

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHESCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU, ALGERIE
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**



**Mémoire de fin d'étude
En Vue de l'obtention du Diplôme de Master
Option : Biochimie Appliquée**

Thème



Réalisé par :

**AMEUR Naima
LASMI Katia**

Encadré par : M^{me} SEBBANE-ALMI Dalila

Devant le jury :

Présidente du jury : M^{me} GHEZALI-SENOUSSI.C.....Maitre Assistante Classe A à l'UMMTO

Examinatrice : M^{me} SENANI-OULARBI.N.....Maitre Assistante Classe A à l'UMMTO

Examinatrice : M^{elle} ISSELNANE. S.....Maitre Assistante Classe B A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre promotrice M^{me} ALMI-SEBANE Dalila Maitre assistante au Département des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, qui nous a encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé pour permettre la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements vont également à notre copromotrice et présidente du jury M^{me} GHEZALI-SENOUSSI.Chahra, Maitre assistante à l'UMMTO et également pour les autres membres de la commission d'examen : M^{me} SENANI-OULARBI.N, Maitre Assistante Classe A à l'UMMTO et M^{elle} ISSELNANE. S, Maitre Assistante Classe B à l'UMMTO.

Dédicaces

A mes très chers parents « ALI et LOUIZA »

Les deux personnes que j'aime le plus dans la vie, qui méritent tout le respect du monde qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond amour et dévouement infini ;

A mon très cher père, l'homme le plus parfait dans le monde, mon grand exemple et mon directeur et mon éducateur ;

*Ma mère, source de compassion et de tendresse, l'exemple de patience et sacrifice, la raison de mon existence et le support de ma vie ;
Que dieu vous protège et vous réserve une longue vie pleine de bonheur et de santé.*

A mes très chères sœurs « Houria, Kahina, Fatma »

A mes chers frères « Houcine, Amar, Lounes, Lyes»

A mon très cher « Abbes et toute sa famille»

Merci infiniment pour ton soutien et encouragement et que le grand dieu te garde pour moi.

A mes amis «Dalila, Rachida, Lynda, Sadia, Meriem, Lydia, Saida, Mohamed Dahmani »

A mes collègues de travail « Chahinez, kamelia, Kamilia, Salwa, Lila, Faiza, Souad, Samira et Yazid »

A mes tantes « Chavha, nouara, Manina et leurs enfants »

A mes cousins « Smail, Salim, Celia et Rosa »

A mes s responsable « M^{er} MITICHE Mohamed Arab, M^{er} Mitiche le père et M^{me} Mitiche Ourdia »

Merci pour votre soutien et encouragement.

Naima

Dédicaces

A mes très chers parents « MAKHLOUF et NADIA »

Les deux personnes que j'aime le plus dans la vie, qui méritent tout le respect du monde qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond amour et dévouement infini ;

A mon très cher père, l'homme le plus parfait dans le monde, mon grand exemple et mon directeur et mon éducateur ;

Ma mère, source de compassion et de tendresse, l'exemple de patience et sacrifice, la raison de mon existence et le support de ma vie ;

Que dieu vous protège et vous réserve une longue vie pleine de bonheur et de santé.

A ma très chère sœur « YAMINA » et son mari « MOHAMED » à qui je souhaite une longue vie amoureuse pleine de santé et réussite.

A mes très chères sœurs « KAHINA et KENZA » et mes très chers frères « SALAH, GHILES, MEHDI, YAHIA » que dieu vous protège et vous éclaire le chemin de la réussite.

A mon cousin « AHCEN » que dieu te protège.

A mon fiancé « AREZKI » amour et lumière de ma vie, merci pour ton soutien et encouragement, que dieu nous réunisse dans les brefs délais.

A ma belle-mère « GHNIMA » et mon beau-père « HANAFI » à qui je souhaite une longue vie pleine de bonheur et de santé.

A ma grand-mère « Baya » que dieu te protège et te réserve une longue vie.

A toute ma famille et ma belle-famille.

A mes amis

Que dieu vous bénisse et vous garde tous pour moi, je vous aime.

Katia



Sommaire

Sommaire

Introduction générale.....	1
-----------------------------------	----------

I-Synthèse des données bibliographiques

Chapitre 1 : Généralités sur le lait de chamelle

1.1. Caractéristiques du lait camelin	3
1.1.1. Caractéristiques organoleptiques.....	3
1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques	3
1.2. Composition chimique	3
1.2.1. Protéines	6
1.2.1.1. Caséines.....	6
1.2.1.1.1. Les différents types de caséines	6
1.2.1.1.1.1. La caséine α_{S1}	6
1.2.1.1.1.2. La caséine α_{S2}	6
1.2.1.1.1.3. La β - caséine.....	7
1.2.1.1.1.4. La caséine κ	7
1.2.1.1.2. Structure des caséines camelines.....	8
1.2.1.2. Protéines du lactosérum	9
1.2.1.2.1. L' α -lactalbumine	10
1.2.1.2.2. La lactoferrine	10
1.2.1.2.3. La lactoperoxydase1	11
1.2.1.2.4. Le lysosyme.....	11
1.2.1.2.5. Les immunoglobulines	11
1.2.2. Matière grasse	12
1.2.3. L'eau.....	12
1.2.4. Lactose	12
1.2.5. Vitamines	13
1.2.6. Minéraux	14
1.3. Aptitudes technologiques du lait camelin	15

Chapitre 2 : Peptides bioactifs des caséines camelines

2.1. Définition des peptides bioactifs	17
2.2. Peptides bioactifs des caséines camelines	17
2.2.1. Peptides à activité anti-hypertensive	18
2.2.2. Peptides à activité opioïde.....	19
2.2.3. Activité antimicrobienne	20
2.2.4. Activités chaperons de la β - caséine cameline	20
2.2.5. Activité antioxydante des caséines.....	21

II-Partie expérimentale

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels	
1.1.1. Matériels.....	25
1.1.2. Produits chimiques	25
1.1.3. Matériel biologique	25
1.2. Méthodes	
1.2.1. Collecte du lait	26

1.2.2. Préparation d'échantillon	26
1.2.2.1. Ecrémage	26
1.2.2.2. Acidification.....	26
1.2.2.3. Dialyse.....	26
1.2.2.4. Lyophilisation.....	27
1.2.3. Hydrolyse enzymatique des caséines	29
1.2.4. Contrôle électrophorétique	
1.2.4.1. Définition et principe général.....	29
1.2.4.2. Electrophorèse en milieu dissociant et dénaturant, en présence de dodécyl sulfate de sodium et de 2-β-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)	
1.2.4.2.1. Principe.....	29
1.2.4.2.2. Conditions expérimentales	30
1.2.4.2.3. Préparation des échantillons.....	30
1.2.4.2.4. Conduite électrophorétique	30
1.2.5. Propriétés antioxydantes des caséines camelines et de leurs hydrolysats	
1.2.5.1. Le pouvoir réducteur	31
1.2.5.2. Test du DPPH.....	32
2. Résultats et discussion	
2.1. Résultats du contrôle électrophorétique	34
2.2. Activité antioxydante	
2.2.1. Pouvoir réducteur	35
2.2.2. Piégeage du radical libre DPPH	36
Conclusion.....	38
Références bibliographiques	39
Annexe	

Liste des abréviations

CN	Caséine
CNT	Caséines totales
CN-H	Caséine hydrolysée
κ-CN	Caséine κ
β-CN	La caséine β
α_{S2}-CN	Caséine α_{S2}
α_{S1}-CN	Caséine α_{S1}
aa	Acide aminé
TRY	Trypsine
CHYM	Chymotrypsine
min	Minute
nm	Nanomètre
α-La	α -lactalbumine
β-Lg	β -lactoglobuline
EOR	Epèces oxygénées réactives
DPPH	2,2-diphenylpicrylhydrazyl
TCA	Acide trichloracétique
pH	Potentiel d'hydrogène
DO	Densité optique
kDa	Kilo dalton
E/S	Enzyme/ substrat
P/V	Poids/volume
H-CHYM	Hydrolysats chymotrypsique
H-TRY	Hydrolysats trypsique

Listes des figures

N°	Titre	Page
01	Comparaison des régions sensibles à la chymosine des caséines- κ camelines et bovines.	8
02	Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SCHMIDT (1980).	9
03	Les différents mécanismes pour la libération des peptides bioactifs à partir des caséines.	17
04	Etapes d'isolement des caséines et des protéines sériques à partir du lait camelin.	28
05	Structure de SDS	30
06	Photographie de l'unité d'électrophorèse après montage et dépôt des échantillons.	31
07	Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant (AH)	33
08	Profil électrophorétique des caséines camelines totales et de leurs hydrolysats trypsique et chymotrypsique en PAGE-SDS ; CNT : caséines totales ; H-TRY : hydrolysats trypsique ; H-CHYM : hydrolysats chymotrypsique ; β -CN : β -caséine ; α_s -CN : caséines α_s	34
09	Pouvoir réducteur des caséines camelines avant et après hydrolyse par la trypsine (H-TRY) et la chymotrypsine (H-CHYM).	35
10	Pourcentage d'inhibition du DPPH par les caséines camelines et de leurs hydrolysats trypsique (H-TRY) et chymotrypsique (H-CHYM).	36

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Composition biochimique du lait de chamelle en comparaison avec celle du lait de vache.	4
II	Compositions du lait de dromadaire en pourcentage selon différents auteurs.	5
III	Composition en vitamines du lait de chamelle en vitamines en comparaison avec le lait de vache.	14
IV	Composition du lait de chamelle en minéraux en comparaison avec le lait de vache.	15
V	Comparaison entre les segments contenant une alternance des résidus proline des fragments de la β -caséine et les structures des β -casomorphine et les peptides apparentés.	20
VI	Identification des peptides qui ont au moins sept résidus identique avec les peptides bioactifs connus dans l'hydrolysate des protéines de colostrum camelin par spectrométrie de masse.	24

Résumé

Résumé

Le lait de chamelle contient en son sein des substances antioxydantes naturelles telles que les vitamines et les enzymes. Des études ont ainsi rapporté que même les protéines camelines et/ou leurs hydrolysats peuvent présenter une activité antioxydante. Dans le cadre de ce travail nous nous sommes intéressées à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante des caséines camelines avant et après hydrolyse enzymatique tout en imitant les conditions *in vivo*.

Les caséines du lait camelin collecté dans la région de Oued-Souf ont été purifiées puis hydrolysées par la chymotrypsine et la trypsine à 37°C. Le contrôle électrophorétique a été effectué en PAGE-SDS et l'activité antioxydante a été mesurée en utilisant deux tests : le piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) et le pouvoir réducteur. L'activité anti-radicalaire des caséines camelines augmente significativement après hydrolyse où on enregistré des pourcentages d'inhibition de : 52,4% pour les H-TRY et 58,01% pour les H-CHYM contre 25,96% pour CNT. Comparativement aux caséines natives, les hydrolysats exercent un pouvoir réducteur nettement plus important avec des DO à 700 nm de 0,022 pour les CNT, 0,342 pour les H-TRY et 0,457 pour les H-CHYM.

Ces résultats ont montré que les peptides générés par hydrolyse enzymatique présentent une activité antioxydante plus importante que celle des caséines totales.

Mots clés : caséines camelines, hydrolyse enzymatique, activité antioxydante, DPPH, pouvoir réducteur.

Abstract

Camel milk contains within it antioxidant natural substances such as vitamins and enzymes. Studies have also reported that even camel proteins and /or their hydrolysates may have antioxidant activity. As part of this work we are interested in evaluating in vitro antioxidant activity of camel caseins before and after enzymatic hydrolysis while mimicking vivo conditions.

Caseins of camel milk collected in Oued-Souf region were purified and hydrolyzed by chymotrypsin and trypsin at 37 ° C. The electrophoretic test was performed by SDS-PAGE and the antioxidant activity was measured using two methods: the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity and the Reducing power. The free radical scavenging activity of camel milk casein increases significantly after hydrolysis where registered percent inhibition are 52,4 % for H-TRY and 58,01 % for H-CMHY against 25,96% for CNT. Comparatively to native caseins, hydrolysates exert a significantly greater reduction power with the OD at 700nm: 0.022 for the CNT, 0,342 for H-TRY and 0,457 for the H-CHYM.

These results showed that the peptides generated by enzymatic hydrolysis have greater antioxidant activity than that of total caseins.

Keywords: camel caseins, enzymatic hydrolysis, antioxidant activity, DPPH, reducing power.



INTRODUCTION

Introduction

L'oxydation est un processus vital dans tous les organismes vivants bien que ses effets secondaires soient la production de radicaux libres. En général, ces radicaux libres n'entraînent pas de dégâts importants grâce à l'action protectrice des substances antioxydantes qui permettent dans une certaine mesure de maintenir un équilibre. Toutefois, la rupture de cet équilibre provoque un phénomène de "stress oxydatif" qui est un facteur majeur impliqué dans la progression de beaucoup de maladies humaines telles que : les maladies cardio-vasculaires, l'athérosclérose et le cancer, que l'on a considéré comme les causes principales de mort humaine.

L'hydroxyanisole butylé (BHA), L'hydroxytoluène butylé (BHT) et le gallate propyl sont des antioxydants synthétiques utilisés dans des produits alimentaires pour retarder l'oxydation des lipides. Cependant, leur utilisation est associée aux risques pour la santé. C'est pourquoi, l'intérêt dans la découverte d'antioxydants naturels représentant une alternative aux synthétiques est primordiale. Ainsi, l'utilisation possible de beaucoup d'antioxydants non-enzymatiques présents dans des fruits et des légumes (des polyphénols, des flavonoïdes, l'ISO-flavanones, des vitamines A, B, C, E et tocopherols) a été bien examinée. Dans la dernière décennie, la production de biopeptides ayant des propriétés antioxydantes par hydrolyse enzymatique de protéines animales ont été largement rapportées dans plusieurs études. On considère le lait bovin comme une source intéressante de protéines capables de produire par hydrolyse enzymatique ou fermentation microbienne des peptides montrant une activité de piégeage de radicaux libres.

Le lait de chamelle est le produit le plus abondant dans les régions arides où il constitue la principale ressource alimentaire pour les peuplades nomades, il ressemble un peu à celui de vache et est plus proche de celui de femme. Il est apprécié traditionnellement pour ses propriétés anti-infectieuse, anticancéreuse, antidiabétique et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents. 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 tonnes/an alors que la production journalière varie de 6 à 10 litres et la durée de lactation est en moyenne 14 mois.

L'amélioration des vertus thérapeutiques du lait camelin a reçu une grande attention. Les caséines camelines qui sont le composant majoritaire de ce lait sont très susceptibles à la protéolyse et capables de produire des peptides à activités biologiques diverses. Une fois ingéré, une des conditions pour leur action sur la santé des consommateurs est que l'activité

biologique de ces protéines ne soit pas affectée par les actions successives des enzymes protéolytiques gastro-intestinales.

Afin de contribuer à une meilleure connaissance des activités biologiques du lait camelin et en complément des travaux entrepris depuis plus d'une décennie sur le lait de chamelle, au laboratoire de biochimie de l'UMMTO nous nous sommes proposées à évaluer *in vitro* l'activité antioxydante (piégeage du radical libre DPPH et le pouvoir réducteur) des CN camelines avant et après hydrolyse enzymatique par la chymotrypsine et la trypsine tout en imitant la digestion gastro-intestinale humaine.

***Synthèse des données
bibliographiques***

Chapitre I : Généralités sur le lait de chamelle

1.1. Caractéristiques du lait de chamelle

1.1.1. Caractéristiques organoleptiques

Le lait de chamelle est de couleur blanche opaque en raison notamment de la structure et de la composition de sa matière grasse relativement pauvre en β -carotène. Il est légèrement sucré, avec un goût acide, parfois même salé et/ou amer. Les changements de goût sont principalement causés par le type de fourrage et la disponibilité de l'eau potable (AL HAJ *et al*, 2010). Le lait camelin est mousseux quand on le secoue légèrement car il renferme des quantités plus importantes de composant des protéose-peptones par rapport au lait de référence.

1.1.2. Caractéristiques physico-chimiques

Le pH du lait camelin varie de 6,5 à 6,7 (KHASKHELI *et al*, 2005; MEHAIA *et al*, 1995), il est légèrement inférieur à celui de lait de vache (6,8). Sa densité moyenne est de 1,029 g/cm³ (FARAH, 1996) identique à celle du lait bovin (1,030 g/cm³).

Il est moins visqueux que le lait de vache, sa viscosité à 20°C est de 1,72 mPa.s et elle est toutefois inférieure à celle du lait de vache dans les mêmes conditions et qui est 2,04 mPa.s. (KHEROUATOU *et al*, 2003). Il présente une acidité titrable de l'ordre de 18°D $\pm$ 0,79 (CHETHOUNA., 2011).

La variation des données sur le pH, l'acidité, la densité et la viscosité peut être 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 au lait d'autres espèces. Le pH de coagulation 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 (lysosyme, lactoferrine, lactoperoxydase, immunoglobulines, protéoses peptones...) dont les concentrations sont plus élevées dans ce lait que dans celui des autres espèces laitières (KAPPLER *et al*, 1999 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2007).

1.2. Composition chimique :

Le lait de chamelle contient tous les nutriments essentiels présents dans le lait de vache (FARAH *et al*, 1992). Il représente aussi un aliment essentiel et suffisant pour le chamelon pendant ses premiers stades de développement. La composition du lait camelin a été étudiée dans différentes parties du monde (tableau II) et les données de la littérature ont

montré une large gamme de variations dans sa composition, en raison de divers facteurs saisonniers et de l'environnement ainsi que le stade de lactation, l'âge et le nombre de vêlages (YAGIL, 1982 ; KHASKHELI *et al*, 2005). En outre, l'alimentation et la qualité de l'eau et sa quantité disponible pour les animaux jouent également un rôle important (KHASKHELI *et al*, 2005). Par ailleurs KONUSPAYEVA *et al* (2009) ont étudié l'effet de l'origine géographique sur la composition du lait camelinet ont montré que la composition du lait de chamelle vivant en Afrique orientale avait un taux plus élevé en matières grasses que le lait de chamelle vivant en Afrique et en Asie occidentale.

HADDADIN *et al* (2008) dans leur étude ont trouvé que tous les composants sauf le lactose atteignaient leur maximum au mi-hiver et étaient les plus faibles en été. Par exemple, les solides totaux étaient de 139 g/l en Janvier et 102 g/l en Août (raison de la disponibilité de l'eau potable).

Les principales composantes du lait de chamelle sont relativement proches de celle du lait de vache (tableau I).

Tableau I : Composition biochimique du lait de chamelle en comparaison avec celle du lait de vache (KAPPELER, 1998).

Composant (g/l)	Lait de chamelle	Lait de vache
Protéine	27-40	27-47
Lipide	32-38	moyenne 38
Lactose	39-56	moyenne 47
Solides totaux	10-11,5	12,5

Tableau II : Compositions du lait de dromadaire en pourcentage selon différents auteurs (KONUSPAYEVA *et al.*, 2009 ; AL HAJ *et* AL KANHALL, 2010).

Référence	M.G.	P.T.	L.	S.T.	Cendre	Pays
MEHAIA <i>et al.</i> (1995)	2.85	2.52	4.46	10.63	0.80	Arabie Saoudite (Hamra)
MEHAIA <i>et al.</i> (1995)	2.46	2.36	4.44	10.07	0.81	Arabie Saoudite (Wadah)
MEHAIA <i>et al.</i> (1995)	3.22	2.91	4.43	11.35	0.79	Arabie Saoudite (Majaheim)
MEHAIA (1996)	0.28	3.22	4.45	8.64	0.69	Arabie Saoudite
EL-AGAMY <i>et al.</i> (1998)	3.95	3.26	4.74	12.80	0.85	Egypte
MEHAIA (1998)	3.90	2.54	4.71	11.94	0.79	Arabie Saoudite
RAMDAOUI <i>et al.</i> (1998)	2.74	3.36	4.19	11.14	0.86	Maroc
WANGOI <i>et al.</i> (1998)	4.20	3.08	4.18	12.66	0.79	Kenya (Somalie)
WANGOI <i>et al.</i> (1998)	4.81	3.31	4.28	13.44	0.83	Kenya (Turkana)
WANGOI <i>et al.</i> (1998)	4.29	3.13	4.05	12.45	0.82	Kenya
ZHAO (1998)	4.15	3.45	4.55	8.85	0.70	China
ZIA-UR-RAHMAN <i>et al.</i> (1998)	5.22	2.68	4.30	10.40	0.73	Pakistan I
ZIA-UR-RAHMAN <i>et al.</i> (1998)	3.50	4.00	3.26	13.30	0.83	Pakistan II
ZIA-UR-RAHMAN <i>et al.</i> (1998)	4.50	3.00	4.10	11.10	0.78	Pakistan III
GULIYE <i>et al.</i> (2000)	3.39	2.79	4.81	11.50	0.77	Kenya
SERIKABEVA <i>et al.</i> (2000)	5.17	4.45	4.82	15.51	0.68	Kazakhstan
ATTIA <i>et al.</i> (2001)	1.20	2.81	5.40	9.61	0.99	Tunisie
INDRA (2003)	4.47	3.53	4.95	13.64	0.70	Mongolie
WERNERY (2003)	3.50	3.35	4.75	10.75	-	Émirats arabes unis
RAGHVENDAR <i>et al.</i> (2004)	2.30	2.30	4.05	9.50	-	Inde
KOUNIBA <i>et al.</i> (2005)	2.65	3.25	4.05	10.80	0.83	Maroc
EL-HATMI <i>et al.</i> (2006)	3.00	3.1	4.20	-	1.05	Tunisie
ABDOUN <i>et al.</i> (2007)	3.26	3.50	3.60	11.03	0.67	Soudan
KAMAL <i>et al.</i> (2007)	3.78	3.30	5.85	15.06	0.70	Egypte
HADDADIN <i>et al.</i> (2008)	2.95	2.69	3.92	12.30	0.82	Jordanie
SHUIEP <i>et al.</i> (2008)	2.64	2.93	3.12	9.56	0.73	Est de Soudan
SHUIEP <i>et al.</i> (2008)	2.85	2.94	2.90	9.41	0.73	Ouest de Soudan
BAKHEIT <i>et al.</i> (2008)	3.40	3.40	3.60	10.90	0.80	Nord de Soudan
OMER <i>et al.</i> (2009)	2.35	2.06	4.41	9.78	0.94	Soudan (différentes Zones)

M.G. : matière grasse / P.T. : protéine totale /L. : lactose /S.T. : solides totaux /(-) : valeur non déterminée

1.2.1. Protéines

La teneur en protéines totale du lait de chamelle s'étend de 2,15 % à 4,90% ; la moyenne est de $3,1 \pm 0,5$ % (KONUSPAYEVA *et al*, 2009). Ces dernières peuvent être scindées en deux grands groupes : les caséines qui précipitent totalement à leur pH isoélectrique (4,6 pour le lait bovin et 4,3 pour le lait camelin) et les protéines lactosériques qui restent solubles à ces pH_i.

1.2.1.1. Caséines

Les caséines sont les principales protéines dans le lait de chamelle. Il contient à peu près 1,63 à 2,76 % qui représentent environ 52 à 87 % des protéines totales contre 83% dans le lait bovin (MEHAIA *et al*, 1995 ; KHASKHELI *et al*, 2005).

Les caséines du lait camelin sont des phosphoprotéines élaborées dans les cellules lactogènes mammaires et sont constituées de quatre protéines différentes : la caséine α_{S1} (α_{S1} -CN), la caséine α_{S2} (α_{S2} -CN), la caséine β (β -CN) et la caséine κ (κ -CN).

La β -CN est la principale fraction caséinique (65%) du lait de chamelle suivie de la caséine α_{S1} (21%) , contre 36% et 38% respectivement dans le lait de vache (KAPPELER *et al*, 2003). Le lait camelin est similaire au lait humain en ce qui concerne ce pourcentage élevé en β -CN, ce qui pourrait refléter son taux de digestibilité plus élevé et une plus faible incidence allergique dans l'intestin des nourrissons que le lait bovin ; la β -CN est plus sensible à l'hydrolyse peptidique que la caséine α_S (EL-AGAMY *et al*, 2009 ; EL-HATMI *et al*, 2012). La α_{S2} -CN représente environ 9,5% des caséines camelines totales alors que la κ -CN représente seulement 3,47% (KAPPELER *et al*, 2003) contre 13% dans le lait bovin.

1.2.1.1.1. Les différents types de caséines

1.2.1.1.1.1. La caséine α_{S1} (α_{S1} -CN)

Elle contient 207 acides aminés (aa) avec un poids moléculaire de 25,773 kDa et un pH isoélectrique de 4,4 (KAPPELER *et al*, 1998).

1.2.1.1.1.2. La caséine α_{S2} (α_{S2} -CN)

Cette fraction est présente dans le lait de chamelle à une moyenne de 2,6 g/l (AL-ALAWI *et al*, 2011). Sa structure primaire contient 178 résidus d'aa dont 11 résidus de sérine phosphorylés. Son poids moléculaire est d'environ 21,266 kDa, alors que son pH isoélectrique est 4,58 (KAPPELER *et al*, 1998). Son homologue bovin en présente 207 résidus et une masse molaire qui oscille entre 25 et 26 kDa (SWAISGOOD, 1982 ; LORIENT, 1991).

L'absence de résidus glucidiques et la présence de deux résidus cystéine qui font un pont disulfure caractérisent α_{S2} -CN cameline.

1.2.1.1.1.3. La β - caséine (β -CN)

La β -CN est constituée de 217 aa (son homologue bovin contient 209 aa) avec un poids moléculaire de 28.6 kDa (MOHAMED, 1993 cité par AL HAJ *et al*, 2010). Cette valeur est nettement plus élevée que celles rapportées par KAPPELER *et al*. (1998) qui est 24,651 kDa pour la β -CN caméline et 24 kDa pour la β -CN bovine. Son point isoélectrique est à pH 4,76. Les sites de phosphorylation y sont présent en quatre positions (Serine 15, 17, 18 et 19) (KAPPELER *et al*, 1998). Elle est dépourvue de résidus glucidiques et de cystéine. Comme dans le lait bovin c'est la protéine la plus hydrophobe des caséines (LARSSON-RAZNIKIEWIC *et* MOHAMED, 1986).

1.2.1.1.1.4. La caséine κ (κ -CN)

C'est la caséine la plus étudiée en raison de son rôle dans la coagulation du lait par la présure (CAYOT *et* LORIENT, 1998 ; FILION, 2006 cité par MEDJOUR, 2014), de son importance dans la stabilité de la micelle et de son intérêt en transformation laitière. Elle se différencie des autres caséines par sa grande sensibilité à la chymosine, sa faible affinité pour le calcium et la présence de résidus glucidiques (FILION, 2006 cité par MEDJOUR, 2014) qui sont représentés majoritairement par l'acide sialique (l'acide N-acétyl-neuraminique). La κ -CN cameline est composée de 162 aa avec un pH isoélectrique de 4,11 et une masse moléculaire de 18,254 kDa. Dans le cas du lait bovin, elle est constituée de 169 résidus pour une masse moléculaire évaluée à 19kDa (KAPPELER *et al*, 1998).

La κ -CN du lait de chamelle possède un site différent pour l'hydrolyse par la chymosine en comparaison avec celle du lait bovin. La chymosine est connue pour hydrolyser la κ -CN du lait bovin au niveau de la liaison Phe₁₀₅-Met₁₀₆, tandis que son site d'action sur la κ -CN caméline est Phe₉₇-Ile₉₈ (figure 01). En outre, il a été signalé que la κ -CN du lait camelin contient dans sa séquence un résidu proline supplémentaire (Pro₉₅) (figure 01) qui joue probablement un rôle important dans la stabilité de la κ -CN cameline par rapport à celle bovine (KAPPELER *et al*, 1998).

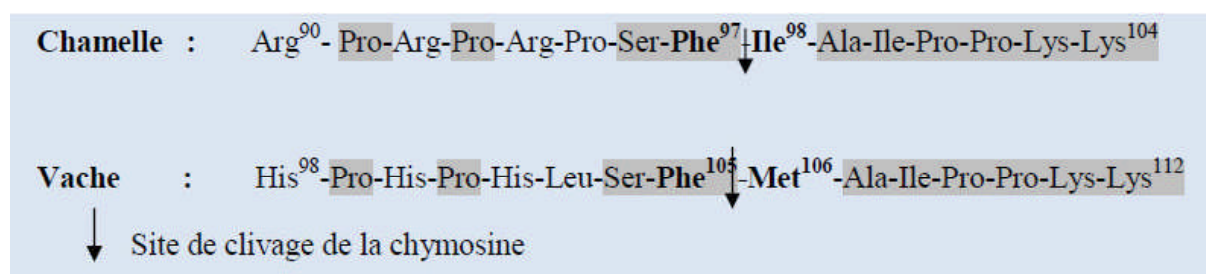


Figure 01 : Comparaison des régions sensibles à la chymosine des caséines-κ camelines et bovines (KAPPELER *et al*, 1998).

1.2.1.1.2. Structure des caséines camelines

Les caséines camelines possèdent une organisation micellaire (figure 02). Ces micelles sont des colloïdes édifiées à partir des quatre types de caséines en interaction avec une fraction minérale (citrate (30,9 mg/g), phosphate (18,7 mg/g), calcium (42,6 mg/g), magnésium (3 mg/g), potassium (1,6 mg/g) et sodium (1,1 mg/g) (ATTIA *et al*, 2000)) dont le composant prédominant est le phosphate de calcium (LEONIL *et al*, 2007).

L'aspect, la distribution et le diamètre des micelles de caséines des laits ont été étudiés par microscopie électronique. La microscopie électronique à balayage sur le lait camelin a montré une organisation similaire à celle du lait de vache avec des formes sphériques et des tailles variables. Ainsi, le modèle de la micelle bovine qui est une structure composée de l'assemblage de submicelles peut être extrapolé au lait camelin (FARAH *et al*, 1989). Cependant, les différences les plus notables entre ces deux laits concernent les dimensions des micelles. La taille moyenne des micelles camelines est nettement plus grande (FARAH *et al*, 1989 ; AL-ALAWI *et* LALEYE, 2011). Leur diamètre moyen a été retrouvé à environ le double de celui du lait de vache, 320 nm et 160 nm respectivement (RAMET, 2001), alors que FARAH *et al* en 1989 ont observé que les diamètres des micelles de caséines camelines sont entre 260 et 300 nm.

La composition des submicelles au centre et en périphérie est différente. En effet, les caséines β et α_{s1} sont plus présentes au centre de la micelle et forment le cœur hydrophobe alors que la partie externe, d'avantage hydrophile, est formée de caséine α_{s1} , α_{s2} et κ (AMIOT *et al*, 2002).

KHEROUATOU (2004) a mentionné que la micelle du lait camelin diffère de son homologue du lait de référence sur plusieurs aspects : un diamètre micellaire plus important (0,4-0,5 μ m contre 0,13-0,16 μ m) ; une distribution de taille plus large (0,6 μ m contre 0,3 μ m) ; une minéralisation plus élevée (11,4g contre 7,4g/100g de poids sec) et un taux de caséines totales plus faible (20,60g/Kg contre en moyenne 28g/Kg).

Certaines différences concernant la charge minérale des micelles ont également été remarquées. Par conséquent, il est à noter que le diamètre moyen des micelles de caséine est étroitement liée à la fraction de Ca / Caséine. En outre, il a été établi que les grandes micelles sont plus riches en phosphate de calcium alors que les petites micelles sont plus riches en κ -CN.

Les micelles peuvent être déstabilisées en agrégat en utilisant l'une de ces trois principales méthodes : l'utilisation d'enzymes protéolytiques, les conditions acides et les traitements de chaleur.

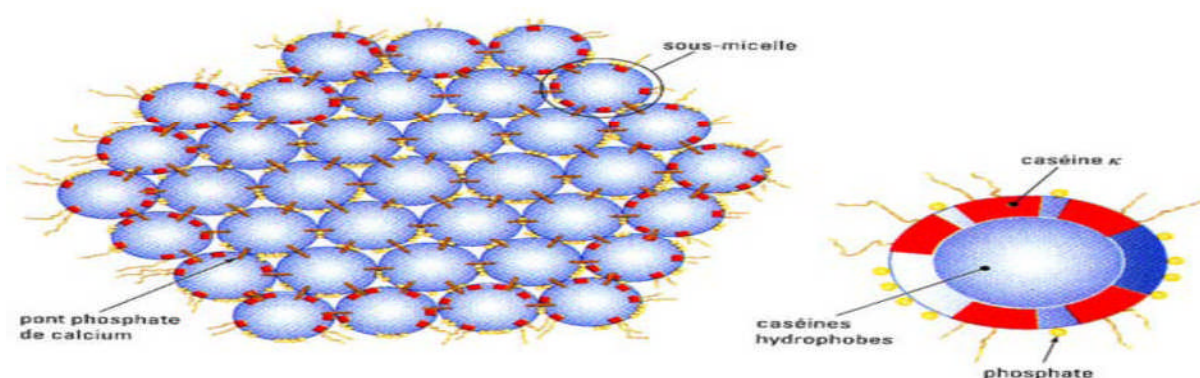


Figure 02 : Représentation de la micelle de caséine bovine selon le modèle de SCHMIDT (1980).

1.2.1.2. Protéines du lactosérum

Les protéines du lactosérum sont la deuxième composante principale des protéines du lait camelin, elles constituent 20 à 25% des protéines totales. La teneur en protéines lactosériques dans le lait de chamelle se fluctue entre 0,9 à 1,0 % de la composition globale du lait et elle est plus importante que celle du lait de vache avec 0,7-0,8 % (AL-ALAWI *et al*, 2011). Près de 90% des protéines de lactosérum est constitué de : l' α -lactalbumine (α -La), le sérum albumine, les immunoglobulines et la lactophorine, le reste étant des protéines mineures telles que la lactoferrine, le lysozyme, les protéose-peptones, la lactoperoxydase (EL-HATMI *et al*, 2007; FARAH, 2011 ; EL-HATMI *et al*, 2012).

La composition en protéines lactosériques du lait camelin est différente de celle du lactosérum du lait bovin, où le lait de chamelle semble déficient en β -lactoglobuline (β -Lg) (EL-AGAMY, 2000 ; KAPPELER *et al*, 2003 ; LALEYE *et al*, 2008) comme c'est le cas du lait humain (SALAMI *et al*, 2008 ; EL-AGAMY *et al*, 2009 ; EL-HATMI *et al*, 2012).

Cette protéine a été signalée comme étant l'une des principales sources d'allergie du nourrisson ce qui limite l'utilisation du lait de vache pour la préparation du lait maternisé (SALAMI *et al*, 2008 ; EL-HATMI *et al*, 2012). L' α -La est la principale composante de la fraction protéinique du lactosérum camelin. A l'opposé, la β -Lg représente la composante principale (50%) des protéines lactosériques bovines suivie par l' α -La (25%) (AMIOT *et al*, 2002).

Certaines propriétés des protéines de lactosérum de lait de chamelle ont été jugées différentes de celles des protéines du lactosérum d'autres espèces. Leur stabilité thermique s'est avéré être considérablement plus élevée que celle des protéines du lactosérum bovin (EL-AGAMY, 2000 ; AL-ALAWI *et* LALEYE, 2011). Il a été signalé que la dénaturation des protéines lactosériques de chamelle est plus faible (32-35%) que celle observée pour les protéines du lactosérum bovin (70-75%) à 80 °C pendant 30 min (AL-SALEH, 1996 ; FARAH, 1986).

1.2.1.2.1. L' α -lactalbumine

L' α -La du lait de chamelle est constituée de 123 résidus d'aa avec une masse moléculaire de 14,6 kDa (BEG *et al*, 1985), ce qui est similaire à l' α -La bovine, humaine et caprine (BEG *et al*, 1986). D'autre part, de grandes différences existent dans la séquence d'acides aminés de l' α -La du lait de chamelle en comparaison à d'autres espèces, y compris les bovins et les caprins (KAPPELER *et al*, 2004 ; MERIN *et al*, 2001). L' α -La cameline généralement est très riche en aa essentiels et particulièrement en : Tryptophane, Cystéine et Lysine où elle contient 21,6% de ces trois aminoacides alors que son homologue bovin n'en contient que 19,6%. Le lait de chamelle contient 2,2 g/l de l' α -La, le lait humain de 2,45 g/l. Cette concentration n'est que 0,5 g/l pour le lait bovin (SALAMI *et al*, 2008). Le taux d'homologie entre l' α -La cameline et humaine est de 72% (SALAMI *et al*, 2008).

1.2.1.2.2. La lactoferrine

La lactoferrine du lait provenant de sources différentes est connue par sa rétention du fer à pH inférieur à 3-4 (MAZURIER *et* SPIK, 1980 cité par AL HAJ *et* AL KANHALL, 2010), en revanche, la lactoferrine dans le lait de chamelle semble perdre du fer de son extrémité N terminale à pH 3-4 et de son extrémité C terminale à pH 6-7 (KHAN *et* IQBAL, 2001). La lactoferrine cameline est constituée d'une chaîne comprenant 689 résidus aminoacides. Son poids moléculaire est de 75,250 kDa et sa concentration est 220mg/l (KAPPELER *et al*, 1999).

En outre de son rôle de transport du fer, la lactoferrine est un antimicrobien (FARNAUD *et al*, 2003 cité par JRAD *et al*, 2014), notamment pour les espèces bactériennes dont le métabolisme exige cet élément.

1.2.1.2.3. La lactoperoxydase

C'est une enzyme d'oxydo-réduction à activités bactériostatique et bactéricide principalement sur les bactéries GRAM négatif (TAYEFI-NASRABADI *et al*, 2011b cité par MEDJOUR, 2014). Son activité enzymatique dans le lait de chamelle est de 869-1172 U/l et son poids moléculaire est 78 kDa alors que celui du bovin est de 72,5 kDa (EL-AGAMY *et al*, 1996).

1.2.1.2.4. Le lysozyme

Le lysozyme du lait de chamelle a un poids moléculaire de 14.4 kDa. Il possède une activité de lyse supérieure à celle du lysozyme bovin, mais inférieure à celle du lysozyme du blanc d'œuf (EL-AGAMY *et al*, 1996). Le lait de chamelle contient une concentration plus élevée de lysozyme (15 µg/100 ml) contre (7 µg/100 ml) pour le lait de vache (EL-AGAMY *et al*, 1996).

1.2.1.2.5. Les immunoglobulines

Elles se distinguent par l'organisation de leurs chaînes lourdes qui diffèrent complètement de ce qui est connu chez les autres vertébrés (KONUSPAYEVA *et al*, 2004). Dans le lait la concentration est faible mais la teneur répertoriée dans le lait de chamelle est 4 fois supérieure à celle de la vache à 0°C et 6 fois plus élevée à 65°C. Par ailleurs, l'IgG caméline serait plus thermorésistante : il reste 0,048 mg/ml d'IgG dans le lait de chamelle à 85°C alors qu'elle disparaît dans le lait de vache (EL-AGAMY, 2000 ; KONUSPAYEVA *et al*, 2004).

D'autres protéines seraient spécifiques au lait camelin et sont absentes dans les autres laits. C'est le cas de la protéine acide ou whey acidic protein (WAP), de la protéine basique ou whey basic protein (WBP) et du peptidoglycan recognition protein (PGRP) (avec une concentration de 120 mg/l) (KAPPELER *et al*, 2003) qui sont des protéines de reconnaissance du peptidoglycane possédant une vaste activité antimicrobienne et une capacité de contrôler les métastases du cancer (MAL *et* PATHAK, 2010 cité par MEDJOUR, 2014).

1.2.2. Matière grasse

La matière grasse du lait est considérée comme une source d'énergie. Elle agit comme un solvant pour les vitamines liposolubles et fournit des acides gras essentiels (FARAH, 2004).

La teneur en matière grasse du lait camelin est comprise entre 1,2 et 6,4% (KONUSPAYEVA *et al*, 2009) avec une moyenne de 3,5 %.

D'après YAGIL *et al* (1980) la teneur en matière grasse du lait de chamelle passe de 4,3 à 1,1 % dans le lait produit par des chamelles assoiffées.

Comparativement au lait bovin, la matière grasse du lait camelin est pauvre en acides gras à courte chaîne et en carotène (ABU-LEHIA, 1989). Cette teneur en ce dernier composé peut expliquer la couleur blanchâtre de cette matière.

Dans ce lait, une richesse en acides gras à longue chaîne a été rapportée 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*, 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).

1.2.3. L'eau

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 al*, 2001). En cas de déshydratation, la teneur en eau du lait camelin augmente (passant de 86 à 91%), ce qui constitue une adaptation naturelle au milieu afin d'assurer en priorité les besoins des jeunes chamelons (YAGIL *et al*, 1980).

La teneur moyenne de l'extrait sec total du lait camelin (11,9%) est légèrement inférieure à celle du lait bovin (12,3%) (GASSEM *et* ABU-TARBOUSH., 2000 cité par ZENNIA, 2015).

1.2.4. Lactose

Le lactose est la principale fraction glucidique du lait et représente une source d'énergie pour les nouveaux nés. La teneur en lactose dans le lait de chamelle varie de 2,40 à 5,85 % et est légèrement plus élevée que sa teneur dans le lait de vache (FARAH, 1996 ; FARAH, 2004 ; FARAH, 2011).

La grande variation de la teneur en lactose pourrait être dû au type de plantes consommées dans les déserts (KHASKHELI *et al*, 2005). Les dromadaires préfèrent généralement les plantes halophiles comme *Atriplex*, *Acacia* et *Salosa* pour répondre à leurs besoins

physiologiques en sels (AL HAJ *et al* KANHALL, 2010). Il a été rapporté que la teneur en lactose est le seul élément qui reste presque quasiment inchangée au cours de lactation (FARAH, 2004 ; HADDADIN *et al*, 2008) et dans des conditions d'hydratation ou de déshydratation (FARAH, 1996). Toutefois, elle peut varier légèrement en fonction des races de dromadaire dans les différentes parties du monde (AL HAJ *et al* KANHALL, 2010).

1.2.5. Vitamines

Le lait de chamelle contient diverses vitamines, telles que les vitamines : C, A, E, D et le groupe B (FARAH *et al*, 1992; HADDADIN *et al*, 2008). Le lait bovin est riche en β -carotène, alors que cette dernière ne semble pas détectée dans le cas du lait de chamelle (STAHL *et al*, 2006).

Le lait de camelin est connu pour sa richesse en vitamine C trois fois (FARAH *et al*, 1992) à cinq fois (STAHL *et al*, 2006) plus élevée que dans le lait bovin. Ainsi, le lait de chamelle cru et fermenté pourrait être une bonne source en vitamine C pour les personnes vivant dans les zones arides où les légumes et les fruits ne sont pas disponibles (STAHL *et al*, 2006). La moyenne de la vitamine C contenu dans le lait de chamelle est 37.4 mg/l (FARAH *et al*, 1992; HADDADIN *et al*, 2008). En comparaison avec le lait de vache, la teneur en niacine (B₃) est plus élevée dans le lait de chamelle (HADDADIN *et al*, 2008). En revanche, la teneur en vitamine A (FARAH *et al*, 1992 ; STAHL *et al*, 2006) et en riboflavine (B₂) (FARAH *et al*, 1992) est plus faible que dans le lait bovin. Les concentrations en thiamine (B₁) et en pyridoxine (B₆) dans le lait de chamelle sont comparables à celles du lait bovin (HADDADIN *et al*, 2008), alors que la concentration en vitamine E est très proche de celle du lait bovin (FARAH *et al*, 1992).

Tableau III: Composition en vitamines du lait de chamelle en comparaison avec le lait de vache (KAPPELER, 1998).

Vitamines (mg/kg)	Lait de chamelle	Lait de vache
Acide ascorbique (C)	24-36	3-23
Cobalamine (B12)	0,002	0,002-0,007
Acide Folique (B9)	0,004	0,01-0,10
Niacine (B3)	4,6	0,5-0,8
Acide Pantothénique (B5)	0,88	2,6-4,9
Pyridoxine (B6)	0,52	0,40-0,63
Rétinol (A)	0,10-0,15	0,17-0,38
Riboflavine (B2)	0,42-0,80	1,2-2,0
Thiamine (B1)	0,33-0,60	0,28-0,90
Tocophérol (E)	0,53	0,2-1,0

1.2.6. Minéraux

La teneur totale en minéraux est généralement exprimée en cendres totales. Elle varie de 0,60 à 1,05 % dans le lait de chamelle. Bien que les sels représentent dans la plupart du temps moins de 1% du lait, ils influent sur l'état physique et la stabilité des protéines du lait, en particulier le complexe phosphocaséinates (FARAH, 2004).

Les variations de la teneur en minéraux ont été attribuées à la race, l'alimentation, les procédures analytiques (AL HAJ *et al* KANHALL, 2010), l'apport en eau (HADDADIN *et al*, 2008), l'état sanitaire de l'animal et le stade de la lactation (FARAH, 2004). Le lait de chamelle est une source riche en chlorure (KHASKHELI *et al*, 2005) en raison des fourrages consommés par les dromadaires comme Atriplex et Acacia qui contiennent généralement une forte teneur en sel (YAGIL, 1982). Les minéraux : Na, K, Fe, Cu et Mn dans le lait de chamelle sont sensiblement plus élevés que ceux rapportés pour le lait de vache (tableau IV).

Tableau IV: Composition du lait de chamelle en minéraux en comparaison avec le lait de vache (KAPPELER, 1998).

Minéraux (mg/l)	Lait de chamelle	Lait de vache
Calcium	1060-1570	1000-1400
Cuivre	1,3-1,8	0,1-0,2
Phosphate Inorganique	580-1040	650-1100
Fer	1,3-2,5	0,3-0,8
Potassium	600-2100	1350-1550
Magnésium	75-160	100-150
Manganèse	0,08-0,2	0,04-0,2
Sodium	360-620	350-600
Zinc	4,0-5,0	3,5-5,5

1.3. Aptitudes technologiques du lait camelin

Les fabrications de fromage ou de beurre à partir du lait de chamelle sont réputées difficiles. Comparé au lait de vache, le lait de dromadaire a des particularités qui limitent sa transformation:

- le lait camelin contient des facteurs antimicrobiens en grandes quantités ce qui rend difficile son acidification même après thermisation (KAMOUN, 1995 ; EL-AGAMY, 2000 ; ATTIA *et al*, 2001) ;
- la faible teneur en extrait sec, la teneur réduite en caséine kappa, ainsi que la grande taille des micelles de caséines (ATTIA *et al*, 2000) ne rendent la coagulation possible qu'après l'ajout de grandes quantités de présure ;
- la matière grasse est difficilement séparée par écrémage à cause de la petite taille des globules gras (FARAH *et al*, 1989 ; KAMOUN, 1995).

Cependant, ces difficultés ont été contournées par des adaptations technologiques, on peut citer à titre d'exemple :

- l'adjonction de phosphate de calcium pour le rétablissement de l'équilibre minéral (KAMOUN, 1995).
- l'utilisation des extraits d'enzymes gastriques de dromadaires (BOUDJENAH *et al*, 2012) et de la pepsine.

- dans la fabrication du yoghourt et pour renforcer le gel, le lait de dromadaire est corrigé par un apport de caséinates de poudre de lait de vache (KAMOUN, 1995) ou de brebis (RAMET, 1994).

Chapitre II : Peptides bioactifs des caséines camelines

2. Peptides bioactifs des caséines camelines

2.1. Définition des peptides bioactifs

Les peptides bioactifs sont des séquences définies d'acides aminés qui sont inactives au sein de leur protéine d'origine, mais qui présentent des propriétés particulières une fois libérées par action enzymatique. On les appelle aussi peptides fonctionnels. Ces peptides bioactifs sont capables d'exercer, entre autres, un effet sur le système digestif, les défenses de l'organisme (un effet antimicrobien ou immunomodulateur), le système cardiovasculaire (un effet antithrombotique ou antihypertenseur), et/ou le système nerveux (un effet sédatif et analgésique de type opioïde).

2.2. Peptides bioactifs des caséines camelines

Il est maintenant bien connu qu'en plus du principal rôle physiologique des caséines du lait camelin comme source d'acides aminés requise pour la croissance du nouveau-né, ces protéines peuvent contenir des peptides codés dans leurs séquences, qui peuvent présenter différentes activités biologiques une fois libérés. Ces peptides sont habituellement de 2 à 20 acides aminés et peuvent être libérés *in vivo* lors de la digestion, *in vitro* par une hydrolyse enzymatique, ou pendant la fermentation par l'action des protéases produites par des bactéries lactiques (figure 03). Les hydrolysats des caséines et les peptides dérivés des CN ont montré plusieurs activités biologiques.

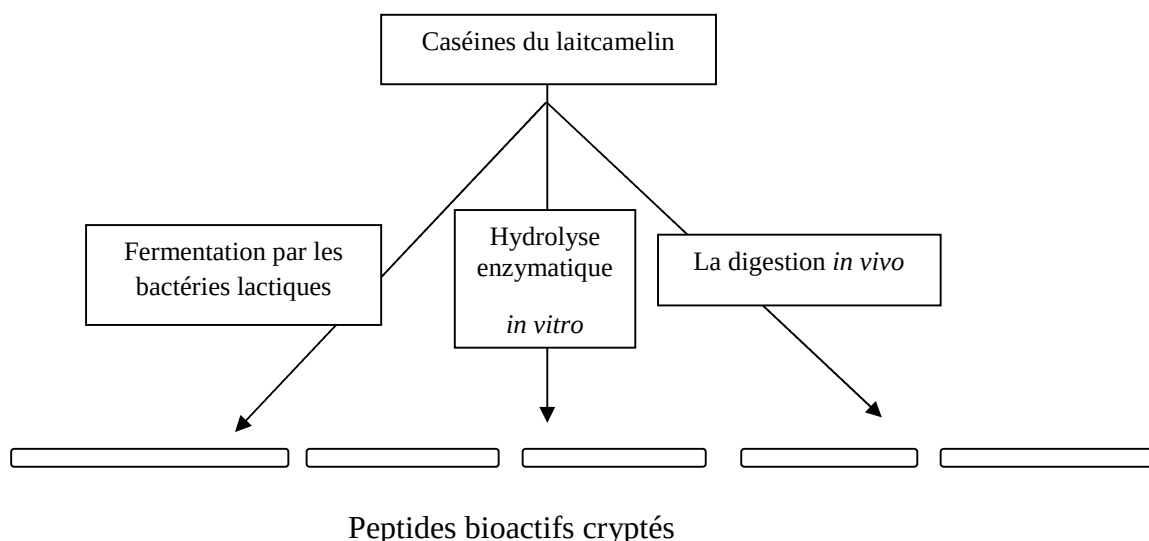


Figure 03 : Les différents mécanismes pour la libération des peptides bioactifs à partir des caséines (MOHANTY *et al*, 2015).

Les activités biologiques des peptides obtenus à partir des caséines camelines n'ont pas été largement étudiées jusqu'à présent. SALAMI *et al* (2008) ont rapporté que la caséine cameline est plus hydrolysée par rapport à la caséine bovine lors d'un traitement avec des enzymes pancréatiques. L'activité antimicrobienne, le piégeage des radicaux libres et l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I des caséines camelines ont également été étudiés par JRAD *et al* (2014), après hydrolyse par la pepsine et la pancréatine. La recherche sur des peptides bioactifs à base du lait a été focalisée jusqu'à présent sur les protéines du lait bovin et de moindre mesure sur les protéines du lait ovins et caprin.

2.2.1. Peptides à activité anti-hypertensive

De nombreux auteurs ont rapporté que des peptides inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine I peuvent être libérés *in vitro* à partir des protéines du lait par une enzyme protéolytique digestive (RICCI *et al*, 2010 ; ROUSSEAU-RALLIARD *et al*, 2011; QURESHI *et al*, 2013).

L'ACE est une carboxypeptidase peptidique qui catalyse la production de l'angiotensine II (peptide qui entraîne une vasoconstriction) et l'inactivation de la bradykinine (nonapeptide qui est un puissant vasodilatateur endothélium-dépendant), les molécules inhibant de manière significative son activité peuvent exercer une activité anti-hypertensive *in vivo*, mais il est clair qu'une inhibition significative de l'ACE *in vitro* ne justifie pas un effet anti-hypertenseur *in vivo* (HERNANDEZ-LEDESMA *et al*, 2011).

SALAMI *et al* (2010) ont rapporté que les peptides inhibiteurs de l'ACE ont été libérés à la suite des actions successives de la pepsine, ou de la chymotrypsine sur les caséines camelines totales.

JRAD *et al* (2014) ont mesuré *in vitro* l'inhibition de l'activité de l'ACE par les protéines du lait camelin, protéines de lactosérum de colostrum et les protéines de colostrum et l'hydrolysats de chaque groupe protéique. Les résultats ont montré que les protéines natives n'ont pas inhibé de manière significative l'activité de l'ACE. Cependant, l'inhibition par ces fractions protéiques a été renforcée après leur digestion enzymatique. 181 peptides présents dans les hydrolysats des protéines de colostrum camelin et qui présentent plus d'activité ont été identifiés par JRAD *et al* (2014), parmi ces peptides 25 présentent une homologie de séquence avec les fragments de caséines et possèdent différentes activités biologiques incluant l'activité anti-oxydante et l'inhibition de l'ACE, (Tableau VI).

2.2.2. Peptides à activité opioïde

Un opioïde est une substance opiacépsychotrope de synthèse ou peptidique dont les effets sont similaires à ceux de l'opium sans y être chimiquement apparentés. Les opioïdes exercent leurs effets par stimulation directe ou indirecte des récepteurs opiacés, qui sont surtout logés dans le système nerveux central et le parasympathique. Les récepteurs de ces organes servent de médiateurs à la fois aux effets bénéfiques et néfastes des opioïdes.

Les peptides opioïdes sont des ligands des récepteurs opioïdes issus *in vitro* par hydrolyse enzymatique de la β -caséine bovine et humaine (BTANTL, 1984) et également révélés être dans les systèmes endocrinien, nerveux et immunitaire ainsi que dans le tractus gastro-intestinal des mammifères. Ils interagissent avec leurs ligands endogènes et exogènes et/ou antagonistes des opiacés et peuvent influencer sur le système nerveux central ou périphérique, qui sont impliqués dans l'hypotension, le manque d'appétit, les fluctuations de la température corporelle et la modification des comportements sexuels (MOLINA *et* ABUMUAD, 1994; DZIUBA *et al*, 1999). Des peptides opioïdes agonistes endogènes peuvent réguler la croissance et la fonction des cellules impliquées dans le système nerveux central alors que les β -casomorphines sont transportées à travers les membranes muqueuses du nouveau-né qui régulent les réponses physiologiques et qui donnent comme résultats le calme et le sommeil chez le nourrisson (STURNERAND, 1988 ; CALVO *et al*, 2000). La β -casomorphine interagit aussi avec les récepteurs opiacés dans l'épithélium intestinal et joue un rôle crucial dans certaines activités comme la régulation du transport des électrolytes et la sécrétion d'insuline (TOME *et* DEBBABI, 1998).

Une protéine riche en proline (25% de la protéine totale) a été isolée à partir du lait camelin par R-HPLC (chromatographie liquide en phase inverse à haute performance). La séquence N-terminal d'acides aminés a montré qu'il est un fragment de la β -Caséine, un dérivé de clivage non trypsique de la protéine parente et homologue de la région C-terminal de la β -caséine d'autres espèces. La structure de la protéine a montré qu'elle ne contient pas moins de quatre régions caractérisées par une alternance de résidus proline. Cette structure est une des propriétés typiques de peptides à activité opioïde qui ont déjà été caractérisés de la fraction de protéose-peptone de la β -Caséine bovine (BEG *et al*, 1986) (tableauV).

Tableau V: Comparaison entre les segments contenant une alternance des résidus proline des fragments de la β -caséine et les structures des β -casomorphine et les peptides apparentés (BEG *et al*, 1986).

Peptides	Structure	Positions
Fragments de la β -caséine cameline	I P Q P V P Q	4-10
	L P V P Q Q M	28-34
	V P Y P Q R A	35-41
	E P V P O P V	52-58
β -casomorphine-7 (bovine)	Y P F P G P I	60-66
β -casomorphine-5(bovine)	Y P F P G	60-64
Morphiceptine (bovine)	Y P F P-NH ₂	60-63

2.2.3. Activité antimicrobienne

La présence d'activité antimicrobienne dans les caséines α_{s1} , α_{s2} bovines, ovines et caprines et dans leurs hydrolysats a été rapporté (ZUCHT *et al*, 1995 ; RECIO *et* VISSER, 1999; LÓPEZ-EXPÓSITO *et al*, 2006) et plusieurs peptides antimicrobiens ont été identifiés à partir des hydrolysats des caséines bovines, principalement isracidin et caseicin (LAHOV *et* REGELSON, 1996). SALAMI *et al* (2011) ont étudié l'activité antimicrobienne des protéines du petit-lait camelin et de leurs hydrolysats.

L'activité antimicrobienne des caséines camelines et de leurs hydrolysats a été étudiée pour la première fois par JRAD *et al* en 2014. Une étude qui a été faite sur les caséines camelines avant et après leur hydrolyse par la pepsine et la pancréatine, l'essai a été réalisé sur trois souches bactériennes Gram⁺ (*Listeria innocua*, *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus*) et deux souches bactériennes Gram⁻ (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*). Les résultats obtenus ont montré qu'en présence de 20g/l des CN natives, uniquement la croissance de *Escherichia coli* a été inhibé par contre en présence des CN-H la croissance de toutes les souches a été inhibée d'une façon significative sauf celle de *Pseudomonas aeruginosa* qui n'a pas été affectée.

2.2.4. Activités chaperons de la β -caséine cameline

Les molécules chaperons forment une famille de protéines censées évoluer vers la prévention de dépliement des protéines et de l'agrégation dans des conditions dénaturantes. Ceci est réalisé en grande partie grâce à leur fixation aux surfaces hydrophobes exposées de la dénaturation/dépliement des protéines (GUAGLIARDI *et al*, 1995). Les molécules chaperons

agissent non seulement en matière de protection et de correction de repliement des protéines repliées de façon inappropriée mais aussi jouent un rôle dans l'assemblage d'oligomères, repliement, le ciblage et la dégradation des protéines défectueuses et leurs formes indésirables (CARVER *et al*, 2002). Il a été proposé que les molécules chaperons forment plusieurs familles de protéines structurellement non apparentées (BHATTACHARYYA *et al*, 1999).

La β -CN possède à la fois un court domaine N-terminal hydrophile polaire et un long domaine C-terminal hydrophobe (ZHANG *et al*, 2005). Comme beaucoup d'autres chaperons la β -CN ne contient pas de résidus cystéinyl, mais a beaucoup de résidus proline (~15%), et il se forme spontanément des micelles analogues à des structures oligomériques (SWAISGOOD, 1993).

BARZEGAR *et al* (2008) ont étudié l'activité chaperon de la β -CN bovine et cameline en mesurant l'inhibition de l'agrégation à la chaleur de l'ADH (alcool déshydrogénase), les résultats ont montré clairement que l'activité chaperon augmente de façon exponentielle avec sa concentration et que l'activité de la β -CN bovine est 4 fois plus élevée que celle de β -CN cameline. La signification biologique de cette constatation peut être tout à fait relative avec les différences de composition et de structure entre les protéines du lait bovin et camelin.

2.2.5. Activité antioxydante

En conditions physiologiques, le dioxygène, élément indispensable à la vie, produit au niveau de la mitochondrie des espèces oxygénées réactives (EOR) particulièrement toxiques pour l'intégrité cellulaire. Ces EOR, dont font partie les radicaux libres ; qui peuvent être considérés comme des déchets du métabolisme cellulaire ; sont des atomes et des molécules dotés d'une forte énergie et qui avant d'être neutralisés détruisent ce qu'ils rencontrent. Ils sont produits dans toutes les cellules de l'organisme tout à fait normalement et en faible quantité dans les mitochondries. Il s'agit des ions oxygène, hydroxyde et de peroxyde d'hydrogène qui sont libérés lors des réactions biochimiques. Avant d'être neutralisés ils provoquent des lésions sur tous les éléments qu'ils côtoient.

L'organisme sait cependant se défendre contre eux grâce aux enzymes antioxydantes contenues dans nos cellules. Ces enzymes sont aidées dans leur action antiradicalaire par la vitamine E, C, provitamine A, le zinc et le sélénium. Si ces systèmes de défense sont débordés ou insuffisants, les radicaux libres ont tout le loisir d'être nuisibles : ils s'attaquent alors aux membranes cellulaires dont les acides gras insaturés sont dénaturés (leur structure est modifiée) ; ils agressent également les protéines, les microfibrilles de collagène, l'acide hyaluronique et l'ADN lui-même est transformé entraînant l'apparition d'une série

d'anomalie dont le risque de cancérisation. Lorsque les radicaux libres lèsent les acides gras insaturés on parle de lipidoperoxydation des membranes cellulaires. Cela déclenche alors une réaction en chaîne sur les divers acides gras du voisinage jusqu'à ce qu'ils soient neutralisés. En outre, il est bien connu que la peroxydation des lipides se produisant dans les produits alimentaires entraîne une détérioration de la qualité alimentaire, par exemple la saveur rance, goût inacceptable et le raccourcissement de la durée de vie.

Pour empêcher la détérioration des aliments et fournir une protection contre les maladies graves, il est important d'inhiber la peroxydation des lipides et la formation de radicaux libres se produisant dans le corps vivant et des denrées alimentaires. L'oxydation des lipides est inhibée par les agents antioxydants. Les antioxydants artificiels (l'hydroxyanisolebutylé (BHA), hydroxytoluènebutylé (BHT) et n-propylgallate) présentent une forte activité antioxydante contre plusieurs systèmes d'oxydation. Cependant, parce que les antioxydants artificiels présentent des risques potentiels *in vivo*, leur utilisation dans les denrées alimentaires est restreinte ou interdite dans certains pays. Antioxydants plus sûrs de source naturelle, principalement composés non protéiques à partir de plantes, ont été donc mis au point. Certaines protéines de certains aliments ont été ainsi rapportées pour avoir la capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène (OKADA *et al*, 1998) et plusieurs hydrolysats de protéines alimentaires se sont révélées présenter une activité antioxydante (SAIGA *et al*, 2003 ; DAVALOS *et al*, 2004).

Plusieurs peptides du lait jouent également un rôle régulateur dans les métabolismes oxydatifs. Les peptides antioxydant dérivés du lait sont composés de cinq à onze acides aminés hydrophobes, y compris proline, histidine, tyrosine ou tryptophane dans la séquence qui sont largement distribués dans les hydrolysats de caséines (KORHO *et al*, 2003). Ils peuvent fonctionner en piégeant ou en empêchant la formation des radicaux (CERVATO *et al*, 1999 ; WONG AND KITTTS, 2003). Les caséines ont un domaine polaire qui contient des résidus sérines phosphorylés et leur séquence caractéristique –SerP–SerP–SerP–Glu–Glu, sont des chélateurs efficaces de cations qui forment un complexe avec le calcium, le fer et le zinc. Par conséquent, les caséines phosphorylées et/ou leurs peptides dans la phase aqueuse peuvent être une source de chélateurs naturels pour contrôler l'oxydation des lipides dans les émulsions alimentaires.

Les propriétés antioxydantes de ces peptides sont liées à leur composition, la structure, l'hydrophobicité (CHEN *et al*, 1998), la position des résidus d'acides aminés (Chen *et al*, 1995) et le poids moléculaire (LI *et al*, 2008).

L'activité antioxydante des caséines issues du lait de chamelle et de leurs hydrolysats a été rapportée par plusieurs auteurs, La β -CN cameline a montré une activité antioxydante élevée après hydrolyse par la chymotrypsine (SALAMI *et al*, 2011). Comme la fraction de caséines du lait de chamelle est riche en β -CN, ce composant pourrait être la meilleure source de peptides antioxydants (JRAD *et al*, 2014). KUMAR *et al* (2016) ont montré que l'hydrolyse des caséines camelines par des protéases telles que l' α -chymotrypsine, papaïne et l'alcalase produit des hydrolysats avec une activité antioxydante beaucoup plus élevée que celle des caséines natives.

Tableau VI: Identification des peptides qui ont au moins sept résidus identique avec les peptides bioactifs connus dans l'hydrolysat des protéines de colostrum camelin par spectrométrie de masse (JRAD *et al*, 2014).

Source de la protéine cameline	Peptides camelins	Des peptides bioactifs homologues	Putative bioactive activité	Référence
β-Caséine	D ¹³⁰ LLENLHLPLPL ¹⁴⁰ L ¹²⁸ TDLLENLHLPLPL ¹⁴⁰ T ¹²⁹ DLENLHLPLP ¹³⁹ T ¹²⁹ DLENLHLPLPL ¹⁴⁰ T ¹²⁷ LTDLLENLHLPLPL ¹⁴⁰ S ¹⁶⁵ LSQFKLPVPQQMVYPYQRAMPV ¹⁸⁸ F ³⁴ KIEEQQTETEDEQQDK ⁴⁹ K ³⁵ IEEQQQTETEDEQQDK ⁴⁹ K ³⁵ IEEQQQTETEDEQQD ⁴⁸ K ³⁵ IEEQQQTETEDQ ⁴⁶ Q ⁴⁰ QTEDEQQDKIYT ⁵¹ Q ⁴⁰ QTEDEQQDKI ⁴⁹ S ⁶² HTEPIPYIPILPN ⁷⁵ S ⁶² HTEPIPYIPILPQ ⁷⁴ S ⁶² HTEPIPYPI ⁷¹ V ⁶⁰ YSHTEPIPYIPILPN ⁷⁵ V ⁶⁰ YSHTEPIPYIPILPQ ⁷⁴ Y ⁶¹ SHTEPIPYPI ⁷¹ L ⁴⁷ KDRNEPTEDH ⁵⁸	N ¹³⁰ LHLPLPLL ¹³⁸ (β-caséine bovine) S ¹⁶⁶ QSKVLVPVQ ¹⁷⁵ (bovine β-caséine) F ³³ QpSEEEQQTEDELQDK ⁴⁸ (β-caséine bovine) GWTHLEPGPYPI (human VIP; vasoactive intestinale peptide) DRNSNTLHLKDYNENRERH (Plasmodium falciparum EBA-175 protein)	L'inhibition de l'ACE Piégeage des radicaux libres Neuropeptide	ROBERT <i>et al.</i> (2014)
α _{s1} -Caséine	I ⁸³ VMPNPWDQGKTAYPFIPT ¹⁰¹ I ⁸³ VMPNPWDQGKT ⁹³ I ⁸³ VMPNPWDQG ⁹¹ Q ⁸⁰ GQIVMNPWDQGKT ⁹³	N ¹⁰⁷ PWDQ ¹¹¹ (α _{s2} -Caséine bovine)	Liaison au globules rouges Prévention des allergies alimentaires	RODRIGUEZ <i>et al.</i> (2000) TANABE <i>et al</i> 2006
κ-Caséine	I ⁹⁸ AIPPKKTDQKTVNPA ¹¹³ V ³¹ QSRYPSYGIN ⁴¹	M ¹⁰⁶ AIPPKKNQDK ¹¹⁶ (κ-Caséine bovine) Y ³⁵ PSYGLN ⁴¹ (κ-Caséine bovine)	Casoplatelin Antagoniste des opioïdes	JOELLES <i>et al.</i> (1986) CHIBA <i>et al.</i> (1989)



Partie expérimentale



Matériels et méthodes

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie de l'Université MOULOUD MAMMERI de TIZI-OUZOU.

1. Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Matériels

- Agitateurs;
- Bain-marie (MEMMERT, Allemagne) ;
- Balance de précision (0,01mg) (OHAUS, USA) et balance analytique (0,01g) ;
- Centrifugeuse (SIGMA, USA) ;
- Dessiccateur ;
- Lyophilisateur ;
- pH-mètre (METROHM, Suisse) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU, Japon) ;
- Unité d'électrophorèse sur mini-cuves verticales (HOEFFER SE 260, USA) comprenant : couleur de gel ; cuves d'électrophorèse ; générateur de courant (250V, 100mA) ; plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 12 cm) ; espaceurs de 1mm d'épaisseur.

1.2. Produits chimiques

- Solvants : éthanol, méthanol, eau distillée, glycérol, acide acétique, acide chlorhydrique (HCl), acide trichloracétique (TCA) ;
- Sels et tampons : Tris/HCl, phosphate monopotassique (KH_2PO_4), phosphate dissodique (Na_2HPO_4), chlorure de fer, ferricyanure de potassium ;
- Colorants et réactifs spécifiques : acrylamide, N,N'-méthylène bis-acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de coomassie R250, 2-β-mercaptoethanol, dodécyl sulfate de sodium (SDS), persulfate d'ammonium, N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine (TEMED), glycine, trishydroxyméthylaminométhane (Tris), 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH).

1.3. Matériel biologique

- Les caséines sont obtenues à partir du lait de chamelle de la région de Oued-Souf d'Algérie.
- Enzymes commerciales : chymotrypsine et trypsine.

1.2. Méthodes

1.2.1. Collecte du lait

Le lait est traité à partir de chèvres saines. Il est additionné aussitôt après la traite d'un antimicrobien (azide de sodium 0.002% p/v) et acheminé au laboratoire dans une glacière.

A l'arrivée, une mesure du pH est réalisée, la valeur du pH est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser.

1.2.2. Préparation d'échantillon

Les caséines et les protéines sériques caprines sont séparées à partir du lait entier suivant les étapes illustrées par la figure 04.

1.2.2.1. Ecrémage

L'écémage est réalisé par centrifugation du lait à 3500g pendant 20 min à 4°C. La centrifugation à basse température permet ainsi d'avoir une bonne prise en masse de cette matière grasse en surface. La crème qui apparaît en surface est écartée, alors que le lait écrémé est filtré sur la laine de verre.

1.2.2.2. Acidification

La séparation entre les types de protéines (caséines et les protéines sériques) est obtenue en menant le pH du lait caprin à 4,3 (WANGO *et al*, 1998) en présence d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 4N, ce qui permet d'atteindre le pH isoélectrique des caséines et ainsi leur précipitation complète après centrifugation à 3500g pendant 15 min. Cette opération est répétée deux fois afin d'assurer une meilleure qualité des séparations.

Le culot de centrifugation constitué de la fraction caséinique est récupéré dans un volume minimum d'eau distillée, ajusté au pH 7 avec une solution de NaOH 1N pour une meilleure solubilisation de ces protéines.

Quant au surnageant représente la totalité des protéines sériques.

1.2.2.3. Dialyse

Cette étape permet de débarrasser les échantillons des petites molécules. L'échantillon de caséines obtenu est dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 à 72 heures à +4°C, sous agitation douce et en utilisant des membranes de dialyse avec un changement de l'eau de contre dialyse.

1.2.2.4. Lyophilisation

Après dialyse, la solution de caséines obtenue est étalée en fines couches dans des coupelles, congelée à -18°C , puis lyophilisée. Les protéines sont ainsi récupérées sous forme de poudre et conservées dans un dessiccateur.

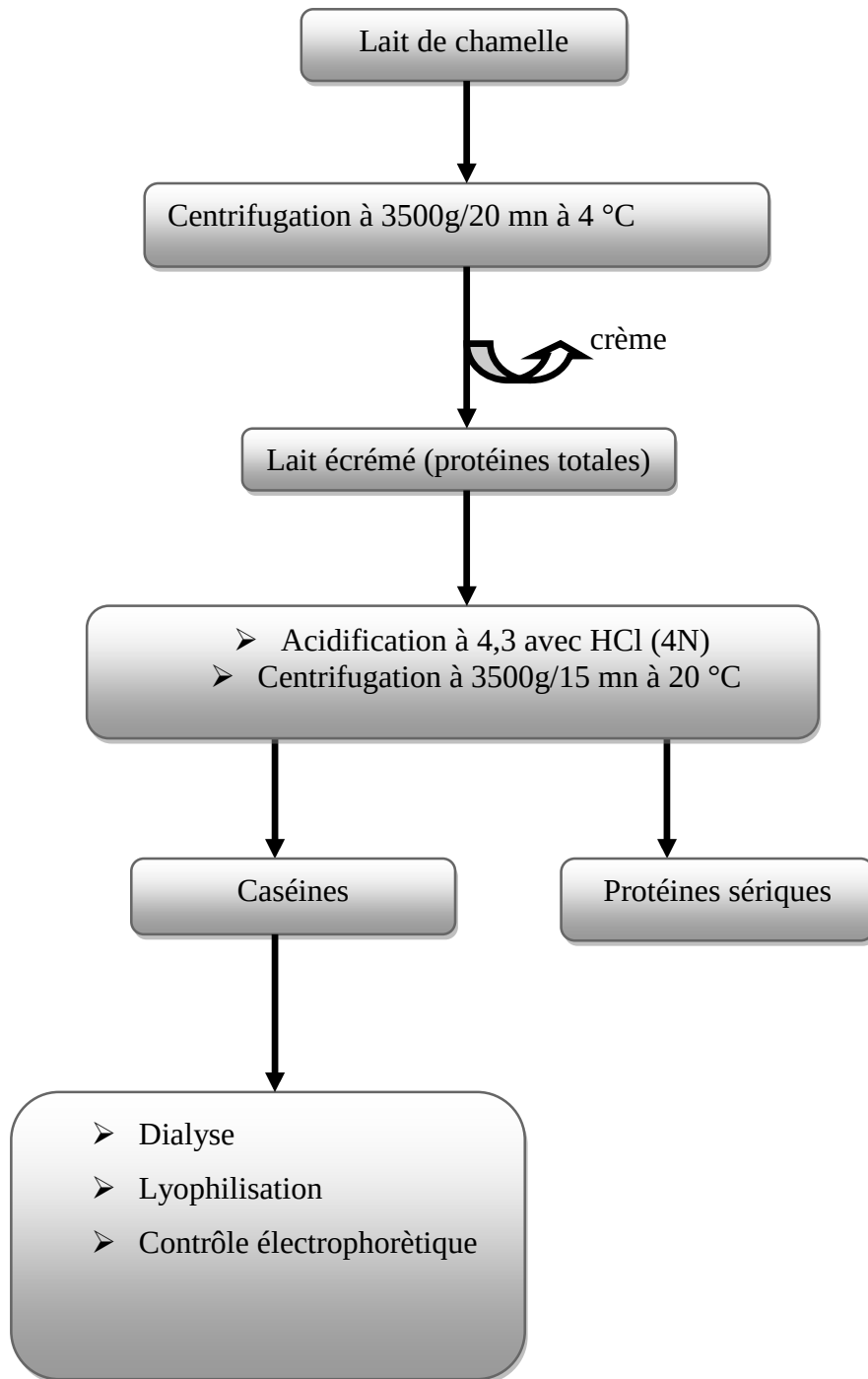


Figure 04: Etapes d'isolement des caséines et des protéines sériques à partir du lait camelin.

1.2.3. Hydrolyse enzymatique des caséines

L'hydrolyse enzymatique a été effectuée en utilisant deux enzymes : la trypsine et la chymotrypsine.

Deux solutions de caséines ont été préparées à 25mg/ml du tampon phosphate 50mM, pH=7,8 (annexe 01) ; chaque enzyme a été rajouté avec un ratio (E/S) = 2%. Les mélanges ont été incubés pendant 4 heures à 37°C. En fin d'incubation, faire chauffer les mélanges au bain-marie à 100°C pendant 5minutes pour arrêter la réaction. Après refroidissement, les échantillons ont été lyophilisés.

1.2.4. Contrôle électrophorétique

1.2.4.1. Définition et principe général

L'électrophorèse est une méthode d'analyse basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Les protéines du fait de leur caractère amphotère peuvent se comporter comme des anions ou des cations et se déplacer de ce fait soit vers l'anode ou la cathode ; selon leurs caractéristiques physico-chimiques, elles se matérialiseront sur l'électrophorègramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

1.2.4.2. Electrophorèse en milieu dissociant et dénaturant, en présence de dodécyl sulfate de sodium et de 2-β-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

1.2.4.2.1. Principe

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

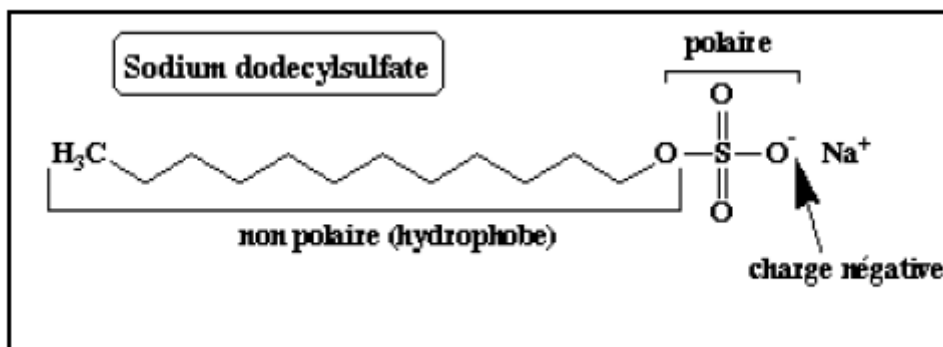


Figure 05: Structure de SDS

1.2.4.2.2. Conditions expérimentales

La PAGE-SDS utilise un système de tampons discontinus, comprenant deux gels dont un gel de concentration (T=4,8% et C=2,7%) et un gel de séparation (T=17% et C=2,7%). Le tampon d'électrode est composé du Tris, glycine et SDS 1%, pH 8.

Le premier gel faiblement réticulé n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines et tend plutôt à les concentrer en les mettant sous forme de fines bandes qui arrivent au gel de séparation au même temps. La séparation a lieu au cours de la migration dans le deuxième gel.

1.2.4.2.3. Préparation des échantillons

Dissoudre 2mg de chaque échantillon (caséines totales, hydrolysats tryptiques, hydrolysats chymotryptiques) dans 1ml de tampon d'échantillon, chauffage à 100°C pendant 5 minutes puis refroidir dans un bain d'eau froide.

1.2.4.2.4. Conduite électrophorétique

Les différentes solutions utilisées dans la préparation de la PAGE-SDS sont représentées dans l'annexe 02.



Figure 06 : Photographie de l'unité d'électrophorèse après montage et dépôt des échantillons.

1.2.5. Propriétés antioxydantes des caséines camelines et de leurs hydrolysats

L'activité antioxydante des caséines et de leurs hydrolysats a été mesurée en utilisant deux tests : le pouvoir réducteur et le piégeage du radical libre, 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH).

1.2.5.1. Le pouvoir réducteur

➤ Principe

La détermination du pouvoir réducteur des caséines et de leur hydrolysats a été réalisée suivant la méthode de OYAIKU (1988).

L'évaluation est basée sur la réaction de réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en fer ferreux (Fe^{+2}). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe^{+3}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{+2}) et l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm. Plus l'absorbance augmente plus le pouvoir réducteur du composé est élevé.

➤ Préparation des échantillons

Trois solutions ; caséines totales, hydrolysats trypsique, hydrolysats chymotrypsique ; ont été préparées à une concentration de 2 mg/ml.

➤ **Dosage**

2 ml de chaque échantillon ont été mélangé avec 2 ml de tampon phosphate 0,06M, pH=6,6 et 2 ml de ferricyanure de potassium à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, 2 ml de TCA 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. Un volume de 2 ml de chaque mélange a été mélangé avec 2 ml d'eau distillée et 0,4 ml de chlorure de fer (FeCl₃) à 0,1%. Après 10 minutes de réaction, la lecture de l'absorbance du milieu réactionnel a été faite à 700 nm contre un blanc (en remplaçant l'échantillon par de l'eau distillée) qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des échantillons testés.

Pour chaque échantillon trois essais ont été effectués ; les solutions utilisées sont représentées dans l'annexe 03.

1.2.5.2. Test du DPPH

➤ **1.2.5.2.1. Principe**

L'activité du piégeage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole décrit par ZHU *et al* (2008). DPPH est une abréviation commune pour un composé chimique organique 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. C'est une poudre cristalline de couleur sombre composée de molécules de radical libre stables. En solution dans le méthanol, il est caractérisé par une couleur violette ; en présence d'un donneur d'hydrogène (AH) il est réduit à la forme non radicalaire 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune pâle (figure 06), cette propriété permet donc le contrôle visuel de la réaction. Ce passage de la première forme à la deuxième est accompagné d'une diminution de l'absorbance et libération du radical A°. Le DPPH présente un maximum d'absorption dans le visible qui se situe vers 515-517 nm dans le méthanol et l'éthanol.

Donc la réduction du radical libre DPPH° par un antioxydant peut être suivie par spectrométrie UV-Visible à 517 nm.

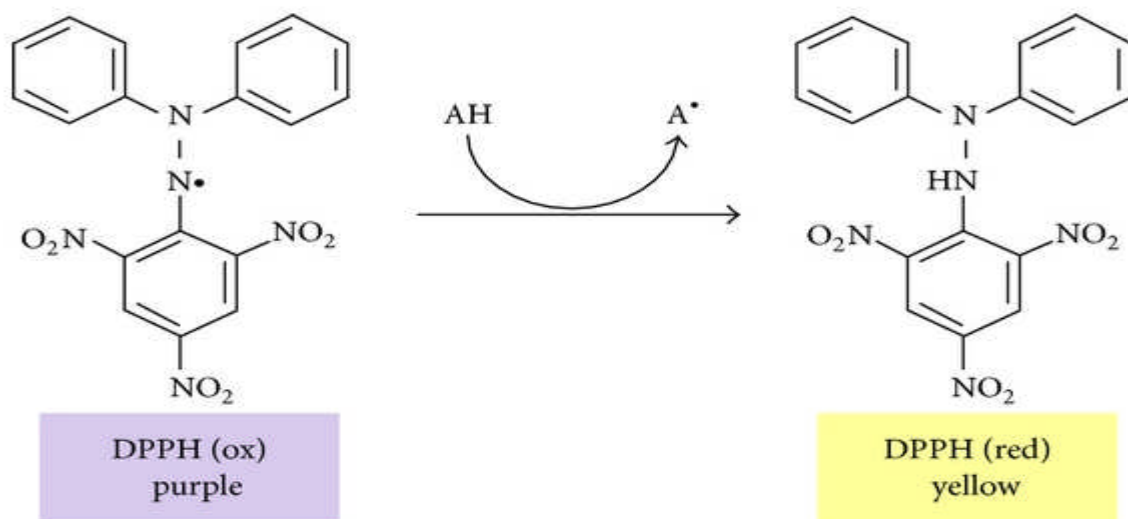


Figure 07 : Structure du DPPH et sa réduction par l'antioxydant (AH)

➤ 1.2.5.2.2. Préparation des échantillons

Trois solutions ; caséines totales, hydrolysats trypsique, hydrolysats chymotrypsique ; ont été préparées à une concentration de 0,1 mg/ml.

➤ Dosage

2ml de la solution du DPPH 0,042 mM ont été ajoutées à 2 ml de chaque échantillon. Le mélange est vortexé puis est incubé à l'obscurité à température ambiante pendant 24 heures. La lecture de l'absorbance a été faite à 517nm contre un blanc correspondant à la solution du DPPH. Les résultats sont exprimés en tant qu'activité anti-radicalaire ou l'inhibition des radicaux libres en pourcentages (I %) en utilisant la formule suivante:

$$I \% = [(A_B - A_E) / A_B] \times 100\%$$

I %: pourcentage d'inhibition ; A_B : absorbance du blanc ; A_E : absorbance de l'échantillon.

De même, pour chaque échantillon trois essais ont été effectués.

Résultats et discussion

2. Résultats et discussion

2.1. Résultats du contrôle électrophorétique

Le résultat du contrôle électrophorétique réalisé pour les caséines totales et leurs hydrolysats est représenté dans la figure08.

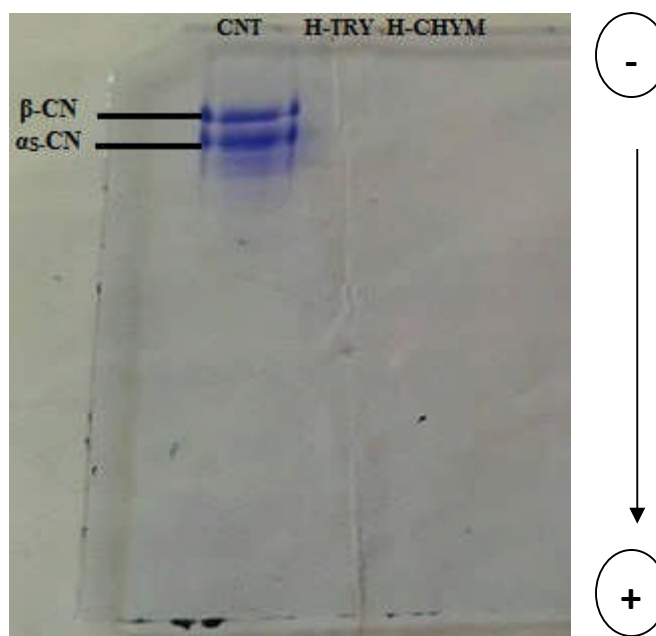


Figure 08 : Profil électrophorétique des caséines camelines totales et de leurs hydrolysats trypsique et chymotrypsique en PAGE-SDS ; CNT : caséines totales ; H-TRY : hydrolysats trypsique ; CHYM : hydrolysats chymotrypsique ; β -CN : β -caséine ; H- α_s -CN : caséines α_s

Dans le premier puits qui correspond aux caséines totales on observe l'apparition de deux bandes, la première représente la β -CN et la deuxième les α_s -CN.

Concernant les deux autres puits contenant respectivement les H-TRY et les H-CHYM aucune bande n'a été révélée ceci est expliqué par l'hydrolyse totale des caséines camelines qui génère des peptides de faible poids moléculaire qui sortent du gel utilisé (17%).

2.2. Activité antioxydante

2.2.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été évalué pour déterminer la capacité d'un échantillon à céder des électrons ou des protons, qui a été rapporté comme étant en corrélation directe avec le clivage des peptides (CUMBY *et al*, 2008) et par conséquent, les activités antioxydantes des hydrolysats sont améliorées. Dans la présente étude, le pouvoir réducteur a été exprimé comme la capacité à réduire Fe^{+3} présent dans le complexe ferricyanure de potassium en Fe^{+2} .

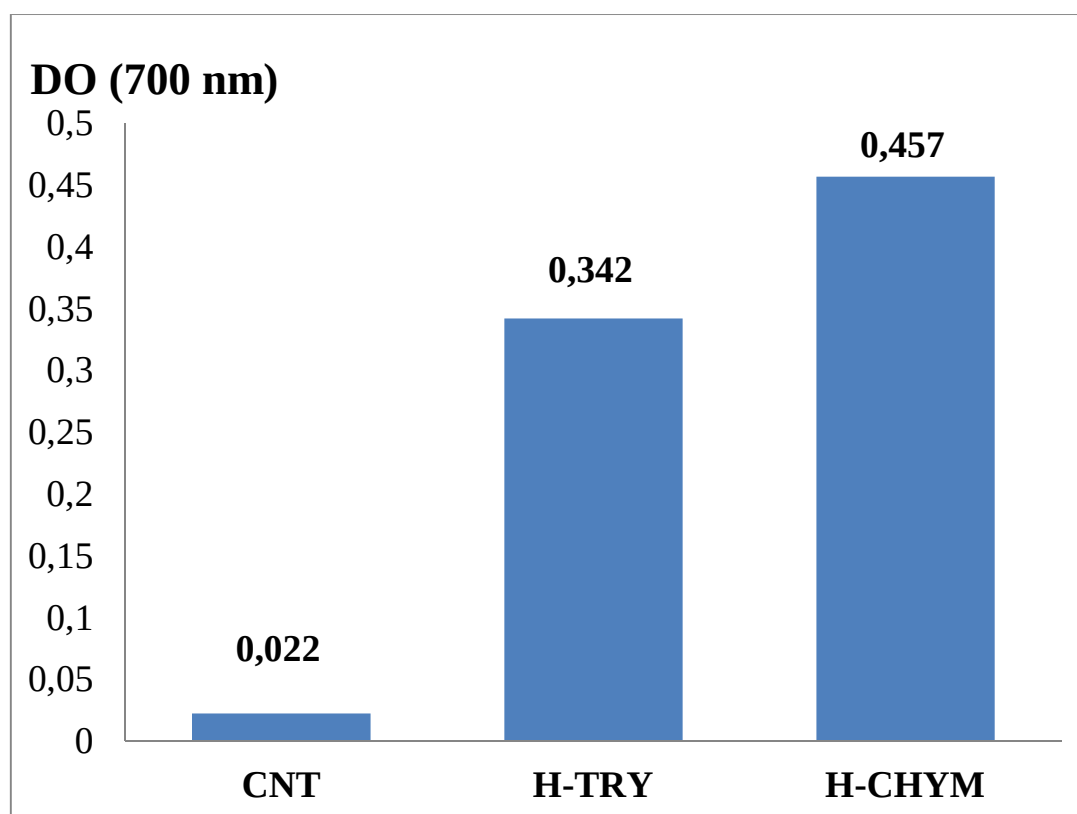


Figure 09 : Pouvoir réducteur des caséines camelines avant et après hydrolyse par la trypsine (H-TRY) et la chymotrypsine (H-CHYM).

Comme montré dans la figure 09, les hydrolysats de caséines camelines exercent un pouvoir réducteur nettement plus important que celui des caséines natives.

L'augmentation du pouvoir réducteur après hydrolyse a suggéré que ce processus a contribué à l'activité antioxydante par la génération de peptides préalablement inactifs cryptés dans la séquence des caséines natives (KUMAR *et al*, 2016).

Les travaux précédents ont aussi suggéré que les peptides de petite taille libérés par les enzymes protéolytiques exercent un pouvoir réducteur plus élevé que les fractions de haut poids moléculaire (BOUGATEF *et al*, 2009 ; AJIBOLA *et al*, 2011).

Comparativement aux hydrolysats tryptiques, les peptides issus de l'hydrolyse des caséines camelines par la chymotrypsine ont montré une capacité de réduction du fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) plus haute (figure 09), ce qui est en accord avec les travaux de SALAMI *et al*. (2008, 2011) qui a montré que les CN dans les deux espèces (bovine et cameline) ont plus de sites de clivages pour la chymotrypsine que pour la trypsine (considérant les structures primaires) et que les peptides générés par la chymotrypsine ont plus d'activité antioxydante que ceux issus de l'hydrolyse tryptique.

2.2.2. Piégeage du radical libre DPPH

Les résultats d'inhibition du DPPH par les caséines camelines et leurs hydrolysats tryptique et chymotrypsique sont représentés dans la figure 10.

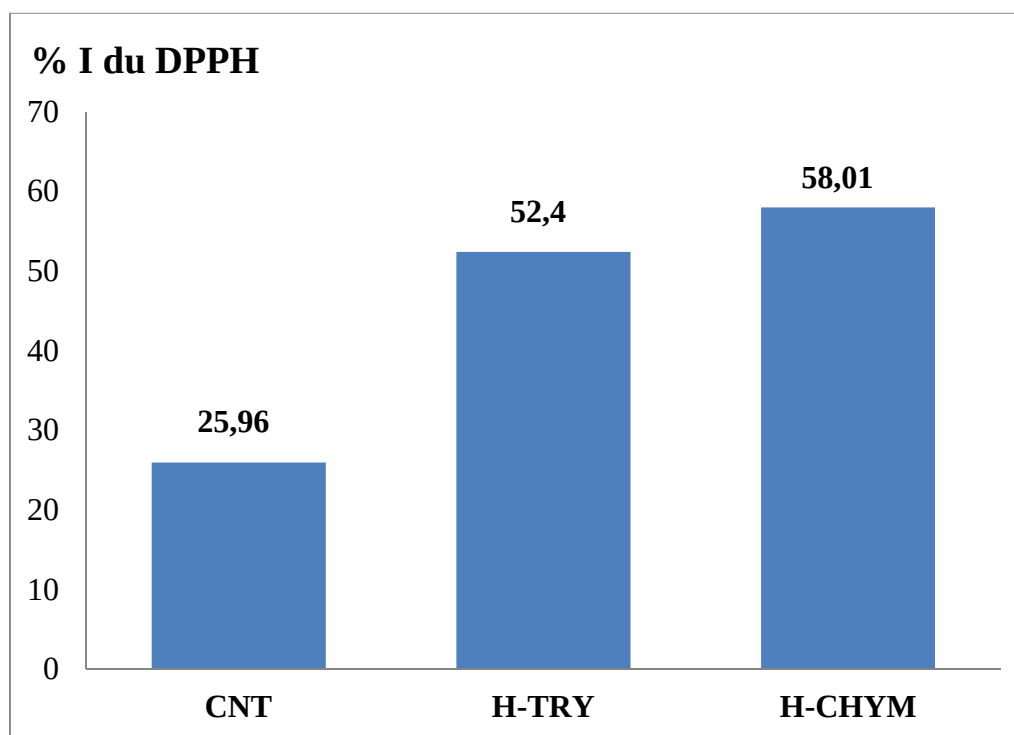


Figure 10: Pourcentage d'inhibition du DPPH par les caséines camelines et de leurs hydrolysats tryptique (H-TRY) et chymotrypsique (H-CHYM).

L'activité anti-radicalaire des caséines camelines augmente significativement après hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par KUMAR *et al* (2016) qui ont montré que l'hydrolyse des caséines camelines par des

protéases comme l' α -chymotrypsine, papaine et l'alcalase produit des hydrolysats avec une activité antioxydante beaucoup plus élevée que celle des caséines natives.

A partir de cette observation on peut suggérer que les caséines natives et leurs hydrolysats contiennent des substances agissant en tant que donneur d'électrons qui pourraient réagir avec les radicaux libres et les transformer en molécules plus stables. L'augmentation de cette activité après hydrolyse est expliquée par la libération de peptides exposant plus de fonctions intervenant dans la réaction antioxydante.

Il est maintenant bien connu que la β -caséine bovine produit des peptides anti-radicalaire durant la digestion gastro-intestinal ou la fermentation (KANSCI *et al*, 2004). Comme la fraction de caséines du lait camelin est riche en β -caséine (65% du total des caséines), ce composant peut être la meilleure source de peptides antioxydants (JRAD *et al*, 2014). La β -caséine cameline a montré une activité antioxydante élevée après hydrolyse avec la chymotrypsine (SALAMI *et al*, 2011). La β -caséine cameline comprend 8 résidus de Phe, un acide aminé aromatique avec un grand pouvoir anti-radicalaire, tandis que β -caséine bovine Contient 5 résidus Phe et peut être une explication de l'activité antioxydante potentielle des caséines camelines. TSOPMO *et al* (2011) ont rapporté que la présence de résidus aromatiques confère une grande activité de piégeage de radicaux libres aux peptides synthétiques, le plus efficace des résidus est Trp.

L'activité antioxydante des peptides a été attribuée à certaines séquences d'acides aminés (SUETSUNA *et al*, 2000), ainsi qu'à la présence de liaisons peptidiques ou à l'arrangement structural (HEHNANDEZ-LEDESMA *et al*, 2007). L'hydrophobicité des peptides semble également être un facteur important pour leur activité antioxydante due à une accessibilité accrue aux cibles hydrophobes (CHEN *et al*, 1998). Par conséquent, un autre facteur doit être pris en compte pour expliquer l'activité anti-radicalaire des caséines camelines qui est leurs domaines polaires contenant des résidus sérine phosphorylés. Ces caséines phosphorylées et leurs phosphopeptides (appelées CPPs) ont montré une propriété antioxydante directe envers les radicaux libres (KITTS, 2005).

Conclusion

Le lait de chamelle a développé une grande réputation comme une alimentation saine avec une grande valeur thérapeutique attribuée à ses propriétés biologiques telles que l'activité antioxydante. Dans cette étude, l'amélioration de cette activité des caséines camelines a été dévoilée après hydrolyse *in vitro* par la chymotrypsine et la trypsine qui a été mesurée en utilisant deux tests : le pouvoir réducteur et le piégeage du radical libre, DPPH.

Comparativement aux caséines natives, les hydrolysats exercent un pouvoir réducteur nettement plus important où on a enregistré des DO à 700 nm de 0,022 pour les CNT, 0,342 pour les H-TRY et 0,457 pour les H-CHYM. L'activité anti-radicalaire des caséines camelines augmente significativement après hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine, les pourcentages d'inhibition obtenus sont : 25,96% pour CNT, 52,4% pour les H-TRY et 58,01% pour les H-CHYM.

Ces résultats préliminaires ont montré la génération de peptides anti-oxydants à partir des caséines camelines. Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires pour identifier ces peptides et étudier la possibilité du système gastro-intestinal de les générer *in vivo*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ABU-LEHIA I.H. (1989). Physical and chemical characteristics of camel milk fat and its fractions. Food Chem, 34.

AL-ALAWI A.A. et LALEYE L.C. (2011). Characterization of camel milk protein isolates as nutraceutical and functional ingredients. Collaborative Research Project Sultan Qaboos University United Arab Emirates University.

AL HAJ O.A. et AL KANHAL H.A. (2010). Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk – review. International Dairy Journal xxx.

AL-SALEH A.A. (1996). Heat coagulation of camel milk. Journal of King Saud university, Agriculture Science, 8 (1).

AMIOT J., FOURNIER F., LEBEUF Y., PAQUIN P. et SIMPSON R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et technique d'analyse du lait. In Science et technologie du lait : transformation du lait. Presses internationales Polytechnique, Montréal.

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

BARZEGAR A., YOUSFI R., SHARIFZADEH A., DALGALARRONDO M., CHOBERT J.M., GANJALI M.R., NOUROUZI P., EHSANI M.R., NIASI-NASLAJI A., SABOURY A.A., HAERTLE T. et MOOSAVI-MOVAHEDI A.A. (2008). Chaperone activities of bovine and camel β -casein : Importance of their surface hydrophobicity in protection against alcohol dehydrogenase aggregation. International Journal of Biological Macromolecules 42 (2008).

BEG O.U., BAHR-LINDSTOM H., ZAIDI Z.H et JORNVALL H. (1986). Characterisation of a camel milk protein rich in proline identifies a new β -casein fragment. Regulatory Peptides, 15 (1986).

BOUDJENAH H.S. (2012). Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillottes de dromadaires. Thèse de doctorat en sciences biologiques (option biochimie). Université Mouloud Mammeri de TiziOuzou (Algérie).

CAYOT P. et LORIENT D. (1998). Structures et Technofonctions des protéines du lait. Technique & Documentation, Lavoisier, Paris.

EIGEL W.N., BUTTER J.E., ERNSTROM C.A., FARRELL J.R., HARWALKAR V.R., JENNESS R. et MC WHITNEY L. R. (1984). Nomenclature of proteins of cow's milk ; fifty revision. J. Dairy Science, 67.

EL-AGAMY E. I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. Food Chemistry, 68.

- EL-AGAMY E.I., RUPPANNER R., ISMAIL A., CHAMPAGNE C.P. et ASSAF R. (1996).** Purification and characterization of Lactoferrin, Lactoperoxydase, Lysozyme and Immunoglobulins from camel's milk. *Int. Dairy J.*, 6.
- EL-HATMI H., GIRARDET J. M., GAILLARD J. L., YAHYAOUÏ M. H. et ATTIA H. (2007).** Characterization of whey proteins of camel (*Camelus dromedarius*) milk and colostrums. *Small Ruminant Research*, 70.
- FARAH Z. (1986).** Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, 41(12).
- FARAH Z. (1996).** Camel Milk Properties and Products. Swiss Centre for Development Cooperation in Technology and Management, SKAT, Switzerland.
- FARAH Z. (2004).** Milk. In Z. Farah, A. Fisher (Eds), *Milk and meat from the camel. Handbook on products and processing*. Zurich. Switzerland. Swiss Federal Institute of Technology.
- FARAH Z. (2011).** Camel milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, 3.
- FARAH Z. et ATKINS D. (1992).** Heat coagulation of camel milk. *Journal of Dairy Research*, 59.
- FARAH Z., MOLLET M., YOUNAN M. et DAHIR R. (2007).** Camel dairy in Somalia: Limiting factors and development potential. *Journal of Livestock Science* 110.
- FARAH Z., RETTENMAIER R. et ATKINS D. (1992).** Vitamin content of camel milk. *International Journal of Vitamins and Nutrition Research* (62).
- FARAH Z. et RÜEGG M.W. (1989).** The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8.
- FARAH Z. et RÜEGG M.W. (1991).** The creaming properties and size distribution of fat globules in camel milk. *J. Dairy Sci.*, 74.
- FARAH Z., STREIFF T. et BACHMANN M. R. (1989).** Manufacture and characterization of camel milk butter. *Milchwissenschaft*, 44(7).
- HADDADIN M.S.Y., GAMMOH S.I. et ROBINSON R.K. (2008).** Seasonal variations in the chemical composition of camel milk in Jordan. *Journal of Dairy Research* 75 (1).
- JRAD Z., EL-HATMI H., ADT I., GIRARDET J.M., ÇAKIR-KIEFER C., JARDIN J., DEGRAEVE P., KHORCHANI T. et OULAHAL N. (2014).** Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrums and milk proteins. *Dairy Science and Technology*, 94.
- JRAD Z., GIRARDET J.M., ADT I., OULAHAL N., DEGRAEVE P., KHORCHANI T. et EL-HATMI H. (2014).** Antioxidant activity of camel milk casein before and after in vitro simulated enzymatic digestion. Antioxidant activity of camel milk casein, *Mljekarstvo* 64.

KAMOUN M. (1990). La production de fromage à partir du lait de dromadaire. CIHEAMIAMM. Options méditerranéennes. Séries séminaires n°12.

KAMOUN M. (1995). Le lait de dromadaire: production, aspects qualitatifs et aptitude à la transformation. CIHEAM-IAMM. Options méditerranéennes, Séries séminaires. n°13.

KAPPELER S. (1998). Compositional and structural analysis of camel milk proteins with emphasis on protective proteins. Doctorat Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse.

KAPPELER SS., FARAH Z. et PUHAN Z. (1998). Sequence Analysis of *Camelusdromedarius* milk caseins. J. Dairy Res., 65, p. 206-222.

KAPPELER S., FARAH Z., et 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.

KAPPELER S., HENBERGER C., FARAH Z. et PUHAN Z. (2004). Expression of the peptidoglycan recognition protein, PGRP, in the lactating mammary gland. Journal of Dairy Science, 87(8).

KAPPELER S., MANFRED A., FARAH Z. et PUHAN Z. (1999). Sequence analysis of camel milk (*Camelusdromedarius*) lactoferrin. Int. Dairy J., 9.

KHASKHELI M., ARAIN M. A., CHAUDHRY S., SOOMRO A. H. et QURESHI T. A. (2005). Physico-chemical quality of camel milk. Journal of Agriculture and Social Sciences, (2).

KHAN B. et IQBAL A. (2001). Production and composition of camel milk: review. Pakistani Journal of Agriculture Science, 38.

KHEROUATOU N. NASRI M. et ATTIA H. (2003). A study of the dromedary milk casein micelle and its changes during acidification. Brazilian Journal of Food Technology: 6.

KONUSPAYEVA G., FAYE B. et LOISEAU G. (2009). The composition of camel milk: A meta-analysis of the literature data. Journal of Food Composition and Analysis 22.

KUMAR D., KUMAR CHATH M., SINGH R., MEHTA N et KUMAR P. (2016). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. Dairy Science and Technologie, January 2016.

LALLEY, L. C., JOBE B. et WASESA A. A. H. (2008). Comparative Study on Heat Stability and Functionality of Camel and Cow's Milk Whey Proteins. J. Dairy Sci. 91.

LORENZEN P.C., WERNERY R., JOHNSON B., JOSE S., et WERNERY U. (2011). Evaluation of indigenous enzyme activities in raw and pasteurised camel milk. Small Ruminant Research, 97.

LORIENT D., CLOSS B. et COURTAUDON. (1991). Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et des dérivés. Laits, 71.

- Mal G. et Pathak K.M.L. (2010).** Camel milk and milk products. Milk & milk products. SMVS' Dairy Year Book.
- MAZURIER, J. et SPIK G. (1980).**Comparative study of the iron binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 629.
- MEHAIA M.A. (2006).** Manufacture of fresh soft white cheese (Domiat-Type) from dromedary camels' milk using ultrafiltration process. *Journal of Food Technology*. N°4.(3).
- MEHAIA M.A. (1995).** The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwisens chaft*, 50.
- MEHAIA M. A., HABLAS M. A., ABDEL-RAHMAN K. M. et EL-MOUGY S. A. (1995).**Milk composition of Majaheim, Wadah and Hamra camels in Saudi Arabia. *Food Chemistry*, 52.
- MOHAMED A. (1993).**Characterization of camel milk β -casein. Ph.D. Thesis. University of Karachi, Pakistan.
- MOHANTY D.P., MOHAPATRA S., MISRA S. et SAHU P.S. (2015).** Milk derived bioactives peptides and their impact on human health. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2015) xxx.
- PIHLANTO A. (2006).** Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* 16 (2006).
- RAMET J.P. (1994).** Les aspects scientifiques et technologiques particuliers de la fabrication de fromage au lait de dromadaire. Actes du Colloque : "Dromadaires et chameaux animaux laitiers", 24-26-octobre, Nouakchott, Mauritanie.
- SALAMI M., YOUSEFI R., EHSANI M. R., DALGALARRONDO M., CHOBERT J.M., HAERTLE T., RAZAVI S. H., SABOURY A. A., NIASARI-NASLAJI A. et MOOSAVI-MOVAHEDI A. A. (2008).** Kinetic characterization of hydrolysis of camel and bovine milk proteins by pancreatic enzymes. *International Dairy Journal* 18.
- SAWAYA W.N., KHALIL J.K., AL-SHALHAT A.F. et AL-MOHAMMED H. (1984).** Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *Journal of Food Science*, 49.
- STAHL T., SALLMANN H. P., DUEHLMEIER R. et WERNERY U. (2006).**Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrums. *Journal of Camel Practice and Research*, 13.
- SWAISGOOG H.E. (1982).** Chemistry of milk protein inducing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97.
- TAYEFI-NASRABADI H., HOSSEINPOUR-FEIZI M.A. et MOHASSELI M. (2011a).**Thermodynamic analysis of lactoperoxidase activity in camel milk. *International Conference on Life Science and Technology.IPCBEE*, 3.

TAYEFI-NASRABADI H., HOSEINPOUR-FAYZI M. A. et MOHASSELI M. (2011b). Effect of heat treatment on lactoperoxidase activity in camel milk: A comparison with bovine lactoperoxidase. *Small Ruminant Research* , 99.

YAGIL R. (1982). Camels and camel milk. In *Animal production and health paper n° 26*. P. 1-69. Publication FAO. Rome.

YAGIL R. et ETZION Z. (1980). Effect of drought conditions on the quality of camel milk. *J. Dairy. Res.*, 47.

YOUNG W. et PARK PH.D. (2009). Bioactive components in milk and dairy products. Wiley-Blackwell.

.

ANNEXES

Annexes

Annexe 01 : Préparation du tampon phosphate 50 mM

Phosphate monopotassique (KH_2PO_4) 136,09 g/l

Phosphate dissodique (Na_2HPO_4) 141,96 g/l

Ajuster à pH 7,8 avec NaOH

Annexe 02 : PAGE-SDS des caséines camelines et de leurs hydrolysats

Solution d'acrylamide (A)

Acrylamide 36 g

Bisacrylamide 1 g

Eau distillée 100 ml

Tampon de gel de séparation (S)

Tris 9,25 g

Eau distillée 50 ml

Ajuster à pH 8,8 avec du HCl 4N

Tampon de gel de concentration (C)

Tris 3 g

Eau distillée 50 ml

Ajuster à pH 6,8 avec du HCl 4N

Tampon d'électrode

Tris 1,2 g

Glycine 5,76 g

SDS 0,2 g

Eau distillée 200 ml

Tampon d'échantillon

Solution (C) 500 µl

Eau distillée 250 µl

SDS (10%) 250 µl

2-β-mercaptoéthanol 50 µl

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

Chauffage à 100°C/4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines du bleu de bromophénol

Solution de fixation

TCA12 g

Eau distillée100 ml

Solution de coloration

Bleu de coomassie R2500,5 g

TCA 4 g

Méthanol..... 100 ml

Eau distillée 100 ml

Solution de décoloration

Acide acétique 37,5 ml

Eau distillée 312,5 ml

Méthanol..... 150 ml

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium 0,1 g

Eau distillée 1 ml

Conduite d'électrophorèse

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

Solution (A)..... 4,6 ml

Solution (S) 2,51 ml

Eau distillée 2,73 ml

Dégazer pendant 2 mn maximum

SDS 10% 100 µl

TEMED 13 µl

Persulfate d'ammonium 10% 75 µl

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

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

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

Solution (C) 2,5 ml

Eau distillée 5,8 ml

Dégazer quelques secondes

SDS 10% 100 µl

TEMED 20 µl

Persulfate d'ammonium 10% 10 µl

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

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 25 V

Fixation : 45 minutes dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 03 : Préparation des solutions pour le pouvoir réducteur

Tampon phosphate 0,06 M, pH = 6,6

Phosphate monopotassique 9,073 g/l

Phosphate dissodique 11,87 g/l

TCA10%

Ferricyanure de potassium 1%

Chlorure de fer 0,1%

Annexe 04 : Préparation de la solution du DPPH 0,042 mM

DPPH 394,32 g/mol

Ethanol 70%