are supposed to be one of the factors reducing the digestibility of CNs (Li Chan and Nakai, 1989). Taking into account the number of phosphoseryl and phosphothreonyl residues as one of the possible factors reducing the hydrolysis of CNs, β -CN should be hydrolyzed to a greater extent than α_{S1} -CN in both animal species. The results obtained on SDS-PAGE (Figure 9) showed that this was not the case when trypsin or chymotrypsin was used. At least, some portion of β -CN of both species treated by trypsin or chymotrypsin remained uncleaved even after 15 min of digestion. It seems that this protein, which contains four phosphoseryl residues, could better resist digestion by trypsin or chymotrypsin than bovine α_{S1} -CN containing eight phosphate groups (Salami et al., 2008). Thus, another factor must be taken into account to explain the greater hydrolysis of α_{S1} -CN by trypsin, chymotrypsin or papain compared with β -CN, which could be the number of target peptide bonds available for attack by the proteases. Although the greater susceptibility of α_{S1} -CN to trypsin, chymotrypsin and papain hydrolysis compared with β -CN could arise from the number of enzymatic cleavage sites, the accessibility of these sites is another important factor.

Conclusion

Results of this study performed on Algerian dromedary's milk proteins showed homogeneity between samples under both quantitative and qualitative aspects. Results indicate that the whey of Algerian camel milk contains a major protein, α -lactalbumin, existing in two different forms, with identical molecular weight, which are eluted

together during Sephacryl S200 permeation gel chromatography and migrated in the same region on SDS-PAGE. They could be separated by isoelectric focusing and/or by anion exchange chromatography, using column with high resolving power. β -lactoglobulin is responsible for some of the observed allergies to cow's milk. Since Algerian camel milk is devoid of β -lactoglobulin, it could be interesting as a new raw material for infant diet and for alleviating some allergic reactions, especially in children. Algerian camel milk samples contain three casein fractions (α_{S1} -, α_{S2} -, β -caseins). Interestingly, analytical results suggested the absence of κ -casein in two samples. The observed differences of their molecular masses, in comparison with cow milk casein, are either due to few variations in their primary sequences or to the divergence of their primary glycosylation and/or phosphorylation.

Whole camel milk caseins were used as substrate for different proteases such as trypsin, chymotrypsin, pepsin and papain. These digestive enzymes, which have different specificities towards the protein substrates, have generated different peptides during proteolysis. The kinetic degradation patterns of camel caseins were visualized by SDS-PAGE. The extent of proteolysis of camel milk caseins by different enzymes depended on the number of target sites available for each enzyme and perhaps on how well these target peptide bonds are accessible to the proteases. The accessibility of the target sites to the digestive enzymes finally depends on fine tertiary structure of milk proteins. Nonetheless, investigations at DNA level are necessary in order to better characterize dromedary's genetic structure.

Acknowledgements

The authors acknowledge Ouargla Kassdi Merbah University, Algeria, for the donation of camel milk samples.

References

- Alim, N., F. Fondrini, I. Bonizzi, M. Feligini and G. Enne. 2005. Characterization of casein fractions from algerian dromedary (*Camelus dromedarius*) milk. Pak. J. Nutr. 4:112-116.
- Al-Haj, O. A and H. A. Al Kanhal. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk -A review. Int. Dairy J. 20(12):811-821.
- Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. J. Dairy. Res. 50:45-55.

- Beg, O. U., H.V. Bahr-lindström, Z. H. Zaidi and H. Jörnvall. 1984. A small camel protein rich in cystein / half cystine. Biosci. Rep. 4:1065-1070.
- Beg, O. U., H. V. Bahr-Lindström, Z. H. Zaidi and H. Jörnvall. 1986a. A camel milk whey protein rich in half cystine. Primary structure, assessment of variations, internal repeat patterns, and relationships with neurophysin and other active polypeptides. Eur. J. Biochem. 159:195-201.
- Beg, O. U., H. V. Bahr-Lindström, Z. H. Zaidi and H. Jörnvall. 1986b. Characterization of a camel milk protein rich in proline identifies a new β -casein fragment. Regul. Pept. 15:55-62.
- Beg, O. U., H. V. Bahr-Lindström, Z. H. Zaidi and H. Jörnvall. 1987. Characterization of a heterogeneous camel milk whey non-casein protein. Febbs L. 216:270-274.
- Conti, A., J. Godovac-Zimmermann, A. Napolitano and J. Liberatori. 1985. Identification and characterization of two α -lactalbumins from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*). Milchwissenschaft. 40:673-675.
- Dickson, I. R. and D. J. Perkins. 1971. Studies on the interactions between purified bovine caseins and alkaline-earth-metal ions. Biochem. J. 124:235-240.
- Ereifej, K. I., M. H. Alu'datt, H. A. AlKhalidy, I. Alli and T. Rababah. 2011. Comparison and characterization of fat and protein composition for camel milk from eight Jordanian locations. Food Chem. 27:282-289.
- Farah, Z. 1986. Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. Milchwissenschaft. 41:763-765.
- Farah, Z and M. Farah-Riesen. 1985. Separation and characterization of major components of camel milk casein. Milchwissenschaft. 40:669-671.
- Farah, Z. 1993. Composition and characteristics of camel milk. J. Dairy. Res. 60:603-626.
- Hillier, R. M. 1976. The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis. J. Dairy. Res. 43:259-265.
- Jeness, R. 1985. Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum. In: B. L. Larson (Ed.), Lactation. The Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 164-197, Ch. 5.
- Kappeler, S. R. 1998. Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Ph. D. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Konuspayeva, G., B. Faye and G. Loiseau. 2009. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. J. Food. Comp. Anal. 22:95-101.
- Laemmli, U. K. and H. Favre. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. J. Mol. Biol. 780:575-599.
- Larsson-Raznikiewicz, M. and M. A. Mohamed. 1986. Analysis of the casein in camel (*Camelus dromedarius*) milk. J. Agr. Res. 16:13-18.
- Li-Chan E. and S. Nakai. 1989. Enzymic dephosphorylation of bovine casein to improve acid clotting properties and digestibility for infant formula. J. Dairy. Res. 56:381-90.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biochem. 193:265-275.
- Medina, A. L., B. Colas, M. Le Meste, I. Renaudet and D. Lorient. 1992. Physicochemical and dynamic properties of caseins modified by chemical phosphorylation. J. Food. Sci. 57:617-621.
- Mehaia M. A. 1987. Studies on camel milk casein micelles. Treatment with soluble and immobilized pepsin. Arab. Gulf. J. Sci. Res. 3:391-400.
- Mercier J. C., J. L. Maubois, S. Poznanski and B. Ribadeau-Dumas. 1968. Fractionnement préparatif des caséines de vache et de brebis par chromatographie sur DEAE cellulose, en milieu urée et 2-mercaptoéthanol. Bull. Soc. Chim. Biol. 50:521-530.
- Merin, U., S. Bernstein, A. Bloch-Damti, R. Yagil, C. van Creveld, P. Lindner and N. Gollop. 2001. A comparative study of milk serum proteins in camel (*Camelus dromedarius*) and bovine colostrums. Livest. Prod. Sci. 67:297-301.
- Mohamed, M. A. and M. Larsson-raznikiewicz. 1989. Separation of a camel milk casein fraction and its relation to the coagulation properties of fresh milk. Milchwissenschaft. 44:278-280.

- Mohamed, M. A., and M. Larsson-Raznikiewicz. 1991. Heat treatment of camel milk. Effects upon casein fraction. *Milchwissenschaft*. 46:562-565.
- Ochirkhuyag, B., J. M. Chobert, M. Dalgarrondo and T. Haertlé. 2000. Characterization of mare caseins. Identification of α_{S1} - and α_{S2} -caseins. *Lait*. 80:223-235.
- Ochirkhuyag, B., J. M. Chobert, M. Dalgarrondo, Y. Choiset and T. Haertlé. 1997. Characterization of caseins from Mongolian yak, khainak and bactrian camel. *Lait*. 77:601-613.
- Ochirkhuyag, B., J. M. Chobert, M. Dalgarrondo, Y. Choiset and T. Haertle. 1998. Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and bacterian camel. *J. Food Chem.* 22:105-124.
- Salami M., R. Yousefi, M. R. Ehsani, M. Dalgarrondo, J. M. Chobert, T. Haertlé, S.H. Razavi, A. A Saboury, A. Niasari-Naslaji, A. A. Moosavi-Movahedi. 2008. Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *Int. Dairy J.* 18:1097–1102.
- Tezcucano Molina, A. C., I. Allia, Y. Konishi and S. Kermasha. 2007. Effect of dephosphorylation on bovine casein. *Food Chem.* 101:1263–1271.
- Zhang, H., J. Yao, D. Zhao, H. Liu, J. Li and M. Guo. 2005. Changements dans la composition chimique du lait de chameau de Bactriane Alex pendant la lactation. *Am. Dairy Sci. Assoc.* 88:3402-3410.



Identification by FT-ICR-MS of *Camelus dromedarius* α -lactalbumin variants as the result of nonenzymatic deamidation of Asn-16 and Asn-45



Saliha Si Ahmed Zennia^a, Abderrahmane Mati^a, Franck Saulnier^b, Yann Verdier^c, Giovanni Chiappetta^c, Guillermo Mulliert^{d,e}, Laurent Miclo^{f,g}, Joëlle Vinh^c, Jean-Michel Girardet^{f,g,*,1}

^a Université Mouloud Mammeri, Laboratoire de Recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB), Tizi Ouzou, Algeria

^b Université de Lorraine, Service Commun de Séquence des Protéines (SCSP), Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

^c ESPCI ParisTech, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique (SMBP), USR3149 CNRS, Paris F-75231, France

^d Université de Lorraine, Laboratoire de Cristallographie, Résonance Magnétique et Modélisations (CRM2), UMR 7036, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

^e CNRS, CRM2, UMR 7036, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

^f Université de Lorraine, Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux (UR AFPA), Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

^g INRA, UR AFPA, USC 340, Vandœuvre-lès-Nancy F-54506, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2014

Received in revised form 10 April 2015

Accepted 15 April 2015

Available online 22 April 2015

Keywords:

Camel α -lactalbumin

Camel milk

FT-ICR-MS

Nonenzymatic deamidation

ABSTRACT

Nonenzymatic deamidation of asparaginyl residues can occur spontaneously under physiological conditions principally when a glycol residue is at the carboxyl side of Asn and leads to formation of aspartyl and isoaspartyl residues. This modification can change the biological activity of proteins or peptides and trigger an auto-immune response. The α -lactalbumins of members of the *Camelidae* family are the only of described α -lactalbumins that carry two AsnGly sequences. In the present study, high-resolution mass spectrometry, which enables accurate mass measurement has shown that Asn¹⁶ and Asn⁴⁵ underwent a nonenzymatic deamidation, the sequence Asn⁴⁵-Gly⁴⁶ being deamidated spontaneously at near-neutral and basic pH and Asn¹⁶-Gly¹⁷ rather at basic pH. The 16–17 sequence was probably stabilized at near-neutral pH by hydrogen bonds according to the molecular modelisation performed with the camel protein.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

α -Lactalbumin (α -La) is the major whey soluble protein in dromedary (*Camelus dromedarius*) milk with an average concentration of ca. 7.2 g/L, fivefold higher than in cow's milk (Kappeler, 1998).

Camel α -La (Swiss-Prot accession number P00710) consists of 123 amino acid residues forming a compact globular structure stabilized by four disulfide bonds (putative bonds located by similarity with α -La structures of other species Cys⁶/Cys¹²⁰, Cys²⁸/Cys¹¹¹, Cys⁶¹/Cys⁷⁷, and Cys⁷³/Cys⁹¹). Its theoretical isoelectric point (pI) is

Abbreviations: α -La, α -lactalbumin; FDR, false discovery rate; FPLC, fast protein liquid chromatography; FT-ICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; HR, high resolution; IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient gel; LTQ, linear trap quadrupole; MS, mass spectrometry; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; pI, isoelectric point; SDS, sodium dodecyl sulfate; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; 2-DE, two-dimensional electrophoresis.

* Corresponding author. Tel. +33 383 684 227; fax: +33 383 684 274.

E-mail address: jean-michel.girardet@univ-lorraine.fr (J.-M. Girardet).

¹ Present address: UMR 1136 INRA/Université de Lorraine, Interactions Arbres-Microorganismes, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

5.01 and its native form including the four disulfide bridges corresponds to the empirical formulae C₆₃₁H₉₆₆N₁₇₀O₁₉₆S₁₁ with an average molecular mass of 14422.18 Da (monoisotopic mass 14412.78 Da). The camel protein is homologous to bovine α -La (Swiss-Prot accession number P00711; sequence identity of 69%) that exhibits a high affinity to metal ions, calcium in particular. Calcium depletion at low pH causes structural changes to form the so-called molten globule state (for review, see Ptitsyn, 1995). The biological function of α -La is to participate in lactose biosynthesis as the non-catalytic regulatory subunit of the lactose synthase complex. Regarding the nutritional aspect, α -La is a particularly good source of the essential amino acid Trp, the latter being precursor of serotonin. On the other side, α -La is considered as the less allergenic milk protein in cow (Natale et al., 2004). Indeed, serum of patients with persistent cow milk allergy contains immunoglobulins E binding to epitopes in α _{s1}-, α _{s2}- or κ -casein (Järvinen et al., 2002).

The nonenzymatic deamidation of Asn residues is a well-known mechanism (Catak, Monard, Aviyente, & Ruiz-Lopez, 2006; Pace, Wong, Zhang, Kao, & Wang, 2013), which proceeds through a

succinimide ring intermediate. Spontaneous hydrolysis occurs on either side of the nitrogen of the imide ring, producing a mixture of L-isoAsp, L-Asp, D-isoAsp, and D-Asp residues among which the residues of the L-configuration are the principal ones (Robinson & Robinson, 2004), with +0.984 Da mass shift by deamidated Asn residue. Many reported studies have characterized the impact of several factors on deamidation rate, such as primary sequence, two- and three-dimensional structures and reaction conditions, including pH, temperature, ionic strength, and the kind of buffer ions (Pace et al., 2013; Robinson & Robinson, 2004). In studies using peptide models, the amino acid residue on the carboxyl side of the Asn has been shown to possess a great influence on the reaction rate, particularly when the adjacent carboxyl residue of Asn is Gly (Robinson & Robinson, 2001).

Deamidation may induce the alteration of protein properties through the introduction of negative charges, and the insertion of a methylene group in the peptide backbone. This may lead to undesirable effects on the protein, including a decrease in biological activity (Nakano et al., 2010), a reduction of product stability (Cleland et al., 2001), and an increase in concern for immunogenicity (Chen, Ede, Jackson, McCluskey, & Purcell, 1996). Celiac disease is caused by intolerance for the food proteins of gluten, gliadin and glutenin, which are usually consumed in wheat, rye, and barley products. It is well-established that deamidation of Glu residues by tissue transglutaminase present in human jejuna mucosa is a key component in celiac disease (e.g., Arentz-Hansen et al., 2000). In this case, the Glu residues are subject to enzymatic deamidation. On the other hand, nonenzymatic deamidation of Asn can also affect immune recognition of proteins and peptides. For example, T-cells specifically recognize peptides containing Asn residues that have either been transformed in succinimide (Chen et al., 1996) or become deamidated to form an Asp or isoAsp residue (Cirrito, Pu, Deck, & Unanue, 2001). A significant impact on the safety and the efficacy of a pharmaceutical protein product can result from the Asn or Asp degradation (Cacia, Keck, Presta, & Frenz, 1996). It is generally assumed that the nonenzymatic deamidation is a major pathway for the chemical degradation of monoclonal antibodies mainly used as treatments in oncology and immunology (Pace et al., 2013).

Generally, the identified proteins able to deamidate are implied in biological processes *in vivo* (Mikkat, Kischstein, Kreutzer, & Glocker, 2013). But, few studies have shown that milk proteins could be also subject to nonenzymatic deamidation: human lactoferrin (Belizy et al., 2001), equine α -La (Girardet et al., 2004), equine β -casein (Girardet, Miclo, Florent, Mollé, & Gaillard, 2006; Matéos et al., 2009), and canine milk lysozyme (Nonaka et al., 2008). The equine α -La has a site of spontaneous deamidation Asn⁴⁵-Gly⁴⁶, whereas the bovine, ovine, caprine and human counterparts do not possess such a site. Under physiological conditions, a proportion of 50% of the equine protein is deamidated only after 12 h of incubation in the absence of any enzymatic activity (Girardet et al., 2004).

Formerly, two variants of α -La, named A and B, were characterized in camel milk (Conti, Godovac-Zimmerman, Napolitano, & Liberatori, 1985). They show a slight difference of 0.2 pH unit in their respective apparent isoelectric points (pIs of 5.1 and 5.3, respectively) but have the same apparent molecular mass. The N-terminal sequences of the 23 first residues of the two forms are identical and the hypothesis of the presence of a putative glycan moiety has been formulated to explain the existence of the two forms A and B (Ochirkhuyag, Chobert, Dalgalarondo, Choiset, & Haertle, 1998).

Evidence of asparagine deamidation is relatively straightforward by mass spectrometry (MS; Yang & Zubarev, 2010). The localization of the deamidated residues and the presence of iso-Asp/Asp residues can be obtained by MS analysis, either using top down

approaches (Zabrouskov et al., 2006) or bottom-up approaches (Nepomuceno, Gibson, Randall, & Muddiman, 2014). Direct high resolution mass spectrometry (HRMS) analysis of the intact protein in its native state suffers from strong overlapping of the isotopic distributions of the profiles coming from the protein and its deamidated counterparts (Robinson, Zabrouskov, Zhang, Lampi, & Robinson, 2006). Bottom up strategy suffers from the occurrence of artifactual partial Asn deamidation during proteolytic treatment (Li, Cournoyer, Lin, & O'Connor, 2008). However the combination of the two approaches helps to address these issues.

The aim of this work was (i) to unveil that nonenzymatic deamidation of camel α -La could occur under certain conditions of pH and temperature and was responsible of the generation of two novel isoelectric forms of α -La, (ii) to localize on the sequence the sites of deamidation, and (iii) to investigate the differential kinetics of deamidation of the potential deamidation sites.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of camel whey soluble proteins

Fresh milk samples (pH 6.7) were collected from a herd of Sahraoui dromedary females (*C. dromedarius*) and immediately stored at 20 °C until used. Whey proteins were prepared according to Si Ahmed Zennia, Almi, Senoussi, Boudjenah, and Mati (2013). Briefly the milk was skimmed by centrifugation (3500g at 32 °C for 30 min) and the whole casein was precipitated at pH 4.3 with 1 M HCl (the minimal solubility of the camel caseins was reached for pH 4.3 instead of pH 4.6 for their bovine counterparts). The pH of the resulting milk whey was increased to 6.7 with 1 M NaOH, dialyzed against ultra-pure water (resistivity of 18.2 M cm at 25 °C) in the presence of thymol at 4 °C, at pH 6.7 for 72 h, and the whey soluble proteins were lyophilized.

2.2. *In vitro* nonenzymatic deamidation of α -lactalbumin

The whey proteins were solubilized at 15 mg/mL in 150 mM sodium phosphate buffer containing 0.02% sodium azide as preservative, pH 7.4 or 8.4. The protein solution was then filtered at 0.45 μ m and incubated at 37 °C. Volumes of 50 μ L were taken from the protein solution as a function of time (up to 80 h) and were diluted four times with ultra-pure water and then, stored at 20 °C until used.

2.3. Anion-exchange fast protein liquid chromatography (FPLC)

The diluted samples maintained in crushed ice were separated by anion-exchange chromatography with an ÄKTA-FPLC system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) using an analytical Mono Q HR 5/5 column (50-mm length \times 5-mm internal diameter; 10-nm particle size). Volumes of 100 μ L of diluted samples (3.75 mg/ml) were loaded after filtration at 0.45 μ m onto the column equilibrated in 20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane/HCl (Tris/HCl) buffer, pH 7.4, containing 0.02% sodium azide as preservative. A linear gradient from 0 to 0.4 M NaCl was applied from 5 min after injection to 35 min, at a flow rate of 1 ml/min and the column was washed with 1.0 M NaCl for 10 min. Detection was monitored at 280 nm. The relative proportions of the different compounds were determined by peak area measurements (arbitrary units). The analytical FPLC separations were performed in triplicates.

The observed first-order rate constant (k_{obs}) for the disappearance of Asn was determined according to the method of Song, Schowen, Borchardt, and Topp (2001) by non linear regression equation:

$$A/(A + A_0) = A_0 e^{-k_{obs} t} \quad (1)$$

where A is the peak area of the native camel α -La at time t , and A_0 is the initial α -La peak area.

For further two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analyses, fractions corresponding to the three different isoforms of α -La (noted A_1 , A_2 and A_3) were collected, dialyzed against ultra-pure water at 4 °C, and lyophilized. Finally, the purification of the three isoforms was achieved by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Briefly, a LichroCart C₁₈ column (250 × 4 mm, 5- μ m particle size, 10-nm porosity; Merck, Darmstadt, Germany) was connected to an Alliance HPLC unit (Waters, Milford, CT, USA) and a linear gradient 5–50% acetonitrile in water, in the presence of 0.1% trifluoroacetic acid for 90 min, was applied.

2.4. Alkaline and two-dimensional electrophoresis

Vertical polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.9 (alkaline PAGE) was carried out with Mini-ProteanTetracell (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) at 200 V and 4 °C for 45 min according to the method of Pâquet, Nejjar, and Linden (1988). Volumes of 10 μ l of the diluted samples were mixed with 20 μ l of loading buffer (0.38 M Tris/HCl, pH 8.9, containing 50% glycerol and 0.01% bromophenol blue) and 10 μ l of this mixture (corresponding to ca. 12.5 μ g total protein) were loaded in the gel. After electrophoresis, proteins were stained by Coomassie blue R-250.

Two-dimensional electrophoresis (2-DE) was according to a previous work (Matêos et al., 2009). The first dimension consisted to an isoelectric focusing (IEF) performed using a pre-cast immobilized pH gradient gel strip (IPG-strip) at 4% polyacrylamide in the pH range of 4–7 (IPG ReadyStrip pH 4–7, length 11 cm, Bio-Rad). A quantity of 100 μ g of each purified fraction (A_1 , A_2 and A_3) was solubilized with 200 μ l of a solution containing 8 M urea, 4% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, 2 mM tributylphosphin, 40 mM Tris, 0.2% ampholytes 3–10 (Bio-Lytes 3–10; Bio-Rad), and 0.001% bromophenol blue. The IPG-strips were placed in a Protean IEF Cell (Bio-Rad) and rehydrated with each protein solution for 15 h at 10 °C under active conditions (constant voltage of 50 V). The low value of temperature (10 °C) inhibited the reaction of deamidation during the rehydration (Matêos et al., 2009). The second dimension consisted to a sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE composed of a 5% polyacrylamide stacking gel and a 15% polyacrylamide resolving gel. The proteins were revealed after migration at 4 °C by Coomassie Blue R-250. The apparent pIs of the protein spots were determined after calibration with the help of 2D SDS-PAGE standard protein markers (Bio-Rad). The regression line used with a 4–7 pH gradient was determined in a previous work (Girardet et al., 2004) and is:

$$pI = 3.34R_f + 3.90, \quad r = 0.98 \quad (2)$$

where R_f is the relative focalization of a given protein spot.

2.5. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR-MS)

2.5.1. Exact mass determination

Samples (α -La A_1 , A_2 , and A_3) were dissolved in a mixture of 1:1 (v/v) methanol/1% aqueous formic acid and injected on a FT-ICR mass spectrometer (LTQ-FT Ultra, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA) using a nanoESI TriVersaNanoMate source (Advion Biosciences, Ithaca, NY, USA). The theoretical isotopic distribution of the camel α -La was calculated using the open source 'Molecular Weight Calculator 6.49' software. The experimental spectra were processed using Xcalibur 2.0.7 (ThermoFisher Scientific) and deconvoluted with MassLynx 4.1 software (Waters, Milford, Massachusetts, USA).

2.5.2. Localization of the deamidation sites

Samples (α -La A_1 , A_2 , and A_3) were dissolved at 1 mg/ml in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.5. After reduction/alkylation (dithiothreitol at a final concentration of 10 mM, 2 h, 37 °C/iodoacetamide at final concentration of 50 mM, 30 min in the dark), 2.5 ng chymotrypsin (EC 3.4.21.1; Sequencing grade; from bovine pancreas; Roche Diagnostics, Meylan, France) in 150 mM ammonium carbonate at pH 7.5, was added and proteins were incubated overnight at 37 °C while shaking. Then, the reaction was stopped with 10 μ l of 10% aqueous formic acid and the peptides purified by using C₁₈ Tips (ZipTip; Millipore Co., Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

A volume of 2 μ l of peptide solution was injected on a capillary reversed-phase column (C₁₈ Acclaim PepMap100, 75- μ m i.d., 150-mm length, 10-nm particle size; Dionex-Thermo Scientific, Chelmsford, MA, USA), at a constant flow rate of 220 nl/min, with a gradient 2–40% buffer B in buffer A in 45 min (buffer A: water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 98:2:0.1 (v/v/v), buffer B: water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 10:90:0.1). Mass spectrometry was performed with the setup described above, using the Top 7 acquisition method (1 full scan MS at resolution 60,000; range of 500–2000 m/z), followed by 7 MS/MS (LTQ) on the 7 most intense peaks, with 90 s dynamic exclusion. All the data were submitted to Mascot search engine 2.4 (Matrix Science, London, UK) against SwissProt_2013_06 database (540261 sequences; 13034 sequences after "other mammalian" taxonomy restriction). Proteome Discoverer 1.4 (ThermoScientific) was used to process the data and filter the results. The following parameters were used: semi chymotrypsin specificity, up to 2 miss cleavages; MS tolerance 10 ppm; MS/MS tolerance 0.5 Da, 3 dynamic modifications (Met), carbamidomethyl (Cys) and deamidation (Asn-Gln). Results were further filtered out using False Discovery Rate (FDR) 1% threshold, rank 1 peptide and 2 ppm MS error tolerance.

2.6. Molecular modelisation

A camel α -La model was made with the automated protein structure homology-modeling server <http://swissmodel.expasy.org/> (Kiefer, Arnold, Künzli, Bordoli, & Schwede, 2009). The template used by this server was the PDB code 1hml (human α -La). The model was then minimized and submitted to molecular dynamics with the Amber 12 Molecular Dynamics Package (Case et al., 2012). The minimization was carried out with 500 steps steepest descent method followed by 500 steps of conjugate gradient, keeping heavy atoms restrained. After, an octahedral box of water of 8.0 Å was added around the protein and Na⁺ as counterions to make the total charge of the system 0.0. The solvated protein was submitted to the same minimization protocol. Then molecular dynamics was realized as follows: (1) 100 ps of heating and 100 ps of density equilibration with weak restraints on the solvated protein followed by 1 ns of constant pressure equilibration at 300 K with no restraints. All simulations were run with shake on hydrogen atoms, a 2 fs time step and Langevin dynamics for temperature control; (2) a production phase with a total run of 10 ns using the same conditions as the final phase of equilibration recording the coordinates every 10 ps. This production phase was used to analyze the results.

3. Results and discussion

3.1. Unveiling of nonenzymatic deamidation of camel α -lactalbumin

The α -La sequence alignments performed with the BLAST program and bibliographic researches revealed that the α -La from

members of *Camilidae* family, dromedary (*C. dromedarius*), llama (*Lama glama glama*; Saadaoui et al., 2014), guanaco (*Lama glama guanicoe*, SwissProt accession number O97723) are the only known α -Lacs which present two Asn–Gly sites, at positions 16–17 and 45–46 (Fig. 1). Nonenzymatic deamidation occurs more frequently when Gly follows the Asn residue (Robinson & Robinson, 2004). Moreover, the Asn¹⁶ residue is located in a motif Asn–Gly–Xxx–Gly that is reported to be particularly prone to deamidation *in vivo*, i.e. in the case of proteins of mouse spinal cord (Mikkat et al., 2013). This motif is found as Asn¹⁶–Gly–His–Gly¹⁹ in camel α -La.

To investigate the stability of camel α -La, the whey proteins were first incubated at 37 °C as a function of time (up to 80 h) in 150 mM phosphate buffer adjusted either at pH 7.4 or 8.4. Then, aliquots were collected during the incubation period and analyzed either by anion-exchange chromatography or alkaline electrophoresis (Fig. 2a). The chromatographic conditions, especially the ionic strength linear gradient, have been previously optimized to obtain the best resolution of the separation of the camel α -La. The native form of α -La was noted A₁ and was identified by alkaline-PAGE according to Hinz, O'Connor, Huppertz, Ross, and Kelly (2012). The other whey proteins were mainly eluted in the column washing volume with a NaCl concentration of 1.0 M. Under physiological conditions (37 °C, pH 7.4), a supplementary electrophoretic band (noted A₂) displaying greater migration rate than A₁, and an additional chromatographic peak with greater retention time appeared in the course of the incubation at the expense of A₁. When the pH value was increased to 8.4, another novel band (A₃) with the fastest migration rate, and another novel peak of A₃ much more retained on the column, appeared on the electrophoretic and chromatographic patterns, respectively. Thus, two isoforms (A₂ and A₃) of α -La were generated under alkaline conditions, whereas the relative content of A₁ (and of A₂ in a second time after its generation) decreased. This result suggested that negative charges

were generated spontaneously during the incubation leading to the formation of two α -La isoforms A₂ and A₃ and supported the hypothesis that the instability of the camel α -La A₁ was caused by a deamidation process.

The purified α -La isoforms A₁, A₂, and A₃ were subjected individually to 2-DE analysis in a pH range of 4–7. Each isoform consisted in a single visible spot at apparent molecular mass of ca. 14 kDa and no spot at ca. 16 kDa was observed (even when the whole whey proteins were analyzed by 2-DE; result not shown) suggesting that no *N*-glycosylated form of the camel α -La was present in a detectable amount (the molecular mass of an *N*-glycan chain is ca. 2000 Da). Although no usual potential *N*-glycosylation site (Asn–Xxx–Ser/Thr) is present along the camel sequence, the occurrence of a glycan moiety was not, however, discarded. Indeed, the camel sequence contains the triplet Asn⁷¹–Ile–Cys⁷³ that is partly *N*-glycosylated (1%) in the case of the human α -La (Giuffrida et al., 1997) and of the equine α -La (the unglycosylated and *N*-glycosylated forms co-elute by anion-exchange FPLC; Girardet et al., 2004). But, in a former study, Ochirkhuyag et al. (1998) have not found any camel α -La glycoform after glycoprotein specific staining.

The three individual 2-DE gels were then superposed for an optimal visualization of the shifts of the spots observed according to the degree of deamidation (Fig. 2b). The apparent pIs of A₁, A₂, and A₃ determined according to the method of Girardet et al. (2004) were 5.63, 5.36, and 5.05, respectively. These values were correlated with the order of the retention times and the migration rates of the three isoforms observed by anion-exchange chromatography and alkaline electrophoresis, respectively. The pI differences of 0.27 between A₁ and A₂ and of 0.31 between A₂ and A₃ were similar to those reported for the equine native and deamidated α -La isoforms (Δ pI = 0.31; Girardet et al., 2004) and for the equine native and deamidated β -casein isoforms (Δ pI = 0.26; Girardet et al., 2006) and were in accordance with

	1				50
Camel's α -La A ₁	KQFTKCKLSD	ELKDM NG HGG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSN NG NREY
Guanaco's α -La	KQFTKCKLSD	ELKGM NG HGG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSN NG NREY
Llama's α -La	KQFTKCKLSD	ELKGM NG HGG	ITLAEWICII	FHMSGYDTET	VVSN NG NREY
Horse's α -La A	KQFTKCELSQ	VLKSM DG YKG	VTLPEWICTI	FHSSGYDTQT	IVK NG KT EY
Donkey's α -La AB	KQFTKCELSQ	VLKSM DG YKG	VTLPEWICTI	FHSSGYDTQT	IVK NG KT EY
Human α -La A	KQFTKCELSQ	LLKDIDGYGG	IALPELICTM	FHTSGYDTQA	IVEN N ST EY
Cow's α -La B	EQLTKCEVFR	ELKDLKGYGG	VSLPEWVCTT	FHTSGYDTQA	IVQ N ND S T EY
Mouse's α -La A	TELTCKVSH	AIKDIDGYQG	ISLLEWACVL	FHTSGYDTQA	VVND NG S T EY
	51				100
Camel's α -La A ₁	GLFQINNKIW	CRDNENLQSR	NICDISCDKF	LDDDLTDDKM	CAKKILDK EB
Guanaco's α -La	GLFQINNKIW	CIDNENLQSR	NICDISCDKF	LDDDLTDDIM	-----
Llama's α -La	GLFQINNKIW	CLDNENLQSR	NICDISCDKF	LDDDLTDDIM	CAKKILDK EB
Horse's α -La A	GLFQINNKMW	CRDNQILPSR	NICGISCDKF	LDDDLTDDVM	CAKKILD SE G
Donkey's α -La AB	GLFQINNKMW	CRDNQILPSR	NICGISCNKF	LDDDLTDDVM	CAKKILD SE G
Human α -La A	GLFQISNKLW	CKSSQVPQSR	NICDISCDKF	LDDDLTDDIM	CAKKILD IK G
Cow's α -La B	GLFQINNKIW	CKDDQNPSS	NICNISCDKF	LDDDLTDDIM	CVK K ILD KV G
Mouse's α -La A	GLFQISDRFW	CKSSEFPESE	NICGISCDKL	LDELDDDDIA	CAKKIL AI K G
	101		123		
Camel's α -La A ₁	IDYWLAKHPL	CSEKLEQWQC	EKW	<i>P00710</i>	
Guanaco's α -La	-----	-----	---	<i>O97723</i> (partial sequence:99%)	
Llama's α -La	IDYWLAKHPL	CSEKLEQWQC	EKW	(Saadaoui et al., 2014) (98%)	
Horse's α -La A	IDYWLAKHPL	CSEKLEQWLC	EEL	<i>P08334</i>	(78%)
Donkey's α -La AB	IDYWLAKHPL	CSEKLEQWLC	EEL	<i>P28546</i>	(78%)
Human α -La A	IDYWLAKHPL	CSEKLEQWLC	EKL	<i>P00709</i>	(71%)
Cow's α -La B	INYWLAKHAL	CSEKLDQWLC	EKL	<i>P00711</i>	(69%)
Mouse's α -La A	IDYWKAYKPM	CSEKLEQWRC	EKP	<i>P29752</i>	(61%)

Fig. 1. Sequence alignment of α -lactalbumin (α -La) genetic variants of different species (SwissProt accession numbers in italic characters). The Asn–Gly sequences prone to deamidate spontaneously are underlined and in bold characters. The sequence identity (in %) between a given protein and the camel α -La was calculated with the BLAST program.

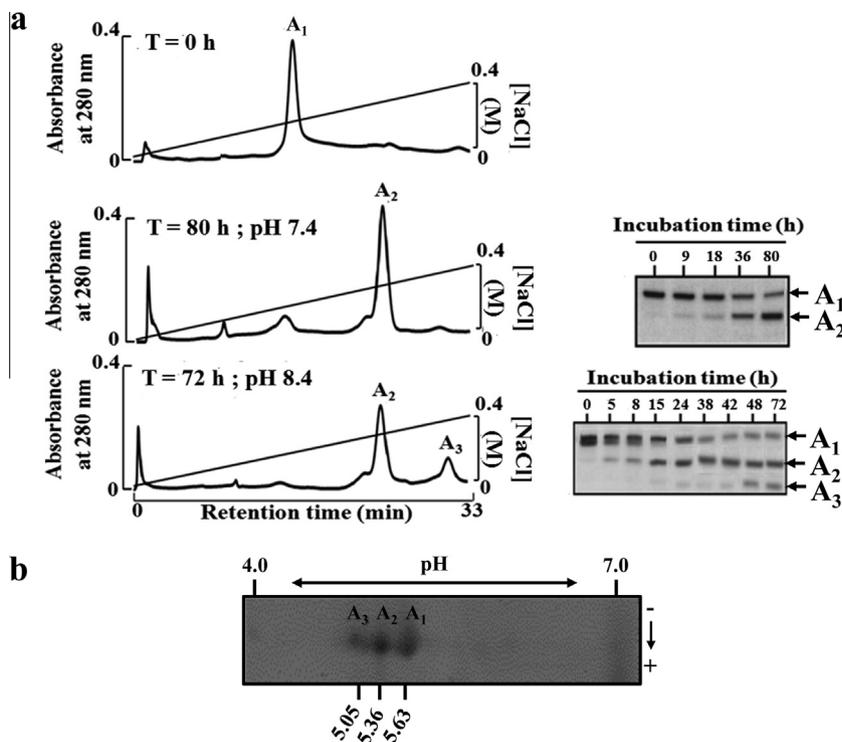


Fig. 2. (a) Formation of the A_2 and A_3 isoforms from the native camel α -lactalbumin A_1 highlighted by anion-exchange ÄKTA-FPLC (left) and alkaline-PAGE (right) as a function of time of incubation at 37 °C, either at pH 7.4 (middle) or at pH 8.4 (bottom) in 150 mM phosphate buffer. (b) Superposition overview of the 2-DE profiles of the purified isoforms A_1 , A_2 , and A_3 . The spots were stained with Coomassie blue and the pIs are indicated on the Figure.

the appearance of one negative charge carried by a carboxylate group (theoretical $\Delta pI = 0.3$ according to Lutter et al., 2001). But it is worthy to note that the apparent pIs of the two camel α -La variants A and B determined by Conti et al. (1985) display a difference of 0.2 (pIs of 5.1 and 5.3, respectively) and could correspond in fact to the deamidated form A_2 and to the native form A_1 of α -La, respectively. The isoform A_3 that was not prone to be deamidated at near-neutral pH, could not be generated and therefore not be observed in the former studies (Conti et al., 1985; Ochirkhuyag et al., 1998).

3.2. High-resolution mass spectrometry of the camel α -lactalbumin isoforms

Mass spectrometry analysis was then performed with A_1 , A_2 , and A_3 after their purification by ÄKTA-FPLC to determine whether the two new isoforms were the result of a deamidation process. Deamidation of one Asn residue raises the molecular mass of the protein by only 0.984 Da ($-\text{NH}_2$ vs. $-\text{OH}$). The FTICR-MS technology offers a very high resolution and can be used to follow deamidation on whole proteins (Robinson, Robinson, Schulze, Lai, & Gray, 2009; Robinson et al., 2006). Fig. 3 shows the three spectra of isoforms A_1 , A_2 and A_3 , respectively, for the $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ charge state. Each species would give an isotopic distribution with a theoretical regular quasi Gaussian shape, whereas in our samples the profiles are likely to result of several superimposed distinct distributions. The native α -La as described in SwissProt database under accession number P00710 contains four disulfide bridges and has the following raw chemical formula $\text{C}_{631}\text{H}_{966}\text{N}_{170}\text{O}_{196}\text{S}_{11}$. The associated mono- and di-deamidated forms have the following formulae $\text{C}_{631}\text{H}_{965}\text{N}_{169}\text{O}_{197}\text{S}_{11}$ and $\text{C}_{631}\text{H}_{964}\text{N}_{168}\text{O}_{198}\text{S}_{11}$, respectively. The computed isotopic distribution can be calculated from these formulae. Best fit was consistent with the native non deamidated major form α -La (A_1) and di-deamidated α -La (A_3). An

intermediary deamidation state was found (A_2). The isoform A_1 displayed an experimental molecular mass of 14421.8659 Da (the Gaussian curve of $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ centered on $m/z = 1803.73324$; Fig. 3a), whereas the deamidated isoforms A_2 and A_3 had masses of 14422.8569 Da ($m/z = 1803.85712$; Fig. 3b) and 14423.8479 Da ($m/z = 1803.98099$; Fig. 3c), respectively. The mass difference directly calculated from the $[\text{M}+8\text{H}]^{8+}$ species in the raw data was 0.991 Da between A_2 and A_1 and between A_3 and A_2 , a value very slightly higher than 0.984 Da. Our results were consistent with the fact that A_1 contained native non deamidated α -La, A_2 contained α -La with one deamidated residue and A_3 contained α -La with two deamidated residues.

To determine which (Asn) residues underwent a nonenzymatic deamidation process, the three purified isoforms were hydrolysed by chymotrypsin and the proteolytic peptides were identified by tandem mass spectrometry. The α -La protein was unambiguously identified in all samples (sequence coverage of 82.1%, 78.9%, and 70.7% in the case of A_1 , A_2 , and A_3 , respectively). Performing the database search on Swissprot restricted to mammals gave only three major protein identifications after filtering (1% FDR, data not shown): *C. dromedarius* α -lactalbumin (P00710; our protein of interest), *C. dromedarius* β -casein (Q9TVD0; from camel milk) and *Bos taurus* chymotrypsinogen A (P00766; our endoprotease in bottom-up). Table 1 resumes the differences observed between the three isoforms of α -La (see also Supplementary data Figs. S1 and S2). The area under curve (AUC) was systematically calculated for each peptide from the associated extracted ion chromatograms at 5-ppm accuracy, in A_1 , A_2 and A_3 , and with the control of the associated isotopic distribution at high resolution. The Asn⁴⁵ residue was found massively unmodified in A_1 and deamidated in A_2 and A_3 , whereas Asn¹⁶ was unmodified in A_1 , but deamidated in A_3 and deamidated in a very lower extend in A_2 . Because proteolytic experimental conditions may themselves induce deamidation, it was expected to get additional modification in bottom-up

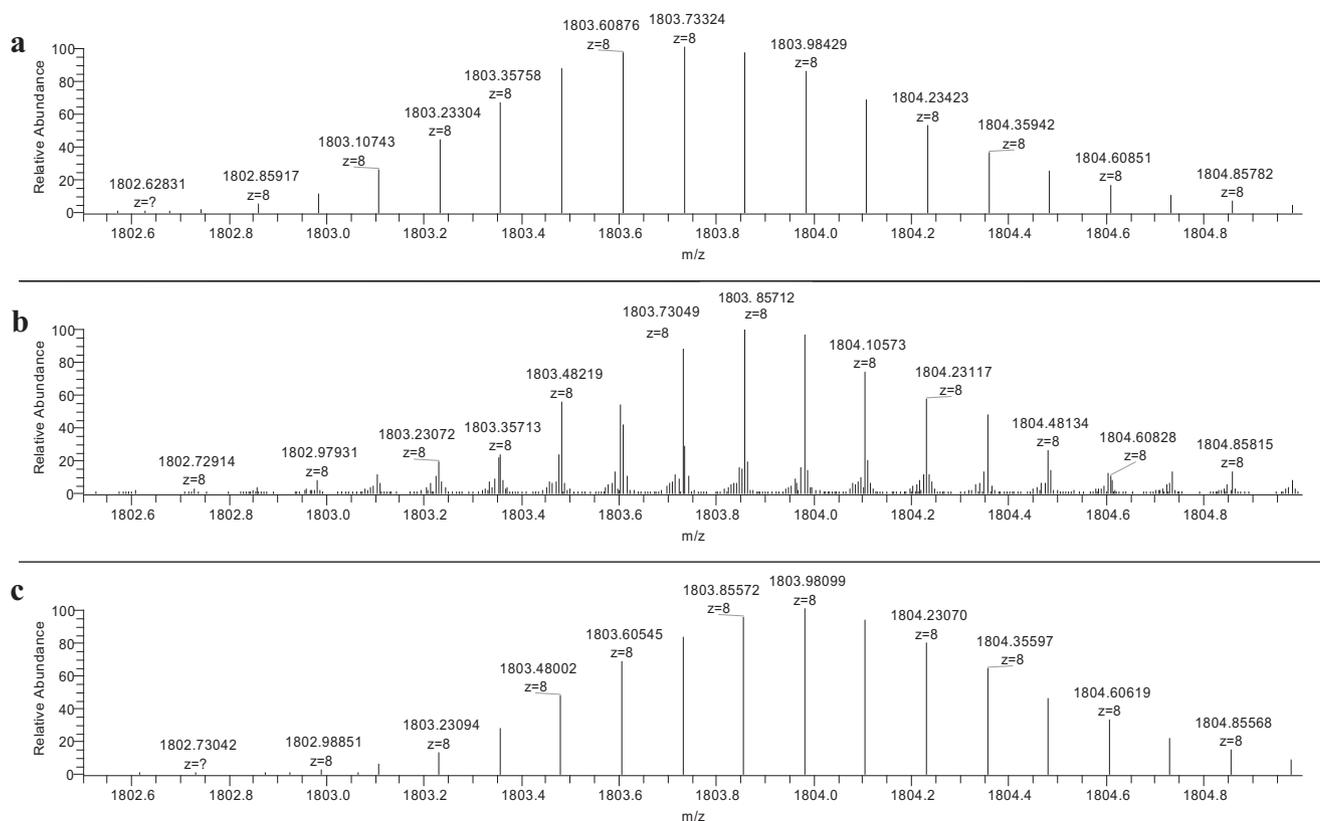


Fig. 3. FT-ICR-MS profiles of the major $[M+8H]^{8+}$ ion from (a) the native camel α -lactalbumin A_1 (b) the mono-deamidated isoform A_2 and (c) the di-deamidated isoform A_3 .

approaches. However, no deamidated Asn¹⁶ could be identified in A_1 in this study, and the relative abundance of deamidated Asn⁴⁵ was also significantly low in A_1 (Table 1), which ruled out with the fact that this artifact would be the major process to explain the deamidation of Asn in α -La. In agreement with the isotopic distribution at high resolution of intact α -La, and knowing the accurate mass of each isoform, bottom-up analysis confirmed that A_2 corresponded mainly to the camel α -La deamidated on Asn⁴⁵ and A_3 contained camel α -La deamidated on the two residues Asn¹⁶ and Asn⁴⁵.

3.3. Kinetics analysis of deamidation as a function of pH

Kinetics of nonenzymatic deamidation of the camel α -La was investigated by determining the relative proportion of native α -La that underwent deamidation in course of time at pH 7.4 and at pH 8.4. The buffer system was properly chosen in order to promote the deamidation reaction. Indeed, the negatively-charged phosphate ions increase the reaction rate *ca.* threefold as compared with the Tris ions at 150 mM and pH 7.4 (Robinson & Robinson, 2004). Whatever the pH, i.e. near-neutral or basic, the relative proportion decreased according to a logarithmic function of time of incubation (Fig. 4). The deamidation rate of α -La was, however, significantly faster at pH 8.4 than at 7.4. Values of the observed first-order rate constant (k_{obs}) determined according to Song et al. (2001) were 0.017 h⁻¹ at pH 7.4 and 0.055 h⁻¹ at pH 8.4. The deamidation half-time ($t_{1/2}$) of camel α -La was defined according to Robinson et al. (2009) and corresponded to 40 h at pH 7.4 and to 12 h at pH 8.4. These two measurable parameters were in good agreement with each other since the ratio $[k_{obs}(\text{pH } 8.4)]/k_{obs}(\text{pH } 7.4)$ and the ratio $[t_{1/2}(\text{pH } 7.4)]/t_{1/2}(\text{pH } 8.4)$ were similar (ratios of 3.2 and 3.3, respectively). This was relevant with the fact that the reaction rate is accelerated with increasing pH. The

deamidation reaction is base-catalyzed within the pH range of 5–8. The deamidation rate is proportional to the hydroxide ion concentration of the solution which leads to increase ionization of the peptide backbone that become prone to react with the Asn side chain (Song et al., 2001).

Another observation of great interest was that the isoform A_3 was rather generated at an elevated pH (8.4) whereas A_2 was readily obtained at a near-neutral pH (7.4). It is well-established that the nonenzymatic deamidation of Asn residues depends on the location of the Asn residue on the secondary and tertiary structure, as higher-order structures are usually inhibitory of protein deamidation rates (Robinson & Robinson, 2004). This might explain the differential deamidation susceptibilities of the two Asn–Gly sequences, the 16–17 sequence being less reactive than the 45–46 sequence.

3.4. Molecular modeling

According to our molecular modelisation of camel α -La, Asn⁴⁵ was located in a turn between two β -strands and easily accessible to the solvent (Fig. 5a). Moreover, during the production phase of molecular dynamics, the amide oxygen of Asn⁴⁵ as well as the amide nitrogen of the main chain of Gly⁴⁶ were not implied in any hydrogen bonding (Fig. 5b). A spontaneous deamidation process of Asn⁴⁵ through formation of a succinimide intermediate could then readily arise under physiological conditions.

On the contrary, the Asn¹⁶–Gly¹⁷ site seemed to form a more rigid structure. Analysis of the molecular dynamics production phase showed that two hydrogen bonds could stabilize this region (Fig. 5c). The first hydrogen bond is located between the amide oxygen of Asn¹⁶ with the amide nitrogen of the main chain of Leu²³ (mean distance of 0.33 ± 0.06 nm) and the second one between the amide nitrogen of the main chain of Gly¹⁷ with the

Table 1

FT-ICR-MS/MS of Asn¹⁶- and Asn⁴⁵-containing peptides. The peptides containing either N¹⁶ or N⁴⁵ and identified in at least of the three samples were collected. Up to 2 missed cleavages were tolerated and post-translational modifications (PTMs) are indicated. Extracted ion chromatograms for [M+2H]²⁺ and [M+3H]³⁺ ions at 5 ppm accuracy were used to estimate the area under curve (AUC) for each species. The AUC were normalized using the sum of the AUC of all the peptides identified for the camel α -La in each sample. The identification of the peptides was estimated through Mascot ion score (the highest the score, the lowest the probability that the observed match is a random event) and expectation value (the number of matches with equal or better scores that are expected to occur by chance alone).

Sequence	Position	#MC	PTMs	[M + H] ⁺ (Da)	A ₁ norm	A ₂ norm	A ₃ norm	Ion Score A ₁	Exp Value A ₁	Ion Score A ₂	Exp Value A ₂	Ion Score A ₃	Exp Value A ₃
NGHGGITLAEW	16–26	1	none	1154.55867	47.78	47.54	25.43	65	2.8×10^{-5}	52	5.1×10^{-4}	50	8.9×10^{-4}
SDELKDMNGHGGITLAEW	09–26	2	N ¹⁶ (Deam)	1973.89241	0.00	0.35	7.14	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	78	1.5×10^{-6}
SDELKDMNGHGGITLAEW	09–26	2	M ¹⁵ (Ox) N ¹⁶ (Deam)	1989.88235	0.00	3.54	8.92	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	73	3.7×10^{-6}
HMSGYDTEVVSNNGNREY	32–50	1	none	2172.92415	11.83	6.53	1.32	112	3.1×10^{-10}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HMSGYDTEVVSNNGNREY	32–50	1	M ³³ (Ox)	2188.92043	8.85	0.21	0.00	101	2.8×10^{-9}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HMSGYDTEVVSNNGNREY	32–50	1	M ³³ (Ox) N ⁴⁵ (Deam)	2189.90375	10.05	158.87	194.95	108	4.8×10^{-10}	75	9.4×10^{-7}	96	7.2×10^{-9}
HMSGYDTEVVSNNGNREY	32–50	1	N ⁴⁵ (Deam)	2173.90736	11.56	467.23	493.80	n.s.	n.s.	125	1.1×10^{-11}	88	6.3×10^{-8}
SGYDTEVVSNNGNREY	34–50	1	N ⁴⁵ (Deam)	1905.80832	21.77	67.47	47.86	87	1.1×10^{-7}	77	1.1×10^{-6}	81	4.3×10^{-7}
SGYDTEVVSNNGNREY	34–50	1	None	1904.82567	34.14	0.21	0.00	71	4.8×10^{-6}	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
GYDTEVVSNNGNREY	35–50	1	N ⁴⁵ (Deam)	1818.77699	0.00	3.41	3.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	55	1.7×10^{-4}
YDTEVVSNNGNREY	36–50	1	N ⁴⁵ (Deam)	1761.75475	0.67	0.55	5.19	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	75	1.9×10^{-6}
DTETVVSNNGNREY	37–50	0	N ⁴⁵ (Deam)	1598.69199	20.67	66.35	230.96	53	3.8×10^{-4}	77	1.2×10^{-6}	87	1.2×10^{-7}
TVVSNNGNREY	40–50	0	N ⁴⁵ (Deam)	1253.57447	0.27	2.16	11.58	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	65	3.3×10^{-5}

#MC: number of missed cleavages; n.s.: not sequenced, Ox: oxidation, Deam: deamidation; norm: normalized ($\times 10^3$).

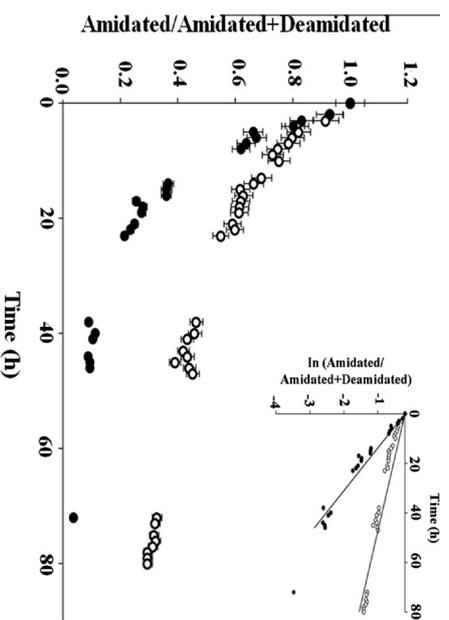


Fig. 4. Time-course analysis of deamidation of camel α -lactalbumin incubated at 37 °C in 150 mM phosphate buffer either at pH 7.4 (empty circles) or pH 8.4 (filled circles). Each point was determined from triplicate peak area measurements \pm standard deviation performed by AKTA-FPLC.

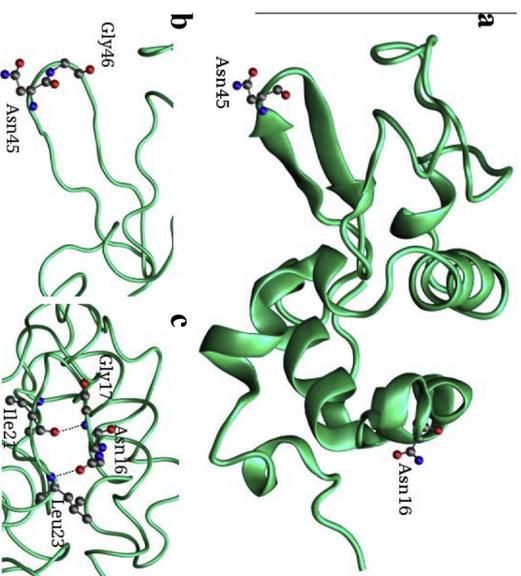


Fig. 5. (a) Ribbons representation of the camel α -lactalbumin model. An average minimized model of the coordinates of the production phase (see Section 2) was used to make this Figure. Asn¹⁶ and Asn⁴⁵ are represented with ball- and stick. (b) Detailed structure of the Asn⁴⁵ site. (c) Detailed structure of the Asn¹⁶ site. Hydrogen bonds are shown as dotted lines. See Results and discussion (Section 3.4) for details. Figures made with VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996) and PovRay (Persistence of Vision Raytracer Pty. Ltd., version 3.6, <http://www.povray.org/>).

carbonyl oxygen of the main chain of Ile²¹ (mean distance of 0.30 ± 0.05 nm). These two interactions could prevent the formation of a succinimide intermediate between the amide oxygen of Asn¹⁶ and the amide nitrogen of the main chain of Gly¹⁷. An increase of the pH leads to deprotonation of the backbone nitrogen which reacts with the Asn carbonyl carbon to form the cyclic tetrahedral intermediate succinimide (Robinson & Robinson, 2004). This could explain the formation of the isoform A₃ only at basic pH, despite the fact that Asn¹⁶ is located in an Asn-Gly-XXX-Gly motif.

4. Conclusion

The present study has shown that the two variants A and B of dromedary α -La reported in former studies corresponded in fact

to the isoforms spontaneously deamidated at Asn⁴⁵ at near-neutral pH and to the native protein with respect to the pI values. Moreover, a third isoform was generated at basic pH and was the result of a second nonenzymatic deamidation at Asn¹⁶. The probable formation of isoAsp during the deamidation process was not studied in this work, but the chemical instability of the camel α -La or of some of its peptides occurring in the gut during the post-prandial phase might lead to formation and accumulation of isoAsp residues, the latter being able to decrease the biological activity and elicit auto-immunity (Aswad, Paranandi, & Schurter, 2000). A previous study shows that the IgE-mediated allergy to mare's milk with severe anaphylactic symptoms is caused by some whey proteins including α -La but no cross-reaction with the corresponding bovine whey proteins is observed (Gall, Kalveram, Sick, & Sterry, 1996). As the equine α -La is susceptible to spontaneous deamidation on Asn⁴⁵ on the contrary of its bovine counterpart (Girardet et al., 2004), it would be then possible that this kind of allergy is due to the generation of isoAsp residues in the gut after ingestion of mare's milk. The consumption of mare's milk, available in health food stores, or of camel milk, might thus provide components good for health, but also undesirable components. Thus, the potential formation of isoAsp during technological transformation of dietary products or during food ingestion must be taken into consideration.

Acknowledgements

Financial support from the National FT-ICR network (FR 3624 CNRS) for the mass spectrometry analysis is gratefully acknowledged. The authors thank LABAB Laboratory of the Mouloud Mammeri University (Tizi-Ouzou, Algeria) for supporting Mrs Saliha Si Ahmed Zennia's stay in UR AFPA Laboratory (University of Lorraine, France). The authors acknowledge Ouargla Kassdi Merbah University (Algeria) for the gift of camel milk.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.036>.

References

- Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. K., et al. (2000). The intestinal T cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, 191, 603–612.
- Aswad, D. W., Paranandi, M. V., & Schurter, B. T. (2000). Isoaspartate in peptides and proteins: Formation, significance, and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 1129–1136.
- Belizy, S., Nasarova, I. N., Procofev, V. N., Sorokina, I. A., Puschkina, N. V., & Lukach, A. I. (2001). Changes in antioxidative properties of lactoferrin from women's milk during deamidation. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 576–580.
- Cacia, J., Keck, R., Presta, L. G., & Frenz, J. (1996). Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: Identification and effect on binding affinity. *Biochemistry*, 35, 1897–1903.
- Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., et al. (2012). *AMBER 12*. San Francisco: University of California.
- Catak, S., Monard, G., Aviyente, V., & Ruiz-Lopez, M. F. (2006). Reaction mechanism of deamidation of asparaginyl residues in peptides: Effect of solvent molecules. *Journal of Physical Chemistry*, 110, 8354–8365.
- 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, 1000–1005.
- 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 Medicine*, 194, 1165–1169.
- Cleland, J. L., Lam, X., Kendrick, B., Yang, J., Yang, T. H., Overcashier, D., et al. (2001). A specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Science*, 90, 310–321.
- Conti, A., Godovac-Zimmerman, J., Napolitano, L., & Liberatori, J. (1985). Identification of two α -lactalbumin from Somali camel milk (*Camelus dromedarius*). *Milchwissenschaft*, 40, 673–675.
- Gall, H., Kalveram, C. M., Sick, H., & Sterry, W. (1996). Allergy to the heat-labile proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin in mare's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 97, 1304–1307.
- Girardet, J.-M., Miclo, L., Florent, S., Mollé, D., & Gaillard, J.-L. (2006). Determination of the phosphorylation level and deamidation susceptibility of equine β -casein. *Proteomics*, 6, 3707–3717.
- Girardet, J.-M., N'Negue, M. A., Egitto, A. S., Campagna, S., Lagrange, A., & Gaillard, J.-L. (2004). Multiple forms for equine α -lactalbumin: evidence of N-glycosylated and deamidated forms. *International Dairy Journal*, 14, 207–217.
- Giuffrida, M. G., Cavaletto, M., Giunta, C., Neuteboom, B., Cantisani, A., Napolitano, L., et al. (1997). The unusual amino acid triple Asn-Ile-Cys is a glycosylation consensus site in human α -lactalbumin. *Journal of Protein Chemistry*, 16, 747–753.
- Hinz, K., O'Connor, P. M., Huppertz, T., Ross, R. P., & Kelly, A. L. (2012). Comparison of the principal proteins in bovine, caprine, buffalo, equine and camel milk. *Journal of Dairy Research*, 79, 185–191.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33–38.
- Järvinen, K. M., Beyer, K., Vila, L., Chatchatee, P., Busse, P. J., & Sampson, H. A. (2002). B-cell epitopes as a screening instrument for persistent cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110, 293–297.
- Kappeler, S. R. (1998). *Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins* Ph. D., Zurich, Switzerland: Swiss Federal Institute of Technology.
- Kiefer, F., Arnold, K., Künzli, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic Acids Research*, 37, D387–D392.
- Li, X., Cournoyer, J. J., Lin, C., & O'Connor, P. B. (2008). Use of ¹⁸O labels to monitor deamidation during protein and peptide sample processing. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19, 855–864.
- Lutter, P., Meyer, H. E., Langer, M., Witthohn, K., Dormeyer, W., Sickmann, A., et al. (2001). Investigation of charge variants of rViscumin by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 22, 2888–2897.
- Matéos, A., Girardet, J.-M., Mollé, D., Dary, A., Miclo, L., & Gaillard, J.-L. (2009). Two-dimensional cartography of equine β -casein variants achieved by isolation of phosphorylation isoforms and control of the deamidation phenomenon. *Journal of Dairy Science*, 92, 2389–2399.
- Mikkat, S., Kischstein, T., Kreutzer, M., & Glocker, M. O. (2013). Mass spectrometric peptide analysis of 2DE-separated mouse spinal cord and rat hippocampus proteins suggests an NGxG motif of importance for *in vivo* deamidation. *Electrophoresis*, 34, 1610–1618.
- Nakano, K., Ishiguro, T., Konishi, H., Tanaka, M., Sugimoto, M., Sugo, I., et al. (2010). Generation of a humanized anti-glypican 3 antibody by CDR grafting and stability optimization. *Anti-Cancer Drugs*, 21, 907–916.
- Natale, M., Bisson, C., Monti, G., Peltran, A., Perono Garoffo, L., Valentini, S., et al. (2004). Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry. *Molecular Nutrition and Food Research*, 48, 363–369.
- Nepomuceno, A. I., Gibson, R. J., Randall, S. M., & Muddiman, D. C. (2014). Accurate identification of deamidated peptides in global proteomics using a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Journal of Proteome Research*, 13, 777–785.
- Nonaka, Y., Aizawa, T., Akieda, D., Yasui, M., Watanabe, M., Watanabe, N., et al. (2008). Spontaneous asparaginyl deamidation of canine milk lysozyme under mild conditions. *Proteins*, 72, 313–322.
- Ochirkhuyag, B., Chobert, J.-M., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., & Haertle, T. (1998). Characterization of whey proteins from mongolian yak, khainak, and bactrian camel. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 105–124.
- Pace, A. L., Wong, R. L., Zhang, Y. T., Kao, Y. H., & Wang, Y. J. (2013). Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102, 1712–1723.
- Pâquet, D., Nejjar, Y., & Linden, G. (1988). Study of a hydrophobic protein fraction isolated from milk proteose peptone. *Journal of Dairy Science*, 71, 1464–1471.
- Ptitsyn, O. B. (1995). Molten globule and protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, 47, 83–229.
- Robinson, N. E., & Robinson, A. B. (2001). Molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 944–949.
- Robinson, N. E., & Robinson, A. B. (2004). *Molecular Clocks: Deamidation of Asparaginyl and Glutaminyl Residues in Peptides and Proteins*. Cave Junction, OR, USA: Althouse Press.
- Robinson, N. E., Robinson, M. L., Schulze, S. E. S., Lai, B. T., & Gray, H. B. (2009). Deamidation of α -synuclein. *Protein Science*, 18, 1766–1773.
- Robinson, N. E., Zabrouskov, V., Zhang, J., Lampi, K. J., & Robinson, A. B. (2006). Measurement of deamidation of intact proteins by isotopic envelope and mass defect with ion cyclotron resonance Fourier transform mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20, 3535–3541.
- Saadoui, B., Bianchi, L., Henry, C., Miranda, G., Martin, P., & Cebo, C. (2014). Combining proteomic tools to characterize the protein fraction of llama (*Lama glama*) milk. *Electrophoresis*, 35, 1406–1418.
- Si Ahmed Zennia, S., Almi, D., Senoussi, C., Boudjenah, S., & Mati, A. (2013). Separation and characterization of major milk proteins from Algerian Dromedary (*Camelus dromedarius*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 283–290.

- Song, Y., Schowen, R. L., Borchardt, R. T., & Topp, E. M. (2001). Effect of 'pH' on the rate of asparagine deamidation in polymeric formulations: 'pH'-rate profile. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *90*, 141–156.
- Yang, H., & Zubarev, R. A. (2010). Mass spectrometric analysis of asparagine deamidation and aspartate isomerization in polypeptides. *Electrophoresis*, *31*, 1764–1772.
- Zabrouskov, V., Han, X., Welker, E., Zhai, H., Lin, C., van Wijk, K. J., et al. (2006). Stepwise deamidation of ribonuclease A at five sites determined by top down mass spectrometry. *Biochemistry*, *45*, 987–992.