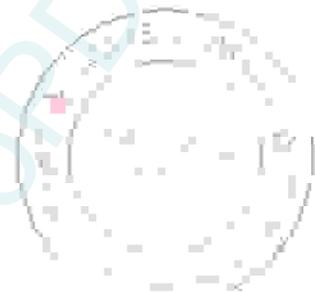


وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



NA/2014

Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire: Immunologie approfondie

570.283

**Thème : Utilisation des anticorps du lait de chamelle
dans la thérapie des maladies infectieuses**

Présenté par : BANTSIMBA Ntadi Chrislain

DJEBALI Sabrina

MWEZE Tshokola

Devant le jury composé de :

President : Mr. BENOURETH DJAMEL EDDINE. (Pr)

Examineurs : Mme. BRAIK ASMA (M.A.B.)

Mme. BOUCENANE HANANE NADIA (M.A.A)

Encadreur : Mme. BEDIOUTI SORAYA (M.A.A)

Université 08 mai 1945 Guelma

Juin 2012

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE
L'UNIVERS
DEPARTEMENT DE SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire; Immunologie approfondie

**Thème : Utilisation des anticorps du lait de chamelle
dans la thérapie des maladies infectieuses**

Présenté par : BANTSIMBA Ntadi Chrislain

DJEBALI Sabrina

MWEZE Tshokola

Devant le jury composé de :

President	: Mr. BENOUARETH DJAMEL EDDINE. (Pr)	Université 08 mai 1945 Guelma
Examineurs	: Mme. BRAIK ASMA (M.A.B.)	Université 08 mai 1945 Guelma
	Mme. BOUCENANE HANANE NADIA (M.A.A)	Université 08 mai 1945 Guelma
Encadreur	: Mme. BEDIQUI SORAYA (MA.A)	Université 08 mai 1945 Guelma

Juin 2012

DEDICACES

C'est avec un immense plaisir que je consacre ce travail, ayant abouti, malgré diverses péripéties à tous les êtres qui me sont chers.

En particulier à :

Mon très cher père, qui par son austerité a créé au fond de moi une force intérieure dans laquelle je puise toute mon énergie me permettant de braver les échelons.

Ma très chère mère, qui par son optimisme m'a permis de comprendre que l'on peut aller au bout de nos projets si on y mettait du cœur.

Tous mes frères et à toutes mes sœurs.

À toute ma famille

Étant nombreuses les personnes appréciées, je ne peux les citer toutes. Mais je vous fais part de ma gratitude en espérant que vous garderez l'expression de mon inlassable amour et amitié.

CARISLAM

Dédicace

À Dieu source de toute connaissance

À la mémoire de mon père et de mon oncle Emmanuel MWEZE

Puisse Dieu les accueillir dans son infinie Miséricorde

À celles qui ont toujours garni mes chemins force et lumière...mes très chère tantes Euphraise et dada MWEZE

À la plus belle perle au monde...ma tendre mère lagrisi

À mes oncles (jean Claude, euphaine, jugauce)

À mes tantes (jeanne, immaculée, gorethy)

À mes frères (Jomweze, Miel, Christian), À mes sœurs (Anita, Yollande, Nancy)

En leur souhaitant tout le succès...tout le bonheur

À mon plus cher au monde, mon cousin David MWEZE

En lui souhaitant de réussir le chemin de ses ambitions toutes légitimes

À psy Diala Gloria pour tous ces bienfaits qu'elle a apporté dans ma vie

À toute ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé

À mes trinômes pour les camarades agréables qu'ils étaient et qu'ils seraient pour moi

À tous mes amis

Pour une sincérité si merveilleuse...jamais oubliable

À toute personne

Qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie...

Amicalement...

Je dédie ce modeste travail...

Mweze

Dediees

C'est avec un grand plaisir que je dedie ce modeste travail

à mon très cher père qui m'a guidé durant ma vie vers le bon chemin

avec ses conseils, ses sacrifices et son amour.

à ma très chère mère pour son amour éternel et sa tendresse, pour ce

qu'elle a fait et continuera à faire pour moi.

à mes sœurs et mes frères pour leur encouragement durant tout la

période de mes études.

à toute ma famille

à mon trisaïe

à tout mes amies.

à tout mes collègues de la promotion 2012.

à tous ceux qui m'aiment et j'aiment

S.ABZM.A

Remerciements

Ce travail a été réalisé grâce à la volonté de Dieu le tout puissant qui veille du haut firmament.

Nous remercions Monsieur le Professeur **BENOUARETH Djamel Eddine** qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de mémoire.

Nous remercions Madame **BRAIK Asma** maître assistante à l'Université 08 Mai 1945 Guelma d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nos remerciements s'adressent également à madame **BOUCENANE HANANE Nadia** maître assistante à l'Université 08 Mai 1945 Guelma d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Nous remercions **Mr. Kebieche**, chef de laboratoire de la direction de la santé de la Wilaya de Guelma.

Notre gratitude à **Mr. Simohamed** et **Mr. Bouden** et **Mme. Aayad R.** pour ses précieux conseils, ses recommandations et ses orientations.

Nous remercions et nous exprimons notre respect à M^{elle}. **BEDIOUI Soraya**, qui a accepté de nous encadrer et de nous avoir toujours indiqué le meilleur chemin à suivre.

Notre profonde gratitude à tous les membres et techniciennes du laboratoire d'immunologie, de biochimie et biologie moléculaire surtout madame Auria et madame Nahdjer pour leur gentillesse et leur disponibilité permanente.

A la fin une pensée particulière est adressée à l'ensemble des enseignants du département de Biologie, qui nous ont procuré une formation honorable.

Sommaire

Produced by ScantOPDF

Sommaire

	Page
Introduction	1
Généralité sur le dromadaire	
1- Définition	2
2- Morphologie	2
3- Classification	3
4- Reproduction	3
5- Régime Alimentaire	4
6- Distribution géographique	4
7- Adaptation au désert	5
8- Production laitière	6
9- les facteurs influençant sur la production laitière	6
Présentation du lait de chamelle	
1-Description de la traite	7
2- Caractéristique physicochimique et organoleptique du lait.....	7
3- Propriétés nutritionnelles	8
3.1- caractéristiques chimiques	8
4- Propriétés thérapeutiques	9
5- Les caractères microbiologiques	10
6- Présentation de système protéique du lait de chamelle	11
6.1- Caséine	12
6.2 -Les protéines du lactosérum	13
Les anticorps du lait de chamelle et ses applications	
1- Les anticorps du lait de chamelle	16
1.1- Définition des anticorps simple chaîne	16
1.2- Organisation de la structure et des gènes	17
1.2.1- Structure d'anticorps à chaîne lourde	17
1.2.1.1- Nanobodies (VHH).....	17
1.2.2- Organisation de gène d'Immunoglobulines	18

1.2.2.1- organisation de gène VHH	19
1.3- Réarrangement des gènes VHH et VH(3)	20
2. Applications thérapeutiques des anticorps de chamelle	21
2.1-Bactérienne	21
2.2-Parasitaire	21
2.3-Virale	21

Matériel et méthodes

1- Matière première	23
1.1- Collecte du lait	23
1.2- Conservation du lait	24
2- Préparation des échantillons	24
2.1- Ecrémage du lait	24
3- Détermination de la teneur en protéines	24
3.1- Matériel	24
3.2- Principe	25
3.3- Mode opératoire	26
4- Relargage par des sels	27
4.1- Matériel	27
4.2 Principe	27
4.3- Mode opératoire	28
5- Détermination de la teneur d'immunoglobuline	28
5.1- Matériel	28
5.2- Principe	28
5.3- Mode opératoire	28
6- Dialyse	28
6.1- Matériel	28
6.2- Principe	29
6.3- Mode opératoire	29
7- Test d'agglutination	29
7.1- Matériel	29
7.2- Principe	30
7.3- Mode opératoire	30

Résultats et discussions

1- Ecrémage du lait..... 31

2- Détermination de la teneur en protéines31

3- Relargage par des sels 31

4- Détermination de la teneur d'immunoglobuline32

5- Dialyse33

6- Test d'agglutination34

Conclusion 35

Références Bibliographiques

Annexes

Résumé

Produced with ScanTopDF

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Les caractères morphologiques des dromadaires	3
2	Classification des dromadaire	3
3	La reproduction chez les dromadaires	4
4	Caractéristiques physiques et organoleptique du lait de chamelle	7
5	Composition chimique globale du lait de chamelle avec le lait de vache (en%)	8
6	Composition en sels minéraux du lait de chamelle (en g/l) avec le lait de vache	8
7	Composition en vitamines (mg/l) du lait de chamelle et une comparaison avec le lait de vache	9
8	Tableau synthétique des différents effets thérapeutiques étudié dans le cas du lait de chamelle	10
9	Valeurs statistiques de la qualité microbiologique du lait de chamelle cru	11
10	Comparaison du taux des fractions caséiniques du (LCh) à celui du lait de vache (en%)	13
11	Représentation des séroprotéines du lait de chamelle	14
12	Echantillons du lait de chamelle	23
13	Etablissement de la gamme étalon	25
14	préparation des essais de dosage	26
15	Résultats du test d'agglutination	34

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Le Dromadaire	2
2	Répartition géographique du dromadaire	4
3	Schémas représentatif des protéines totales du lait camelin	12
4	Les caractéristiques structurales d'anticorps simple chaîne (HCAbs) et conventionnels	16
5	Diagrammes représentatifs de la structure d'anticorps à chaîne lourde et un VHH	17
6	L'organisation détaillée des gènes et des structures de domaine de chaque gène C la région VDJC	18
7	Le principe du domaine VHH de camélidés une lourde Chaîne d'anticorps	19
8	Représentation schématique du réarrangement des gènes V de VHH et VH (3) suivie par des groupes de gènes D et JH et des gènes constants (seulement des gènes C sont affichées)	20
9	Étapes de la purification et les applications des anticorps du lait de chamelle	22
10	Prélèvements du lait de chamelle	23
11	Détermination de la teneur en protéines	25
12	Changement de l'intensité de la couleur du complexe	25
13	Courbe d'étalonnage du dosage de protéines par la méthode de Bradford (1976)	26
14	Le Relargage	27
15	La dialyse	29
16	Tests d'agglutination	30
17	Teneur des protéines total du lait	31
18	Les précipités obtenus après la centrifugation	32
19	Teneur d'immunoglobuline (IgG) du lait des chamelles	32
20	Les précipités obtenus après la dialyse	33

Liste des abréviations

Aa	Acides aminés
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
α-La	α - lactoalbumine
α1-CN	Caséine α 1
α2-CN	Caséine α 2
β-CN	Caséine β
β-Lg	β - lactoglobuline
BSA	Albumine sérique bovine
CDR	Complementary Determining Regions
CM	Carboximéthyl
Cm	Centimetre
CN	Caséine
CWBP	Camel whey basic protéine
CXCR4	Chimiokine (C-X-C motif) récepteur 4
Cys	Cystéine
D	Dromadaire
DEAE	Diéthylaminoéthyl
DO	Densité Optique
FAO	Organisation de nations unie pour l'alimentation et l'agriculture
Fc	Fragment constant
FR	Framework region
Glu	Glutamine
HcAb	H chaîne antibody
Ig	Immunoglobuline
j	Jour
Kg	Kilogramme
LCh	Lait de chamelle
Leu	Leucine
LF	Lactoferrine
LV	Lait de vache
LZ	Lysozyme
m	Mètre
PGRP	Protéine de reconnaissance de peptido-glucane
phe	Phényle
t	Tonne
Trp	Tryptophane
Ufc	Unité fondamentale des colonies
VH	Partie variable de chaîne lourde
VHH	Variable domain of camelid heavy chain antibody
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VSG	Variable glycoprotéines de surface
WAP	Whey acide protéine

Introduction

ScantOPDF Produced by

Introduction

Le système immunitaire est une plateforme complexe en raison de la diversité et de la particularité de ces constituants. Constituant une aubaine pour les chercheurs, il reste aujourd'hui la question en suspens du fait de multiples études entreprises afin de trouver d'innovantes approches thérapeutiques.

En dépit des succès obtenus dans l'utilisation thérapeutique d'anticorps monoclonaux depuis une dizaine d'années, il s'avère possible d'utiliser des fragments d'anticorps constitués d'un seul domaine, appelés domaines Antibodies (dAb). Certains de ces fragments dérivent d'anticorps dénués de chaînes légères, naturellement présents chez les camélidés.

C'est en 1989, qu'une équipe de chercheurs dirigée par Greg Winter démontrait qu'il était possible d'obtenir des affinités de l'ordre de la dizaine de nano molaire en utilisant uniquement les domaines variables (V) VH (H pour heavy Chain) d'anticorps de souris obtenus par sélection *in vitro* à partir d'animaux immunisés.

Ils mentionnaient déjà la propriété qu'avaient ces dAbs de cibler des épitopes inaccessibles aux anticorps conventionnels. Cette découverte est restée anecdotique jusqu'en 1993 quand une équipe a mis en évidence la présence d'anticorps conventionnels mais aussi d'anticorps dénués de chaînes légères et de domaines CH1 (C pour constant domain) dans le sérum de dromadaires.

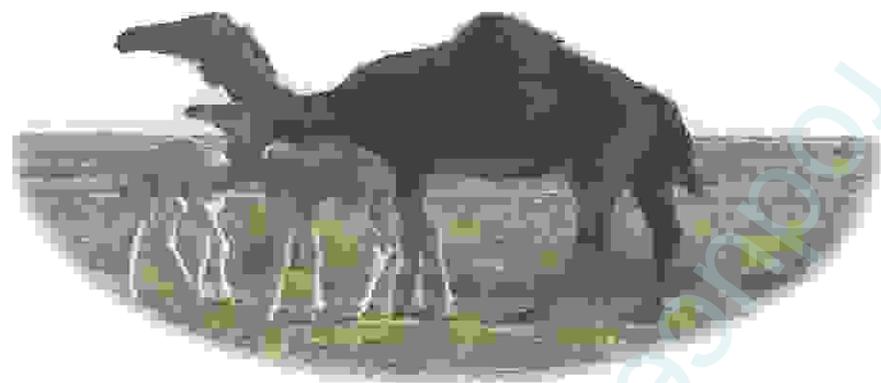
Ces anticorps dénommés HcAb (heavy Chain only Antibodies) lient leurs cibles par un seul domaine variable nommé VHH pour le différencier des VH conventionnels. Par référence à leur petite taille, les dAbs de dromadaires, considérés comme les plus petits fragments d'anticorps actifs, sont parfois nommés nanobody.

Afin d'approfondir nos connaissances et de contribuer à une bonne perception des dAbs, via cette perspective nous avons réalisé une recherche sur les différentes applications thérapeutiques des dAbs entre autre leur effets sur les maladies infectieuses.

Notre travail a été divisé en deux parties, une théorique et l'autre pratique selon le plan de travail qui suit Chapitre I : Description du dromadaire, Chapitre II : Les anticorps des chamelles et ses applications, Matériel et méthodes, Résultats et Discussions, Conclusion.

Ayant pour objectif une application (la réalisation d'une extraction d'anticorps à partir du lait de chamelle contre des maladies infectieuses).





Chapitre I

Produced by Scantopdf

Généralité sur le dromadaire

1- Définition

Le mot dromadaire (D) vient du grec *dromas*, qui signifie **coureur**. (1)
Il caractérise le chameau à une seule bosse, son nom est *Camelus dromedarius*. (SIBOUKEUR, 2009)

L'un des animaux d'élevage à pouvoir supporter des conditions alimentaires et climatiques très défavorables, le (D) a longtemps constitué, l'un des principaux vecteurs de sédentarisation des populations humaines dans les régions désertiques (SIBOUKEUR, 2009). Domestiqué en tant qu'animal de bât et de selle, il est aussi élevé pour son lait, sa toison et sa viande. (2)

2- Morphologie

Caractérisé par de longues pattes, un long cou incurvé, (4) des narines dotées d'un système de fermeture et d'ouverture, les lèvres du dromadaire sont fines pour consommer facilement les plantes épineuses, ses yeux sont protégés par de très longs cils et une bosse sur le dos qui contient un tissu fibreux rempli de graisse servant de garde-manger pour les périodes de disette ; pouvant nous indiquer son état de santé et la qualité d'herbe consommée. (figure 01). (6)(4)



Figure 01 : le Dromadaire (*Camelus dromedarius*) (4)

Tableau 01: Les caractères morphologiques des dromadaires (7)

Les caractères					
Taille (m)	Poids (Kg)	Couleur	Longévité (ans)	Poids de bosse (kg)	Vitesse (km/h)
2,25	450 à 900	sable à brun fauve	25	-	1,5 à 2,5
1,80 à 2	300 à 690	beige, caramel, gris, entre le blanc et le fauve	40 à 50	9 à 14	-
plus de 2	~ 1000		-	-	4 ou 5
1.70 à 2.30	400 à 900	-	35 à 40	-	-
3	-	-	15 à 20	-	4
2 à 2,30	700	brun sable à roux	40	-	-

N.B : (-) : non déterminé

3- Classification

Tableau 02 : Classification de dromadaire (3)

Règne	<i>Animal</i>
Embranchement	<i>Chordé</i>
Sous-embranchement	<i>vertébré</i>
Classe	<i>Mammifère</i>
Sous-classe	<i>placentaire</i>
Ordre	<i>Cétartiodactyle / sous-ordere Tylopode</i>
Famille	<i>Camélide</i>
Genre	<i>Camelus</i>
Espèce	<i>Camelus dromedarius</i>

4- Reproduction

La reproduction de dromadaire est saisonnière, les mâles font la cour aux femelles en tordant leur bouche, secouant leur tête et émettant des sons. Les mâles cherchent à faire chuter les autres prétendants. (4)

Dans cette saison les mâles deviennent agressifs envers les autres mâles. Leur but est la conquête de plus de femelles (Tableau 03). (8)

Tableau 03 : La reproduction chez les dromadaires (8)

les caractères de reproduction				
L'âge de maturation (ans)	Saison de reproduction	Nombre de jeune	Durée de la gestation (jours)	sevrage (ans)
♂ 2	Février	1	365 à 440	près de 1
♀ 2				
♂ 4 à 5	Hiver	1	370 à 440	1 à 2
♀ 3				
♂ 4 à 5	janvier	1	360	2
♀ -				
♂ 4	-	1	360 à 420	-
♀ 4				
♂ 6	-	-	390	-
♀ 4				

N.B : (-) non déterminé

5- Régime Alimentaire

Les dromadaires sont herbivores, et ont besoin des sels leur permettant de stocker et de fixer l'eau, les plantes halophytes qu'ils consomment contiennent des sels. (5)

La végétation est bien verte, le D peut se passer de boire, trouvant dans les plantes l'eau suffisante pour son métabolisme. (4)

Son estomac est constitué de 3 poches pouvant emmagasiner de 40 à 50 litres de nourriture ou 120 litres d'eau. (2) (1); capable de boire 100 litres d'eau en quelques minutes (1)(8)

6- Distribution géographique

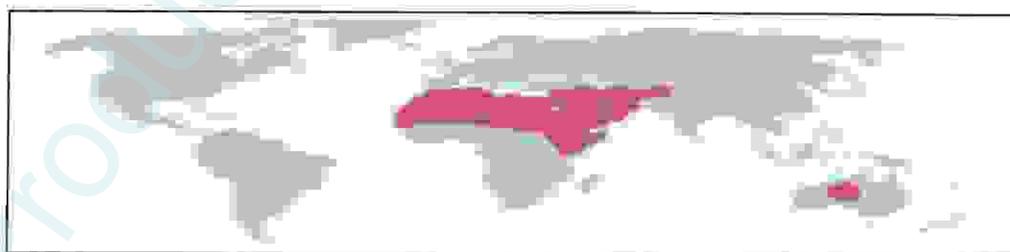


Figure 02 : répartition géographique du dromadaire (5)

La répartition géographique du dromadaire, dans les zones tropicales et subtropicales s'étend des régions arides et semi-arides du nord de l'Afrique jusqu'au nord-ouest du continent asiatique. (SIBOUKEUR, 2009)

Selon les statistiques de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (2009), la population cameline mondiale s'élève à environ 20 millions de têtes. (Dia, M.L et Ahmed O. Mohamed, 2011)

7- Adaptation au désert

Le dromadaire développe d'autres moyens pour s'adapter à ces conditions extrêmes. Les mécanismes d'adaptation utilisent des propriétés physiologiques et anatomiques (1)

7-1 Adaptation anatomique

- Ses pieds sont larges pour ne pas s'enfoncer dans le sable
- Une robe claire qui renvoie le soleil avec une fourrure épaisse
- D'une peau épaisse et protectrice, protégeant le D du chaud. (9)
- La fourrure laineuse protège à la fois du froid pendant la nuit et de la chaleur du jour. (8)
- Les naseaux peuvent s'ouvrir ou se fermer pour protéger son système respiratoire
- Les yeux sont protégés par deux rangées de cils. (4)

7-2 Adaptation physiologiques

- La bosse permet :
 - De stocker l'énergie en cas de famine (4) (1)
 - De fournir l'eau (4)
 - De jouer le rôle de thermorégulateur. (2) (1)
- Il résiste à la déshydratation supérieure à 30 % par un ensemble de mesures d'économie d'eau (variation de la température, du métabolisme, de la sudation, rétention de l'eau au cours de l'expiration) (1)(9) (4)
- Le recyclage de l'urée avec une possibilité d'ingurgité de grande quantité d'eau et de sel (n°urinant qu'un ½ l/j). (2), (1)

8- Production laitière

Les dromadaires, en les comparant à d'autres animaux, sont capables dans des conditions de sécheresse de produire une grande quantité de lait. (SENOUSSI, 2011) Assez limitée dans les régions arides et semi arides. (S. ELLOUZE et M. KAMOUN, 1989)

Durant la période 2001/2005 la concentration du lait synthétisé est estimée par 1,5 tonnes (CHIBAH, 2011), (SENOUSSI, 2011).



9- Les facteurs influençant sur la production laitière

- Race : Les races asiatiques ont rapportées une production annuelle moyenne, soit 2,6 fois plus élevée que les races africaines **(SIBOUKEUR, 2009)**.
- Rang de lactation : la production laitière chez la chamelle augmente avec le rang de mise. **(FREDERIC LHOSTE, 2004)**
- Statut sanitaire : la prévention contre les maladies parasitaires permet d'augmenter la production laitière des Chs de plus de 65%. **(FREDERIC LHOSTE, 2004)**
- Facteurs climatiques et alimentaires :
 - La variabilité saisonnière de la disponible fourragère joue sur les performances lactières de la Chamelle. **(NARJISSE, H., 1989)**
 - les performances lactières sont plus faibles en fin de saison sèche qu'en saison des pluies. **(FREDERIC LHOSTE, 2004)**.
- durées de lactation
 - L'amélioration des conditions alimentaires prolonge la période de lactation et augmente la quantité de lait produite jusqu'à atteindre le double. **(SIBOUKEUR, 2009)**
 - Elle augmente en fonction de l'intervalle entre les mises bas. **(FREDERIC LHOSTE, 2004)**.
- la fréquence de traitement

La production laitière augmente avec la fréquence de traites.

(FREDERIC LHOSTE, 2004), (SIBOUKEUR, 2009)

P

résentation du lait de chamelle

1-Description de la traite

Le lait de chamelle d'origine alvéolaire, cisternal, et une combinaison des deux, il est disponible par simple pression du pis alors que le lait alvéolaire nécessite le déclenchement d'un réflexe d'éjection, généralement provoqué par la présence du petit. (Ayadi M. et al, 2009)

Traité deux fois par jour, le petit allaitant est écarté pendant la traite. (CATHERINE BAROIN, 2010) ; le trayeur doit tenir le bol de traite sous la mamelle sur sa cuisse, horizontalement en prenant appui sur l'autre jambe. (10)

Les chameaux sont des animaux très sensibles et il est arrivé que certaines retiennent leur lait du simple fait de notre présence inhabituelle sur le lieu de traite. Une telle rétention peut favoriser les mammites cliniques. (TOURETTE, 2002)

2- Caractéristique physicochimique et organoleptique du lait

Selon plusieurs auteurs (AMEL SBOUI et al.2009 ; CHIBAH, 2011 ; SENOUSI, 2011 ; SIBOUKEUR, 2009), le lait de chamelle (l.Ch) présente comme caractéristiques organoleptique : la couleur et la saveur.

Il présente : le pH, l'acidité, la densité, la viscosité et une température de congélation. (Tableau04)

Tableau 04 : Caractéristiques physiques et organoleptique du lait de chamelle (AMEL SBOUI et al. ,2009)

Caractéristiques organoleptique et physicochimique						
Couleur	Saveur	Acidité (° Dornic)	pH	Densité	Viscosité (centipoises)	Congélation (°C)
blanche	sucré, acide, salé	15	6,6	0,99 et 1,034	2,2	-0,53 à -0,61
blanc mat	doux, légèrement âpre salé	très peu	6,2 à 6,5	1,026 à 1,038	plus faible	(-)
blanc mat	sucré, acide, salé	plus acide	6,6	moins dense	plus faible	-0,53 à -0,61
blanche mate	peu salé	17,2	6,41	1,02	plus visqueux	(-)

(-): non déterminé



3- Propriétés nutritionnelles

3-1 Caractéristiques chimiques

La composition chimique globale du lait de chamelle, montre néanmoins des teneurs importantes en nutriments de base (protéines, matière grasse et lactose), en eau et en matière sèche avec des proportions similaires à celles présentes dans le lait de vache (Tableau 05). (SENOUSSI, 2011), (CHIBAH, 2011), (SIBOUKEUR, 2009)

Tableau 05: Composition chimique globale du lait de chamelle (en%)
Comparaison avec le lait de vache.
 (S. Raghvendar, S.K. Shukla, M.S. Sahani, C. Bhakat, 2004)

origine du lait	constituants					
	Eau	MST	lactose	MG	Protéine	PNP
Lait chamelle	86 à 91	0,79	4,21	4,33	4,02	—
	86 à 91	(-)	2,5 à 5,6	1,1 à 4,6	2,5 à 4	5 à 10
	(-)	(-)	2,8 à 5,8	3, 15	2,5 à 4,5	(-)
	86 à 91	(-)	3,4 à 5,6	2,7 à 3,6	3 à 3,5	4,6 à 6,7
	(-)	0,667	4,278	3,75	3,415	1,04
	(-)	0,85 à 1,0	2,91 à 4,12	1,8 à 5,0	1,8 à 3,20	(-)
	(-)	(-)	3,8 à 4,3	1,5 à 3,1	2,1 à 2,5	(-)
	(-)	0,7 à 1,2	3,8 à 5,7	2,0 à 4,2	2,5 à 4,0	(-)
Lait vache	(-)	0,75	0,402	0,325	0,305	0,76

N.B : MST = matière sèche totale - MG = matière grasse - PNP = azote non Protéique () : non déterminé

Les sels minéraux présentent des teneurs élevées en Na, N, P et en oligoéléments tels que (Zn, Fe, Cu, Mn) par rapport au lait de vache. (Tableau 06) (AMEL SBOUI et al., 2009), (SENOUSSI, 2011), (CHIBAH, 2011), (SIBOUKEUR, 2009)

Tableau 06 : Composition en sels minéraux du lait de chamelle (en g/l)
Comparaison avec le lait de vache. (AMEL SBOUI et al., 2009)

Origine du lait	Ca	Mg	P	Na	K	Fe	Zn	Cu	Pb
lait du chamelle	1,65± 0,066	0,07± 0,029	—	0,47 ± 0,055	2,46 ± 0,008	—	0,02 ± 0,076	0,3 ± 0,05	—
	0,84 ± 0,199	0,04± 0, 122	0,90 ± 0,315	0,46 ± 0,39	0,29 ± 0,016	0,01± 0,012	0,02 ±0,002	0,044 ±0,304	—
	0,92 à 0,466	0,247 à 0,573	24,99 à 58,4	10,47 à 25,7	47,14 à 10,53	—	—	—	0,001 à 0,029
	0,116	—	0,083	0,039	0,176	—	—	—	—
	1,09	1,4	7,6	5,8	17,9	0,021	0,019	0,019	—
lait de la vache	1± 0,060	0,07 ± 0,088	—	0,43 ± 0,017	1,50± 0,18	—	0,02 ± 0,056	0,02 ± 0,056	—

(-) : non déterminé



Le lait de chamelle est caractérisé par une richesse en vitamine C, les valeurs normales rapportées sont entre trois fois plus élevée que celle du lait de vache.

Ce lait contient moins de vitamine A, B1, B2, E, acide folique et acide pantothénique que le lait de vache ; pendant que le contenu de la vitamine B6 et B12 est environ le même.

(Tableau 07). (R. YAGI, 1982), (Z. FARAH *et al*, 1992)

Tableau 07 : Composition en vitamines (mg/l) du lait de chamelle en comparaison avec le lait de vache

(T.Stahl,H.P.Sallmann,R.Duehlmeir,U.Wernery ,2006)

Origine du lait	Nature de vitamines						
	A (rétinol)	B1 (thiamine)	B2 (riboflavine)	B3 (niacine)	B12 (cobalamine)	E (tocophérol)	C (acide ascorbique)
Chamelle	0.10	-	0.57	-	-	0.56	37.4
	0.037 à 1.264	0.16 à 0.46	-	-	0.0023 à 0.0039	-	5,7 à 9,8
	-	0.5	0.7	5,2	-	-	46
	0.020	0.0196	-	-	-	0.0327	0.0525
Vache	0.27	10	4	4	21.50	0.60	11

(-) . non déterminé

4- Propriétés thérapeutiques

Le lait de chamelle est un anti-infectieuses, anti cancéreuses, antidiabétiques et plus généralement comme reconstituant chez les malades convalescents

(G. KONUSPAYEVA, G. LOISEAU, B. FAYE, 2004)

Les niveaux élevés des protéines du lactosérum telle que les anticorps sont beaucoup plus simples dans la structure que les anticorps du lait humain, de lui permettre de pénétrer plus profondément dans le tissu humain et les cellules.

(Tableau 08). (11)



Tableau08 : Tableau synthétique des différents effets thérapeutiques étudié dans le cas du lait de chamelle

les maladies	effets observés des protéines du lactosérum	pourcentage (%)
Diabète	hypoglycémie et régulation de la glycémie (teneur élevée d'insuline)	1.67
Allergie de lait	Hypoallergies (absence de β -lactoglobuline et la nouvelle β -caséine qui est différente de celle de vache)	--
Infections	Diminution des réactions inflammatoires (effets anti bactérienne, antivirale, antifongique) ; la présence <ul style="list-style-type: none"> - De lactoferrine(LF) - De lactoperoxydase (LP) - De lysozymes(LZ) - De protéine de reconnaissance de peptidoglycanes (PGRP) - Des immunoglobulines (Ig) - N-acétyl β-D- glucosaminidase (la NAGase) 	2,5 (hépatite) 7,5 (HIV)
Tumeurs	<ul style="list-style-type: none"> - Arrêt de l'activité métabolique de précurseurs de l'ARN - stimulation du système immunitaire (Ig, LF, LP, PGRP et teneur élevée de la vitamine C) 	--
Maladies auto immunes	- le renforcement du système immunitaire (LF)	--
Reconstituant	<ul style="list-style-type: none"> - activité physique - Le renforcement des défenses immunitaires (teneur élevée de la vitamine C) 	--

(-) : non déterminé

5- Les caractères microbiologiques

Ce lait est idéal pour la croissance et la multiplication de micro-organismes en raison de sa constitution nutritionnelle.

Un lait cru établi de façon aseptique à partir d'un animal en bonne santé contient en général quelques bactéries telles que les bactéries lactiques. (Omer, R. H., A. H. Eltinay, 2008)

La qualité microbiologique de lait cru de chamelle et leurs effets inhibiteurs (due à la présence des protéines Protectrices) sur les bactéries pathogènes s'appuient sur la numération de quatre groupes de micro-organismes (La flore aérobie totale, les psychrotrophes, les coliformes, les bactéries sporulantes). Sa charge ne dépasse pas 5.10^3 germes /ml. (M. G. EL-ZINEY, A. I. AL-TURKI, 2007) (SIBOUKEUR, 2009)

Cependant, dans le cas d'un pis infecté ou de contamination on peut noter la présence de quelques germes pathogènes variant entre 100 à 10^8 ufc/ml (tableau09). (Dr. HABIL. U. WERNERY, 2007)

Tableau09 : les valeurs statistiques de la qualité microbiologique du lait de chamelle cru (Omer, R. H., A. H. Eltinay, 2008)

Microorganismes	moyenne (ufc/ml)		
flore aérobie totale	5×10^2	1.8×10^5	(-)
coliformes	1.4×10^2	6.8×10^1	10^5 à 10^6
psychrotrophes	3.8×10^2	(-)	(-)
sporulantes	2.1×10^2	(-)	(-)
staphylocoques	2.7×10^2	1.2×10^3	(-)
bactéries lactiques	(-)	(-)	(-)
Les levures	1.9×10^2	4.1×10^1	(-)

(-): non déterminé

6- Présentation de système protéique du lait de chamelle

D'après l'apport nutritionnel et leurs propriétés techno-fonctionnelles particulières, les protéines du lait revêtent une importance considérable au double plan quantitatif et qualitatif. (SIBOUKEUR, 2009) La teneur moyenne en protéines dans le lait de chamelle (LCh) avoisine 33g/l.

En le comparant au lait bovin, la distribution des protéines est irrégulière car certaines protéines sont spécifique et d'autres sont absentes tel que la β -Lactoglobuline (β -Lg). (SENOUSSI, 2011)

Selon leur solubilité en milieu acide, ces protéines se répartissent en deux fractions : les caséines et les protéines du lactosérum (figure 03). (SIBOUKEUR, 2009).

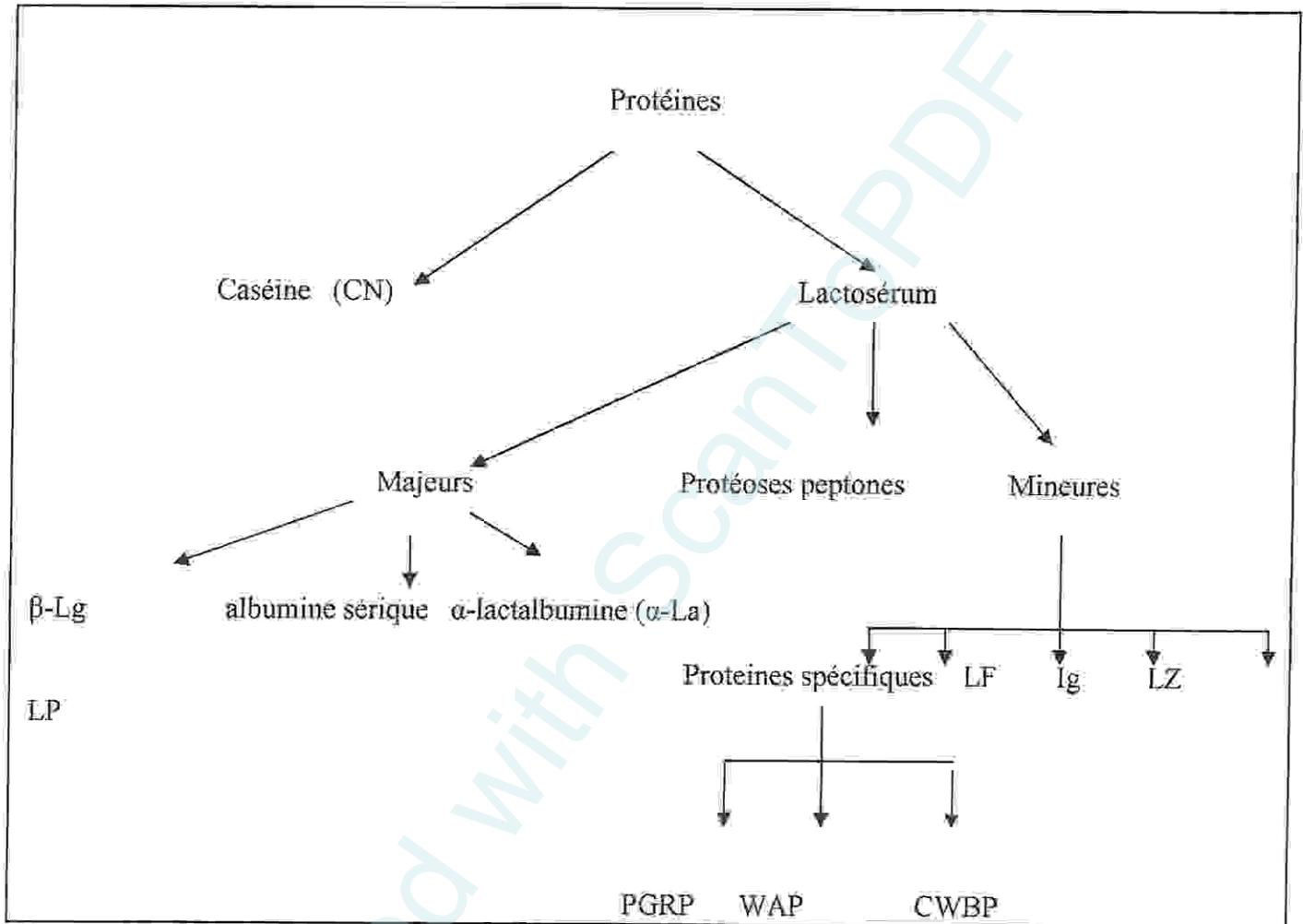


Figure 03 : schémas représentatif des protéines totales du lait camelin (SENOUSSI, 2011)

6-1- Caséine

Les caséines (CN) camelines sont des phosphoprotéines élaborées dans les cellules lactogènes et représentent 73 à 81% des protéines totales, contre 83% dans le lait bovin. (SENOUSSI, 2011), (CHIBAH, 2011),

Les caséines camelines possèdent une organisation micellaire. Ces micelles sont des colloïdes constitués de quatre types de CN (α_{s1} -CN, α_{s2} -CN, β -CN, κ -CN). (STEFAN K. et al, 1997)

On observe une certaine variabilité dans le taux des différentes fractions caséiniques en homologie avec les caséines bovines (tableau 10).

Tableau10 : Comparaison de taux des fractions caséiniques(en %) du (LCh) à celui du lait de vache (STEFAN K., FARAH Z. ZDENKO P., 1997)

Espèce	Les protéines			
	α_1 -CN	α_2 -CN	β -CN	κ -CN
chamelle	38	21	65	3,5
	22	9,5	65	3,5
	22 à 38	9,5 à 21	28 à 65	3,5 à 5
	39	56	64	56
vache	36	10	34	13
Homologue CN camélidé avec CN bovines%	39	56	64	56

6-2 -Les protéines du lactosérum

Les protéines sériques constituent la fraction soluble des protéines du lait. Leur concentration est de 20 à 28% dans le lait camelin. Excepté la β -lactoglobuline (β -Lg).

Les principales protéines retrouvées dans le lait de chamelle (LCh) sont communes aux autres espèces. (CHIBAH, 2011)

On distingue :

- les protéines majeures (α lactalbumine, albumine sérique)
- les protéines mineures (immunoglobuline, lactoferrine, lactoperoxydase, lysozyme)
- les protéose-peptones. (SIBOUKEUR, 2009) (CHIBAH, 2011) (SENOUSSI, 2011)

D'autres protéines mineures spécifiques du (LCh) ont été isolées se caractérisant par :

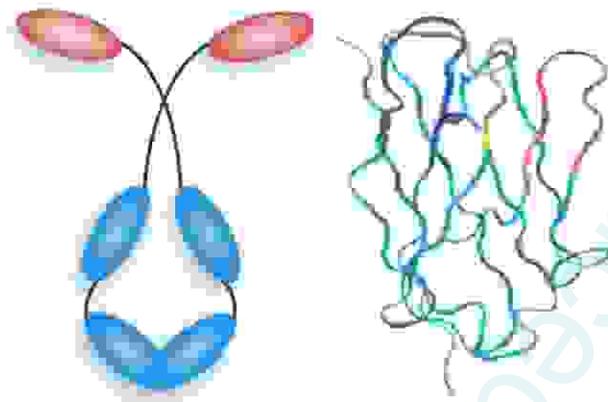
- Une protéine de reconnaissance des peptidoglycane (PGRP)
- La Whey acid protein (WAP)
- La camel whey basic protein (CWBP). (SIBOUKEUR, 2009)

Le tableau 11 résume les différentes séroprotéines du (LCh)

**Tableau 11: Représentation des séroprotéines du lait de chamelle
(SIBOUKEUR, 2009 ; SENOUSSE, 2011)**

séroprotéines du lait de chamelle		
majeurs	α - lactalbumine	Dans le (LCh), l' α -lactalbumine (α -La) est présente à des taux allant de 1.62 à 3.19 mg/ml. Elle possède une fonction biologique bien définie dans la glande mammaire, en interagissant avec la β (1.4) galactosyl transférase pour former le complexe lactose synthéase). L' α -La est aussi identifiée comme une métalloprotéine transportant le calcium.
	albumine sérique (SA)	C'est la seule protéine du lactosérum qui n'est pas synthétisée par la glande mammaire. Elle passe dans le lait par diffusion passive ; son rôle est de transporter des acides gras insolubles dans le sang. Elle constitue un taux de 1,5% des protéines totales du lait et 8% des protéines sériques (SA) représentant la plus longue chaîne peptidique de toutes les protéines sériques, leur séquence primaire d'acides aminés révèle une identité de 76% avec l'albumine sérique humaine
	β -lactoglobuline (β -Lg)	la β -Lg est la protéine la plus abondante dans le sérum du lait de plusieurs espèces animales. Elle appartient à la famille des lipocalines ; la β -Lg possède la capacité de fixer des molécules hydrophobes et amphiphiles (hexane, acide palmitique, vitamine D); l'absence de β -Lg dans le lait de chamelle a été confirmée par des techniques immunologiques n'ayant pas mis en évidence des réactions croisées entre le sérum du (LCh) et des anticorps anti - β -Lg
	lactoferrine (LF)	LF est une protéine d'origine mammaire. Cette protéine appartient à la famille des transferrines. Leur concentration est plus abondante dans le lait camelin 0,7g/l. Diverses fonctions biologiques lui sont attribuées : antimicrobienne, antivirale, anti-tumorale et antifongique
mineurs	lactoperoxydase (LP)	Est un ensemble d'enzymes appartenant au système non immun normal de la défense antimicrobienne du lait. La LP est une chaîne glycoprotéique possédant un effet bactéricide très prononcé contre les bactéries GRAM- et un effet bactériostatique contre les bactéries GRAM+. De même, elle semble avoir une activité inhibitrice contre les virus et les moisissures
	lysozyme (LZ)	le LZ est une enzyme bactériolytique présente naturellement dans le lait de mammifère. Cette enzyme clive la liaison glycosidique B(1-4) de peptidoglycane de la paroi bactérienne . Le LZ de (LCh) résiste à un chauffage de 85% à 648 μ g/100ml. En plus de son action lytique, il possède une activité chitinolytique lui permettant d'agir sur les levures et les champignons

immunoglobuline (Ig)	<p>dans le (LCh), on trouve différentes classes d'Ig entre autre IgA, IgM et les IgG. La concentration en IgG dans ce lait est supérieur à celle du lait de vache. Au premier stade de lactation leur taux moyen est de 100.7 mg/ml. Ils sont appropriés aux traitements thermiques et résistent à un chauffage de 75°C pendant 30 mn, ils présentent différentes sous classes ou les IgG 2 et 3 représentent 50% du sérum des camelidés. Ces Ig présentent une activité inhibitrice sur les enzymes. En raison de leur petite taille, ils peuvent être considérées comme une meilleure approche pour les thérapies humaines.</p>
protéines spécifique de lait de chamelle	<p>PGRP: la famille des PGRP sont des molécules du système immunitaire inné possédant des fonctions antibactériennes. C'est un composant intracellulaire des neutrophiles et est également produite dans les cellules épithéliales et dans les sécrétions corporelles. Elle est identifiée dans le LCh à un taux de 19%. dans le cas de mammites ce taux augmente jusqu'à 45%. Elle exerce son effet antibactérien par l'inhibition de la synthèse des peptidoglycanes.</p> <p>WAP: son taux dans le LCh est estimé à 157mg/l. La WAP est indispensable pour le maintient de la stabilité de la sécrétion du lait.</p> <p>CWBP: elle est détectée après 48h suivant la mise bas de la chamelle à un taux de 1.7g/l. Son taux augmente jusqu'à atteindre 3.1g/l dans le lactosérum</p>
protéases peptones(PP)	<p>Les PP sont définies comme la fraction des protéines du lait restant soluble après chauffage du lait à 95°C /30mn. Cette fraction peut être divisée en deux groupes selon leur origine. Le premier est le résultat de l'action de la plasmine sur la caséine β et l'autre dont le composant PP3 (phosphoglycoprotéine) est le constituant majeur, se trouve à une teneur moyenne de 220mg/l. Leur concentration dans le (LCh) augmente au double lorsque celle des IgGs chute ce qui pourrait confirmer leur rôle antimicrobien.</p>



Chapitre II

Produced by Scantopdf

Les anticorps du lait de chamelle et ses application

La biothérapie est fondée sur l'emploi d'organismes vivants et de substances prélevées sur des organismes vivants (hormones, sérums, extraits d'organes ou de tissus).

Les Immunoglobulines sont des globulines sériques particulières ayant la propriété de se combiner d'une manière spécifique à certaines substances étrangères solubles ou cellulaires qui leur correspondent appelés antigènes.

1- Les anticorps du lait de chamelle

1.1- Définition des anticorps simple chaîne

La famille des *Caméliidès* présentent une particularité se résumant à la production d'IgG à domaine unique/ simple chaîne, en dehors des IgG conventionnels.

Ils représentent plus de 50% des anticorps fonctionnels. (MIDINHOUEVI, 2007)

Ces anticorps simple chaîne (HCAbs) n'ayant pas de chaînes légères, sont composés d'un domaine variable VHH (partie variable des anticorps simple chaîne) différent des VHs (partie variable de chaîne lourde) et d'une région constante dépourvue du domaine CHI remplacée par une région charnière étendue. (Nick Deschacht et al, 2010)(MIDINHOUEVI, 2007)(WAEL MAHMOUD, 2008)

Le poids moléculaire de la chaîne lourde HCAB est d'environ 95 kDa tandis que l'IgG conventionnelle fait 160 kDa. Le domaine variable de la chaîne lourde (VHH) des anticorps simple chaîne est seul responsable de la liaison avec les antigènes (Ligu04). (MIDINHOUEVI, 2007)

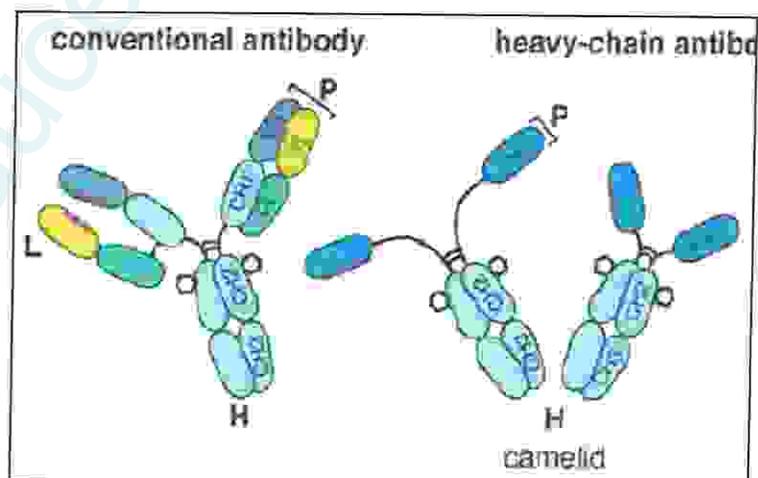


Figure 04 : les caractéristiques structurales d'anticorps simple (HCABs) et conventionnels (Janusz Wesolowski et al ,2009)

1.2- Organisation de la structure et des gènes

1.2.1- Structure d'anticorps à chaîne lourde

Les anticorps simple chaîne (HCAbs) sont composés de deux chaînes lourdes, chacune à trois domaines, deux domaines constants, (CH2 et CH3) (SARAH DE CLERCQ, 2010) et un domaine variable VHH unique de liaison à l'Ag. (Ikbel Achour et al, 2008) (SARAH DE CLERCQ, 2010)

Cette VHH appelé Nanobody pour la forme du paratope, a un diamètre de 2,5 nm et une hauteur de 4 nm.5. (Katja Conrath et al, 2005)

L'absence de domaine CH1 à chaîne lourde des anticorps explique l'absence de la chaîne légère (figure 05). (SARAH DE CLERCQ, 2010)

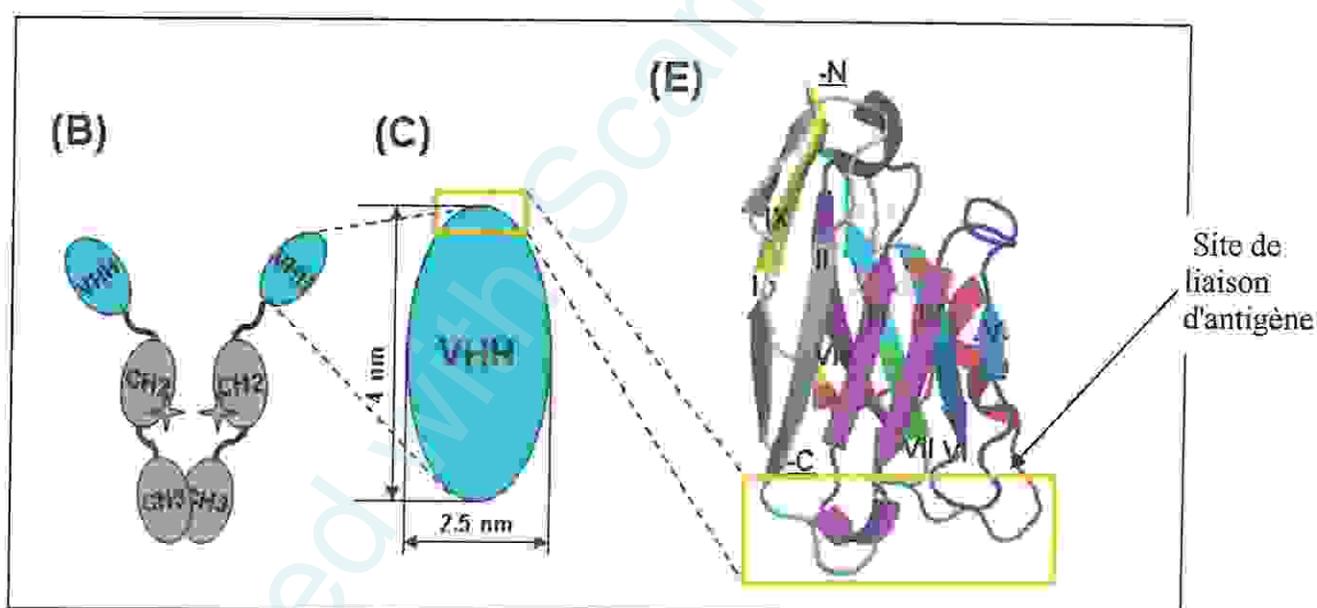


Figure 05: Diagrammes représentatifs de la structure d'anticorps à chaîne lourde et un VHH (Francisco et al, 2011)

1.2.1.1 - Nanobody (VHH)

Les VHHs dérivent des anticorps simple chaîne et constituent les plus petites entités actives conservant une grande affinité aux antigènes spécifiques. Constitués de 118 à 136 acides aminés (aa) avec un poids de 15 kDa, leur séquence acide aminée est organisée en trois régions hypervariables (CDR1, CDR2 et CDR3) constituant le paratope séparé par quatre régions charpentes (Framework- région) (FR1-FR4). (Francisco et al, 2011)

La CDR3 la plus large est suivie de la CDR1, de l'interface antigène-VHH (1700 Å), de la substitution des acides aminés (aa) hydrophobe par (aa) des acides aminés

hydrophiles au niveau des VHH empêchant toute liaison des VHH avec les VL et augmentant la solubilité et la flexibilité (MIDINHOUEVI, 2007), mais la longueur de CDR et du second pont disulfure réduit leur flexibilité et contribue à l'affinité (SARAH DE CLERCQ, 2010) (Francisco et al, 2011)

1.2.2- Organisation de gène d'Immunoglobulines

L'organisation de gènes des camélidés de la région VDJC qui expriment une région variable V contient à la fois les gènes (VHH, VH), suivi par une unique diversité, de jonction DH-JH grappe et des gènes de la région constante C, qui comprennent à la fois des CHH et des gènes CH.

Le séquençage complet de la région VDJC sélectionne 223 kb organisé dans l'ordre suivant: 5' -VHH- 3VH- 7DH- 7JH- C μ - C δ - C γ 2b- C γ 1a- C γ 1b- C γ 2c- C ϵ - C α - 3'

(Ikbel Achour et al, 2008)

La fraction séquencée de la grappe V en homologie avec la famille des gènes du VH3 des Ig humaines (Wael MAHMOUD, 2008) contient à la fois les gènes VHH et VH suivie par une unique DH-JH grappe et de gènes de la région C, y compris de gènes CHH (C γ 2b et C γ 2c) de IgG homodimères et gènes CH (C γ 1a et C γ 1b) de tétramère IgG (Figure 06) (Ikbel Achour et al, 2008)

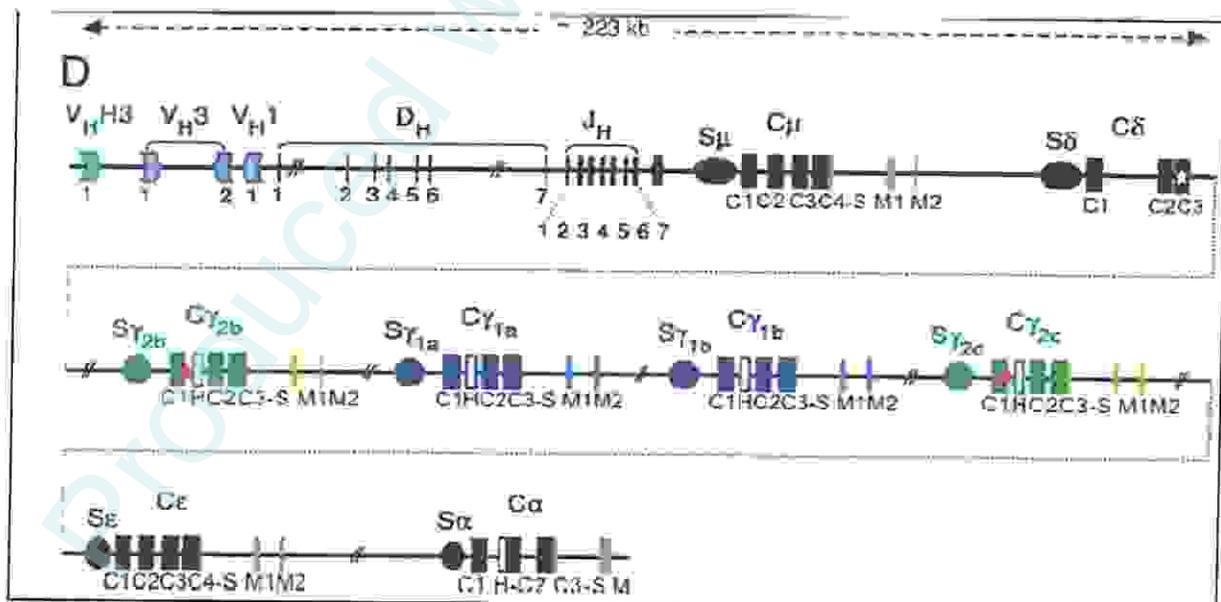


Figure 06 : L'organisation détaillée des gènes et des structures de domaine de chaque gène C la région VDJC (Ikbel Achour et al, 2008)

1.3- Réarrangement des gènes VHH et VH(3)

Après les rapprochements entre les gènes de jonction JH avec diversité DH puis les gènes DH-JH avec VHH ; VH(3)-D-JH réarrangé co-exprimé soit avec l'C γ 2 ou C γ 3, on aboutit à une Ig homodimère.

En revanche, le VH(3)-D-JH cotranslaté avec les classique C γ 1a ou C γ 1b, et associé avec un polypeptide de la chaîne L vont former un Ig tétradimère (fig. 8).

Parfois, le VH(3) D-JH produit n'ayant pas la CH1 exon peut être cloné à partir d'ADNc, ce qui indique qu'ils sont probablement une partie de la piscine HCAb.

La majorité des V classique sont le plus souvent générée après une DJH inhabituel par recombinaison génétique ; le codon pour conservée Trp103 (un résidu qui est essentiel pour l'appariement VL dans le classique Abs) est substitué par un codon essentiellement arginine (figure 08) . (Nick Deschacht, 2010)

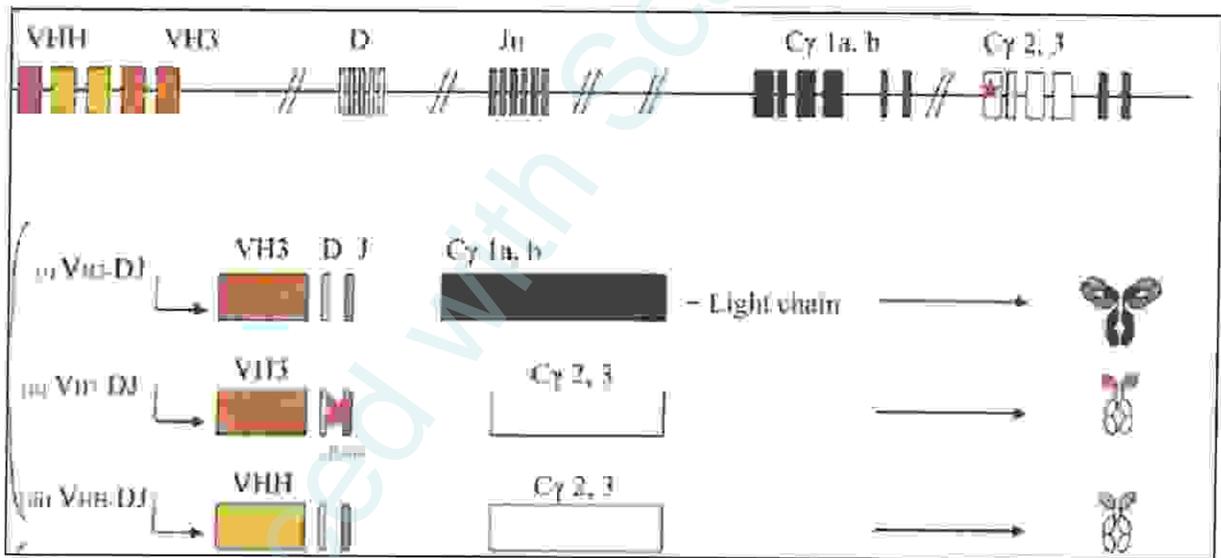


Figure 08 : Représentation schématique du réarrangement des gènes V de VHH et VH(3) suivie par des groupes de gènes D et JH et des gènes constants (seulement des gènes Cy sont affichées) (Nick Deschacht, 2010)

2- L'application thérapeutique des anticorps de chamelle

Bien que les VHHs sont parfaitement adaptés pour les applications nécessitant une grande stabilité, actuellement ils font l'objet d'études dans multiples domaines. (M. M. HARMSEN, H. J. DE HAARD, 2007).

Concernons les maladies infectieuses :

2.1- Bactérienne

VHH utilisés à l'encontre des protéines de surface des bactéries pour objectif le blocage des pièces jointes à celle des cellules hôtes, empêche efficacement l'attachement intestinal de bactéries *E. coli* qui causent la diarrhée (HARMSEN et al. 2005b)

2.2- Parasitaires

Utilisés comme dispositifs de ciblage des enzymes toxiques ou de bloquer une interaction moléculaire spécifique.

La maladie du sommeil a été traitée avec succès par les VHHs qui se lient à une protéine d'enveloppe du trypanosome (variable glycoprotéines de surface) (VSG) et ont été fusionnés à l'apolipoprotéine L-1 enzyme, entraînant la lyse des trypanosomes (Baral et al. 2006).

2.3- Virale

Les virus utilisent souvent des épitopes cachés sur la capsidie ou l'enveloppe habituellement inaccessibles aux anticorps classiques mais constituent des cibles privilégiées pour les nanobody :

- la glycoprotéine de l'enveloppe du virus du sida, inhibiteurs d'entrée et des anticorps neutralisants dirigés contre la gp120 et gp41, sauf pour le cas d'anticorps de camélidés ou les VHH rivalisant avec CD4 et gp120 b12 pour l'interaction exercent une activité neutralisante contre des isolats primaires des sous-types B et C
- Une forte activité antirétrovirale a été également trouvée dans les VHH dirigés contre la protéine de surface cellulaire CXCR4, utilisé par le VIH-1 comme corécepteur pour l'entrée virale (Anna Maria Matilda Forsman, 2008)



Matériels et Méthodes

Matériel et méthodes

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire de l'université 8 Mai 1954 de Guelma.

Selon les protocoles qui suit :

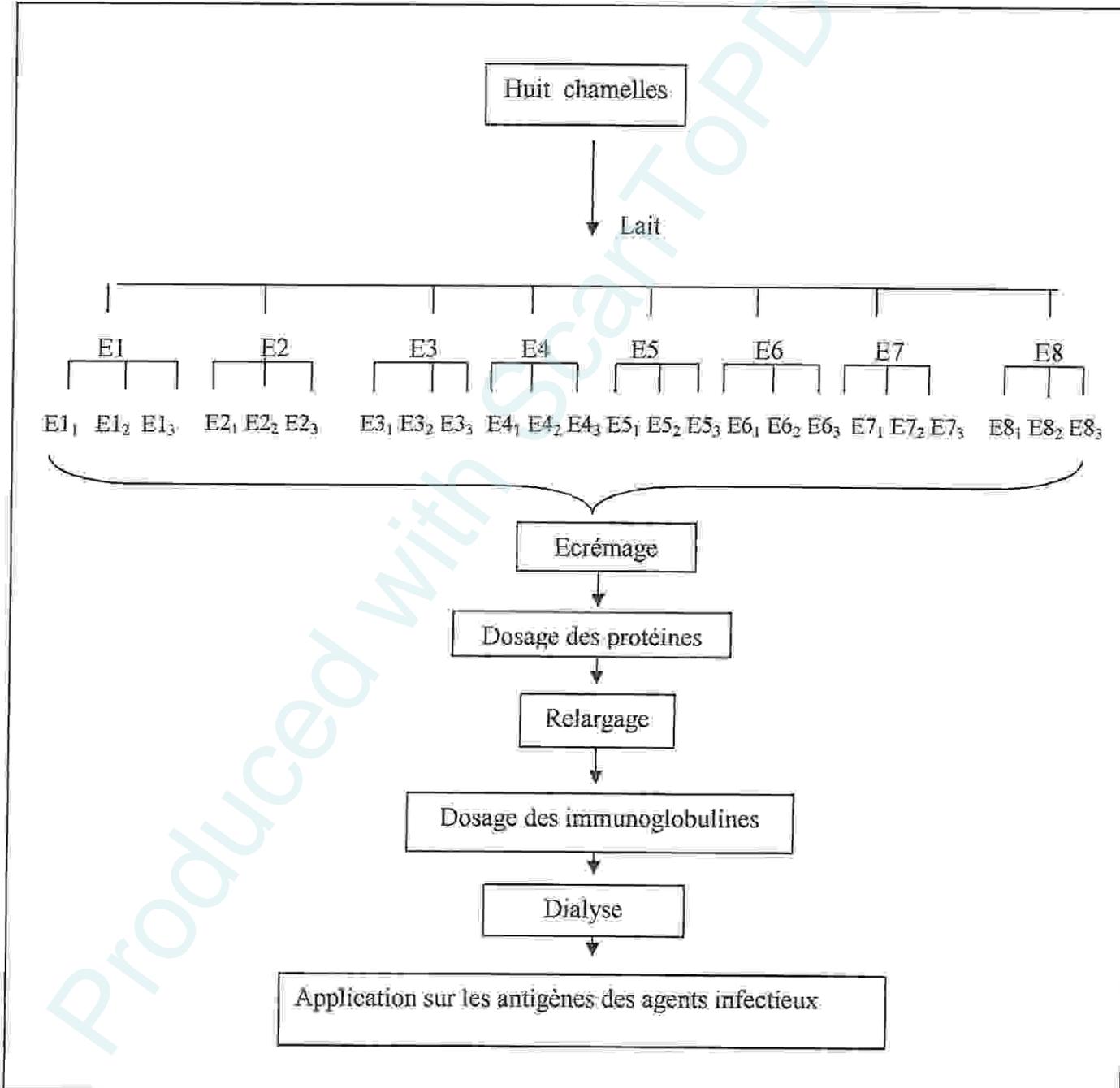


Figure 9 : Étapes suivies pour la purification et les applications des anticorps du lait de chamelle

1- Matière première

Les échantillons de lait utilisés dans le cadre de notre étude proviennent de troupeaux de chèvres implantés dans la région du Sud-Est du pays : El-Oued.

1.1- Collecte du lait

Le lait trait à partir de huit chèvres saines. (figure10) ont été collectés durant le mois de Mars 2012 (tableau 12).



Figure 10 : prélèvement du lait de chèvre

Tableau 12 : Echantillons de lait de chèvre

N° donné à l'échantillon	Période de la lactation (mois)	Date de prélèvement
E1	6	25
		28
		31
E2	1	25
		28
		31
E3	10	25
		28
		31
E4	1,5	25
		28
		31
E5	5	25
		28
		31
E6	12	25
		28
		31
E7	11	25
		28
		31
E8	12	25
		28
		31

1.2- Conservation du lait

Les échantillons de lait sont conservés à 4°C et transportés au laboratoire dans des glacières où ils sont analysés.

2- Préparation des échantillons

2.1- Ecrémage du lait

2.1.1- Matériel

- (105ml) du lait
- Flacon en plastique
- Tube conique à bouchon bleu
- Pipette graduée
- Centrifugeuse réfrigérée (Sigma 2-16K)
- spatule

2.1.2- principe

Une séparation mécanique de la matière grasse par centrifugation du lait écrémé par à l'aide des forces centrifuges.

2.1.3- Mode opératoire d'Ecrémage

L'écémage du lait entier est réalisé par centrifugation à 3500 g pendant 20 minutes.

Cette opération est répétée deux fois. (3500g à 2°C pendant 15 minutes) afin d'éliminer totalement la matière grasse (SENOUSSI, 2011)

3- Détermination de la teneur en protéines

3.1 – Matériel

- Sérum albumine bovine (BSA)
- Réactif de Bradford
- Eau distillée
- Bêchers
- Tubes à essai
- Prétoires de tubes
- Micropipette
- Vortex (Snijders- press- to mix 34524)
- Cuvettes
- Spectrophotomètre (JENWAY 6320D)

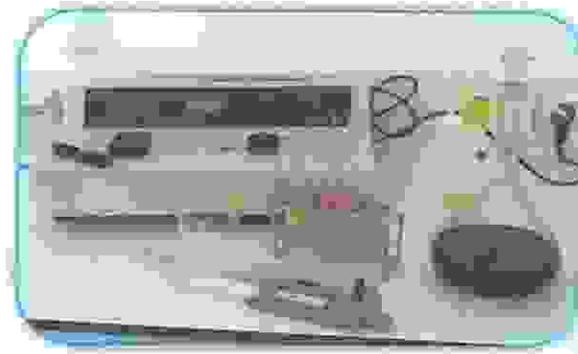


Figure 11 : Matériel nécessaire à la détermination de la teneur en protéines

3.2- Principe

Le taux des protéines dans le lait est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de Bradford (1976).

Formant avec le bleu de comasie G 250 un complexe coloré, présentant un maximum d'absorption à 595nm. L'analyse des protéines est basée sur le changement de l'intensité de la couleur du complexe en réponse à diverses concentrations en protéines (figure 15).



Figure 12: le changement de l'intensité de la couleur du complexe

Une courbe d'étalonnage $DO = f(C)$ a été réalisée par une solution d'albumine sérique bovine (BSA) (voir annexe)

Tableau 13 : l'établissement de la gamme étalon

Tube	1	2	3	4	5	6
concentration (mg/ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
solution mère BSA (μ l)	0	10	20	30	40	50
Eau distillée	50	40	30	20	10	0
Réactif de Bradford	2	2	2	2	2	2

3.3- Mode opératoire

Pour déterminer la concentration en protéines des échantillons, une dilution $\frac{1}{2}$ de chaque échantillon (on prend 25 μ l avec 25 μ l d'eau distillée) auquel on ajoute 2ml du réactif de Bradford (voir annexe), après agitation au vorex et incubation à température ambiante pendant 5minutes, la lecture se fait à la longueur d'ondes de $\lambda = 595\text{nm}$ par rapport au blanc de la gamme étalon. (14)

Le dosage doit être effectué en double essai comme suivant :

Tableau14 : préparation des essais de dosage

Essai	1	2
Echantillon (μ l)	25	25
Eau distillée (μ l)	25	25
Solution du Bradford (ml)	2	2
Lecture DO		
$DO = \frac{DO1+DO2}{2}$		

Les concentrations en protéines des échantillons sont déduites par extrapolation des valeurs de densité optique (DO) sur la courbe d'étalonnage.

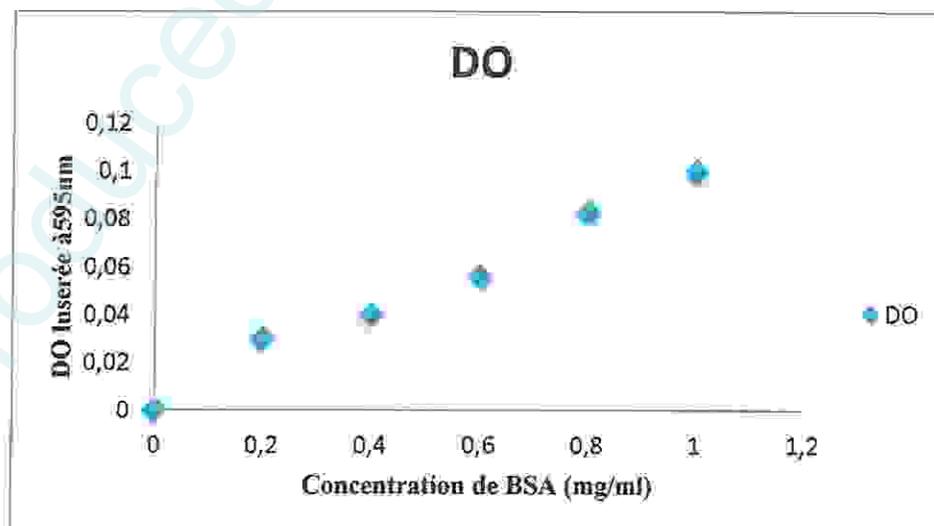


Figure13: Courbe d'étalonnage du dosage de protéines par méthode du Bradford (1976)

4- Relargage par des sels (précipitation au sulfate d'ammonium)

4.1-Matériel

- Solution de sulfate d'ammonium (33% de saturée)
- Ammoniaque
- Eau distillée
- Bêchers
- burette
- Tube conique à bouchon bleu
- pH mètre (HANNA instrumentes pH 209)
- Agitateurs magnétiques (fisher scientific)
- Centrifugeuse réfrigérée (SiGma 2-16K)



Figure 14 : Matériel nécessaire pour le Relargage

4.2- Principe

Les immunoglobulines précipitent quand on augmente la force ionique du milieu à l'aide de sels.

Les concentrations élevées de sulfate d'ammonium déshydratent les groupements hydrophiles des protéines qui deviennent insolubles et précipitent.

En présence de 30-50 % de sulfate d'ammonium les globulines précipitent alors que l'albumine reste en solution. Le culot de globulines est repris dans un peu d'eau distillée et dialysé.

4.3- Mode opératoire

L'échantillon étudié dilué au 1/10 dans un Bécher est placé sur un agitateur magnétique doux (vitesse 100 ou 150) auquel on ajoute goutte à goutte la solution de sulfate d'ammonium de saturation 33% (voir annexe) en laissant le temps à chaque goutte de se disperser totalement avant l'addition d'une nouvelle.

Le précipité ensuite récupéré par centrifugation (2000-10000 x g) est lavé deux à trois fois avec une solution de sulfate d'ammonium au même pourcentage de saturation afin d'éliminer les protéines contaminatrices non précipitées (Géraud Chancelin H., 2007).

5- Détermination de la teneur d'immunoglobuline

5.1- Matériels

- Micropipette
- Tubes à essai
- Prétoires de tubes
- Réactif de Bradford
- votrex
- Cuvettes
- Spectrophotomètre (JENWAY 6320D)

5.2- Principe

Le taux d'immunoglobuline dans le lactosérum est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de Bradford (1976). (Voir dosage des protéines)

5.3- Mode opératoire

Pour déterminer en premier la concentration en protéines de chaque échantillon, on prend 50µl de lactosérum auquel on ajoute 2ml du réactif du Bradford, après agitation au votrex et incubation à température ambiante pendant 5minutes, la lecture se fait à la longueur d'ondes $\lambda = 595\text{nm}$ par rapport au blanc de la gamme étalon.

6- Dialyse

6.1- Matériel

- Tampon PBS
- Membrane de dialyse
- Prétoires de tubes
- Tubes à essai
- Béchers

- Fiolle

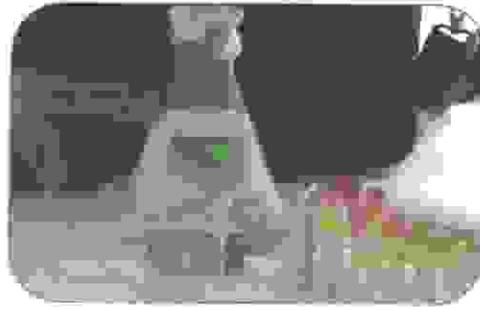


Figure 15 : Matériel nécessaire pour la dialyse

6.2- Principe

La dialyse est basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable.

Les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration. Il y aura donc un déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré. À l'équilibre les concentrations de chaque espèce diffusibles seront égales de part et d'autre.

6.3- Mode opératoire

Pour éliminer les ions ammonium et sulfate, le précipité obtenu par Relargage est redissout dans de l'eau distillée puis dialysé contre le tampon de conservation définitif de l'immunoglobuline purifiée (PBS). (Voir annexe)

La dialyse est effectuée à 4°C contre un volume de tampon largement supérieur à celui de la solution d'immunoglobuline. Le liquide de dialyse doit être changé plusieurs fois durant la dialyse (Gérand Chancelin H., 2007)

7- Test d'agglutination

7.1- Matériel

- Colonies Bactériennes
- Antisérums (lactosérums du lait de chamelle)
- Lames
- Pipette pasteur
- Micropipette
- Eau physiologique
- Bec bunsen

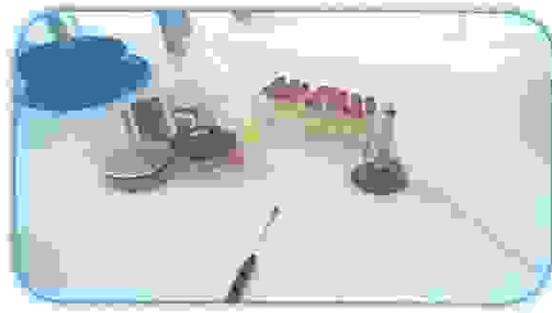


Figure 16 : Matériel pour le test d'agglutination

7.2- principe

Le principe est de réunir des particules visibles à l'œil nu suite à une réaction antigène-anticorps à partir d'une suspension initialement homogène.

7.3- mode opératoire

Sur une lame on a préparé une suspension bactérienne. Après avoir ajouté quelques gouttes d'antisérum puis agiter d'un mouvement rotatif lent, l'absence ou la présence d'agglutination a été vérifiée (15).

Résultats et Discussions

Produced with ScanTopDF

Résultats et discussions

1. Ecrémage du lait

La matière grasse (crème) apparaissant en surface est écartée à l'aide d'une spatule.

2. Détermination de la teneur en protéines

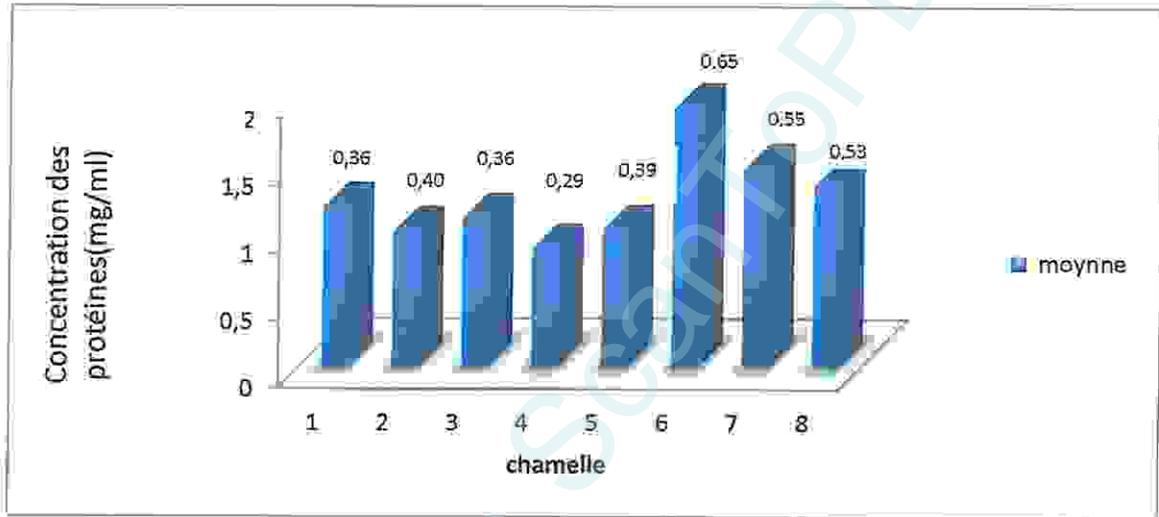


Figure 17: teneur en protéines du lait des chameelles

L'analyse des résultats montre une faible teneur de moyenne en protéines dans l'échantillon E4 (0,89mg/ml) et sont relativement similaires entre (E2) (1,01mg/ml) et (E5) (1,02mg/ml) est égale (1,11mg/ml), tandis que la plus élevée est retrouvée dans E8, E1, E7, E6 et est respectivement de 1.35, 1.41 1.48 et 1.93 mg/ml.

Le taux moyen de la matière protéique total enregistrée dans cette étude (1,28mg/ml) (4,74%) est faible par rapport aux résultats recensés dans la recherche bibliographique (30,77 g/l) (SENOUSSI, 2011), (29g/l) (CHIBAH, 2011), (35,68 g/l)

(SIBOUKEUR, 2009).

Concernant la variation de la teneur protéique, (SIBOUKEUR, 2009) la plus élevée est de 11.6 %, puis diminue jusqu'à 4.6 et 5.7 % en suivant un régime hydraté entre 2.5 et 3.3 %.

Quant à la composition, elle varie en fonction des stades de lactation. Durant les deux premiers mois, elles se caractérisent par une diminution des taux protéiques du lait camelin. Ces derniers atteignent une valeur minimale correspondant au pic de lactation puis on retrouve à la fin de lactation un niveau comparable à celui de départ (figure 17).

3. Relargage par des sels (précipitation au sulfate d'ammonium)

En présence de 30-50 % de sulfate d'ammonium les globulines précipitent. Le culot de globulines est récupéré dans de l'eau distillée.

Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux d'auteurs. (GERAUD CHANCELIN H., 2007) (JEAN-CLAUDE G., GUY R., 2011)

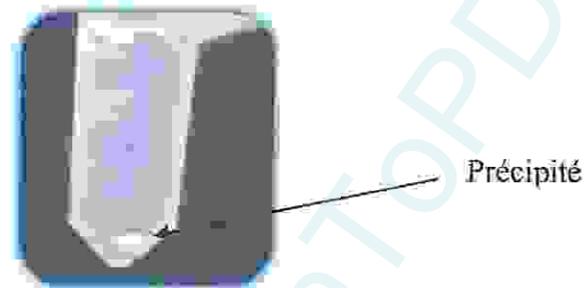


Figure 18 : les précipités obtenus après la centrifugation

4. Détermination de teneur d'immunoglobuline

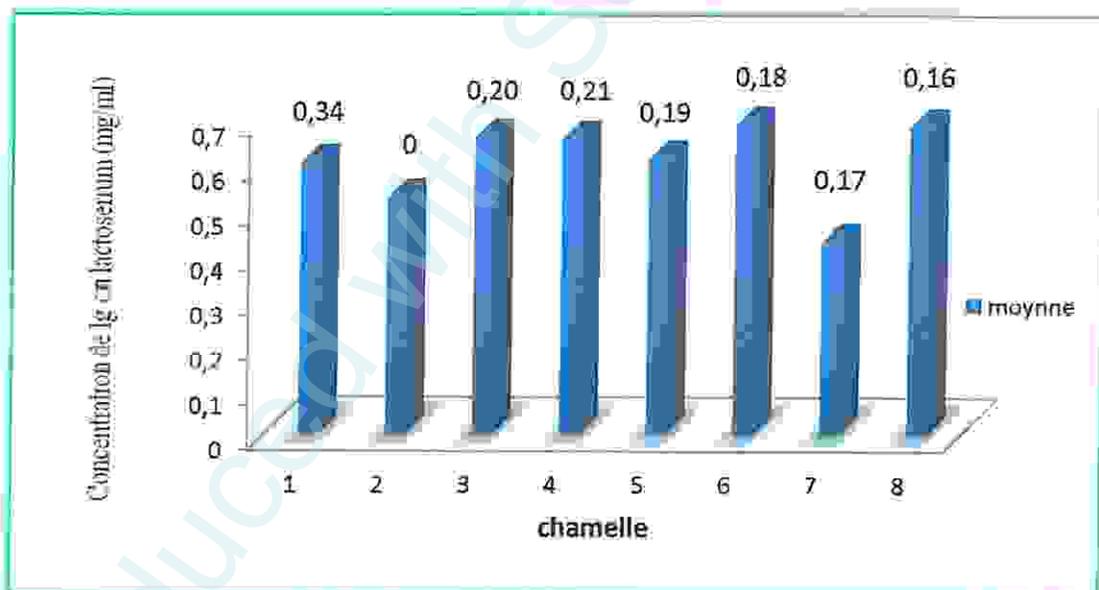


Figure 19 : teneur d'immunoglobuline (IgG) du lait de chamelle

La concentration moyenne en IgG est élevée dans les échantillons (E6, E8) (0,69mg/ml), puis diminue à (0,66mg/ml) dans les échantillons (E3, E4). La concentration continue à diminuer d'une façon remarquable et était à (0,61mg/ml) (E5) et (0,60mg/ml) (E1), tandis qu'elle est plus faible pour E2 et E7 respectivement (0,53 et 0,43mg/ml).

Le taux moyen immunoglobuline (IgG) enregistré dans cette étude (0,61mg/ml) est relativement similaire au résultat de la bibliographie (0.71 mg/ml) (G. KONUSPAYEVA, 2007).

Cette fluctuation de la gamme de concentration en IgG résulte du stade de lactation ; est maximale à la parturition et diminue rapidement après l'accouchement (S.M. AZWAI et al, 1992), mais le taux élevé des IgG pré-colostral peut être preuve du consentement préalable d'une infection intra-utérine (ROLF K. et al, 2001).

5- dialyse

Après l'incubation du sérum dans le PBS, le précipité apparaissant sur la membrane est dissout dans de l'eau distillée.

Le même résultat est trouvé par (GERAUD CHANCELIN H., 2007) ET (JEAN-CLAUDE G., GUY R., 2011) qui a utilisé le boudin de dialyse pour l'élimination des ions ammonium et sulfate.

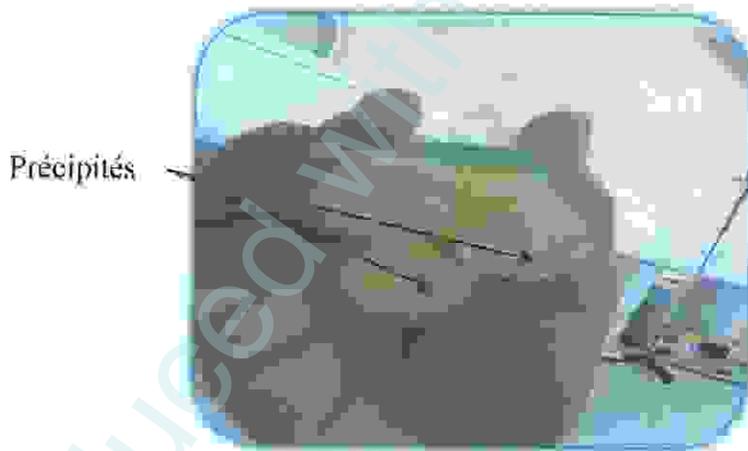


Figure 20: précipités obtenus après la dialyse

6- Test d'agglutination

Tableau 15 : Résultats du test d'agglutination

les antigènes		Agglutination	observation d'agglutina
Bactériens	<i>Escherichia coli</i>	+++	
	<i>streptocoque</i>	++	
	<i>Shigella</i>	+++	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+++	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	
Viraux	de grippe saisonnière	++	

(+++) : Agglutination rapide, (++) : Agglutination assez rapide

On remarque une agglutination immédiate avec les antigènes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella* et *Pseudomonas aeruginosa* par rapport aux *streptocoques*. Tandis qu'elle est moins rapide avec l'antigène virale de la grippe saisonnière.

Ces résultats sont en accord avec ces chercheurs (JANUSZ WESOŁOWSKI ET AL, 2009 ET MARCO, 2011), qui ont déclaré que les VHHs inhibent *E. coli* qui induit des diarrhées et ont été successivement préférées en raison de leur robustesse structurelle supérieure pour inhiber les *Streptocoques* et étant en accord avec (FRANCISCO ET AL, 2011) qui ont déclaré avec les simples anticorps de camélidés neutralisant les virus à brin négatif est la preuve pour les nouveaux médicaments antigrippaux. L'affinité de simple anticorps de camélidés avec les antigènes des certaines bactéries pathogènes résulte de la coordination aux protéines exprimées par les bactéries (MARCO, 2011) et une accessibilité privilégiée avec les épitopes viraux. (JANUSZ WESOŁOWSKI ET AL, 2009).

Conclusion

Produced with Scantopdf

Conclusion

Depuis la découverte des anticorps à chaîne lourde en 1993 jusqu'à nos jours, le domaine des anticorps à fragments unique a connu d'énormes progrès. Les VHHS ont plusieurs avantages pour les applications biotechnologiques.

C'est dans un cadre d'engouement qu'à partir de ce mini projet nous avons étudié les effets thérapeutiques des immunoglobulines pour une connaissance large et permettant aussi à la postérité d'en bénéficier.

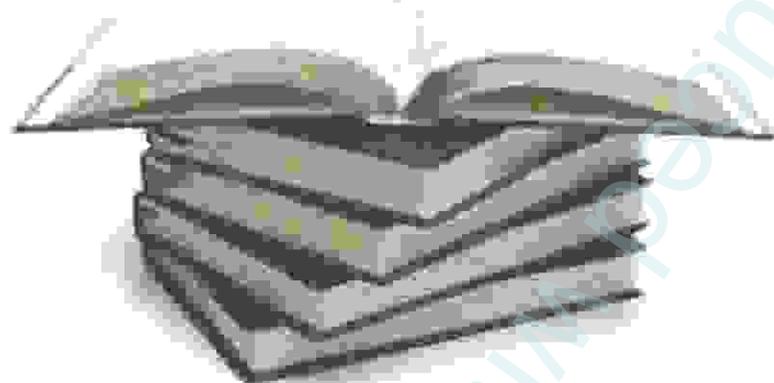
Concernant les protocoles d'isolement mis en œuvre nous nous sommes référés des travaux dans différents domaines assez similaires étant donné que le nombre d'étude réalisée sur le lait camelin est limité.

Le dosage protéique réalisé après l'écémage a permis de conclure que, le lait camelin présente un taux faible d'immunoglobuline vu le nombre d'échantillons utilisés. La purification réalisée par relargage des sels avec la précipitation au sulfate d'ammonium a permis d'obtenir une solution d'antisérum homogène.

Les tests d'agglutinations réalisés sur l'Escherichia coli, la streptocoques, la Shigella, la Pseudomonas, le virus de la grippe saisonnière et la Staphylococcus aureus ont permis de déterminer l'efficacité des immunoglobulines camelines, de comprendre que leur vitesse d'agglutination varie d'une espèce à une autre et d'évaluer leur affinité.

Au regard de ces multiples qualités, nous pouvons dire que les nanobodies présentent une véritable porte de sortie pour les différentes maladies menaçant notre quotidien. Les nanobodies sont facilement exprimée des cellules microbiennes et peuvent être immédiatement projeté fonctionnelle pour l'activité dans un essai biologique.

Les études permettront de confirmer leur performance, avantages et leur efficacité dans l'immun diagnostic et / ou la thérapie du cancer. Apporter aux Nanobodies un terrain avec des spécificités à d'autres cibles biologiques pertinentes sera un autre défi pour l'avenir, non seulement pour traiter des ententes fondamentales au sujet de leur caractéristiques moléculaires et les stabilités structurelles, mais aussi à les positionner en tant que produits pharmaceutiques cliniquement utiles.



Références

bibliographiques

1. Livres et publication

- (1). ANNA MARIA MATILDA FORSMAN, 2008. Characterisation of llama antibody fragments able to act as HIV-1 entry inhibitors. Thèse de doctorat en philosophie université London
- (2). AYADI M., HAMMADI M., KHORCHANI T., 2009. D'où vient le lait trait d'une chamelle.les camélidés. Articles du mois. p1452-1459
- (3). BARAL TN, MAGEZ S, STIJLEMANS B, CONRATH K, VANHOLLEBEKE B, PAYS E, MUYLDERMANS S, DE BAETSELIER P (2006). Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med.* p580–584
- (4). BOUDIER J. F. et LUQUET F. M., 1981. Dictionnaire laitier. Paris : tec & doc-Lavoisier
- (5). CATHERINE BAROIN, 2010. Chamelle, lait de vache : qualités et usages chez les Toubou (Tchad Niger). Colloque ocha « *Cultures des laits du monde* ». Session 2
- (6). CHAMES P, VAN REGENMORTEL M, WEISS E, BATY D., 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol.* P 220-33
- (7). CHIBAH, AMMAR, 2011. Extraction et caractérisation électrophorétique des protéines membranaires du globule gars du lait de chamelle. Thèse de magistère en sciences Biologiques. Université TIZI OUZOU. 95p
- (8). DIA, M.L ET AHMED O. MOHAMED, 2011. Application d'une technologie de fabrication de fromage à partir du lait pur de chamelle en Mauritanie. P 3
- (9). ANTONOT E., MARCHAL R., 1998. Chromatographie. rapport de stage. Lycée Louis Vincent - METZ
- (10). FAYE B., GRECH S. & KORCHANI T., 2004. Le dromadaire, entre féralisation et intensification. *Anthropozoologica.* P8
- (11). FRANCISCO MIGUEL LOPEZ CARDOSO, LORENA ITATI IBÁÑEZ, BERT SCHEPENS AND XAVIER SAELENS, 2011. Single Domain Camelid Antibodies that Neutralize Negative Strand Viruses. *Antiviral Drugs – Aspects of Clinical Use and Recent Advances.* p1516170
- (12). GERAUD CHANCELIN HELLOW TEJIOZEM, 2007. Utilisation des produits biologiques d'origine équine en thérapeutique humaine. Thèse de Doctorat en sciences et médecine vétérinaires. Université de Dakar

- (13). **G. KONUSPAYEVA, B. FAYE, G. LOISEAU, D. LEVIEUX, 2007.** Lactoferrin and Immunoglobulin Contents in Camel's Milk (*Camelus bactrianus*, *Camelus dromedarius*, and Hybrids) from Kazakhstan. *Jornrl of Dairy Science*
- (14). **HARMSSEN MM, VAN SOLT CB, HOOGENDOORN A, VAN ZIJDERVELD FG, NIEWOLD TA, VAN DER MEULEN J, 2005b.** Escherichia coli F4 fimbriae specific llama single-domain antibody fragments effectively inhibit bacterial adhesion in vitro but poorly protect against diarrhoea. *Vet Microbiol.* P 89–98
- (15). **IKBEL ACHOUR, PATRICIA CAVELIER, MAGALI TICHIT, CHRISTIANE BOUCHIER, PIERRE LAFAYE, AND FRANC OIS ROUGEON1, 2008.** Tetrameric and Homodimeric Camelid ighs Originate from The Same igh Locus. *The Journal of Immunology.* p2001-2009
- (16). **JANUSZ WESOLOWSKI · VANINA ALZOGARAY · JAN REYELT · MANDY UNGER · KARLA JUAREZ, 2009.** Single domain antibodies: promising experimental And therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol.* p 157–174
- (17). **JEAN-CLAUDE GARAUD, GUY ROUSSEL, 2011.** Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. Edition IHC.odt.p189-191
- (18). **KADIM, IT; MAHGOUB, O; AL MARZOOQI, W; AL ZADJALI, SANNAMALAI, K; MANSOUR, MH, 2006.** Effects of age on composition and quality of muscle longissimus thoracis of the Omani Arabian camel (*Camelus dromedaries*). *Nationa Agricultural of Library.* p619-625
- (19). **KATJA CONRATH, CECILE VINCKE, BENOIT STIJLEMANS JOOST SCHYMKOWITZ, KLAAS DECANNIERE, LODE WYNS SERGE MUYLDERMANS, REMY LORIS, 2005.** Antigen Binding and Solubility Effects upon the Veneering of a Camel VHH in Framework-2 to Mimic a VH. *J. Mol. Biol.* p 112–125
- (20). **Marco, 2011.** Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments. *Microbial Cell Factories.* 14p
- (21). **MATHIEU J., 1998.** Initiation à la physicochimie du lait. Tec & doc-Lavoisier. p 221
- (22). **MIDINHOUEVI BASILE, 2007.** Screening d'anticorps VHH de chameau pour leur utilisation dans l'elisa sandwich pour la détection d'antigènes de *cysticercus cellulosae*. Thèse de master de science en sante animale tropicale (mssat). A l'institut de medecine tropicale – belgeque.30p
- (23). **M. KHASKHELI, M.A. ARAIN, S. CHAUDHRY, A.H. SOOMRO, T.A.**

- QURESHI, 2005**, Physico-Chemical Quality of Camel Milk. *Journal of agriculture & social sciences*
- (24). **M. G. EL-ZINEY, A. I. AL-TURKI, 2007**.microbiological quality and safety assessment of Camel milk (*camelus dromedaries*) in Saudi Arabia (QASSIM REGION) . *Applied ecology and environmental research*.p115-122
- (25). **M. M. HARMESSEN H. J. DE HAARD, 2007**. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Jornal of Appl Microbiol Biotechnol*. 2007 November.p13–22)
- (26). **NARJISSE, H., 1989**. Nutrition et production laitière chez le dromadaire. *Options Méditerranéennes*. p163-166
- (27). **NICK DESCHACHT, KURT DE GROEVE, CECILE VINCKE, GEERT RAES, PATRICK DE BAETSELIER AND SERGE MUYLDERMANS, 2010**. A Novel Promiscuous Class of camelidsingle-Domain Antibody Contributes to the Antigen-Binding Repertoire. *The Journal of Immunology* .p5696-5704
- (28). **OMER, R. H., A. H. ELTINAY, 2008**. Microbial quality of camel's raw milk in central & southern regions of United Arab Emirates. *Emir. J. Food Agric*. p76-83
- (29). **ROLF KAMBER, ZAKARIA FARAH, PETER RUSCH, MICHAEL HASSIG,2001**. Studies on the supply of immunoglobulin G to newborn camel calves (*Camelus dromedarius*). *Journal of Dairy Research*.p1-7
- (30). **R. YAGI, 1982**. Camels and camel milk. .Edition Rome, Italy. p26- 93
- (31). **SARAH DE CLERCQ ,2010**. Karakteriseren van lama VHH antilichamen (nanobodies) met toepassingen in kanker. Thèse de master des sciences biomédicales: Université GENT.49p
- (32). **S. ELLOUZE et M. KAMOUN, 1989**. Évolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de la lactation. *Options Méditerranéennes*. p 307-311
- (33). **SENOUSSI, CHAHRA, 2011**. Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud Algérien : essais de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone. Thèse de magistère en sciences Biologiques. Université de TIZI OUZOU.76p
- (34). **SIBOUKEUR, OUMELKHEIR, 2009**. Etude du lait camelin collecté localement : Caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques ; aptitudes à coagulation. Sciences alimentaires. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique EL-HARRACH-ALGER. 128p

- (35). **S.M. AZWAI, S.D. Carter, Z. Woldehiwet, 1992.** Immunoglobulins of camel (*Camelus dromedarius*) colostrum. *Journal of comparative pathology*. p273-282
- (36). **S. M. SHAMSIA, 2009.** Nutritional and therapeutic properties of camel and human milks. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*. p. 052-058
- (37). **S. RAGHVENDAR, S.K. SHUKLA, M.S. SAHANI, C. BHAKAT, 2004.** Chemical and physico-chemical properties of camel milk at different stages of lactation. *Saving the Camel and Peoples' Livelihoods Building a Multi-Stakeholder Platform for the Conservation of the Camel in Rajasthan*. p45
- (38). **STEFAN KAPPELER, ZAKARIA FARAH, ZDENKO PUHAN, 1997.** Sequence analysis of *Camelus dromedarius* milk caseins. *Journal of Dairy Research Printed in Great Britain*. p209-222
- (39). **TOURETTE, I., 2002.** Etude de l'influence des pratiques de traite et d'élevage sur la qualité sanitaire du lait de Chamelle -En république islamique de Mauritanie. Thèse doctorat en sciences direct Université de Toulouse. 60p
- (40). **T.STAHL, H.P.SALLMANN, R.DUEHLMEIR, U.WERNERY, 2006.** selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrum. *journal of camel practice and kesharch*. p 53-57
- (41). **VALÉRIE EBERLEIN FONTAINEBLEAU, 2007.** Hygienic status of camel milk in Dubai (United Arab Emirates) under two different milking management systems. Thèse de Doctorat en Sciences Directe. Institut für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs Universität München. 100p
- (42). **WAEI MAHMOUD, 2008.** Déviation de la réponse immune à visée d'immunointervention à l'aide de protéines recombinantes hétérofonctionnelles. Thèse de Doctorat en sciences Immunologie et Biotechnologie. Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE (FRANCE) et Université de MONASTIR (TUNISIE).
- (43). **YAGIL R., SARAN A., ETZION Z., 1984.** Camel milk for drinking only. *Comp. Biochem. Physiol.*, p 263-266
- (44). **Z. FARAH1, R. RETTENMAIER2 and D. ATKINS, 1992.** Vitamin Content of Camel Milk. p30-33

2. Site internet

(1) **DIFFUSION PHOTO MAGAZINE. ADAPTATION : LE DROMADAIRE, ROI DU DÉSERT**

<http://dp.mariottini.free.fr/carnets/dubai/desert/dromadaire.htm> (14.02.2012)

(2) **Association Dromasud. SOINS DES DROMADAIRES**

<http://dromasud.fr/4.html>, (14/02/2012)

(3) **animaux {.org}.Dromadaire**

[animaux.org /dromadaire.htm](http://animaux.org/dromadaire.htm), (31.01.2012)

(4) **Sahara-Nature. Camelus dromedarius-le dromadaire**

www.sahara-nature.com/animaux.php?specie=Camelus_dromedarius (31.01.2012)

(5) **Parc Zoologique de Fréjus. Dromadaire**

<http://www.zoo-frejus.com/animal.php?lang=fr&animal=30> (02.02.2012)

(6) **QuestMachine. le dromadaire**

http://www.questmachine.org/Presentation_projet (14.12.2012)

(7) **Encyclopédie Universalis. CHAMEAU**

<http://www.universalis.fr/encyclopedie/chameau/> (14.12.2012)

(8) **La Vie Animale. Le dromadaire**

http://www.Vie-Animale.com/2012.09.26/le_gorille (17.01.2012)

(9) **Art-objets. Le Chameau - Le Dromadaire**

http://www.art-objets.fr/Le_Chameau_-_Le_Dromadaire_1_1_60.php.htm

(10) **Extrait d'Isalan. La vie au campement nomade : la traite**

<http://www.masnat.fr/chroniques/LA%20VIE%20AU%20CAMPEMENT%20NOMADE.htm>
(31.01.2012)

(11) **Camel milk usa. The Use of Camel Milk in Medical Studies**

<http://www.camelmilkusa.com/> (24.02.2012)

(12) **La FAO. Laits d'autres animaux d'élevage**

<http://www.fao.org/docrep/t4280f/T428F00.htm> (24.02.2012)

(13) **BCM-514. Biochimie des protéines**

<http://www.usherbrooke.ca/bcm-514-R/5e.html> (19.04.2012)

(14) **Dosages colorim. Détermination de la concentration de protéines par dosages colorimétriques**

<http://www.pharmaceutical-int.Com/article/bradford-protéin-essay-evaluation-software.html>

(15) **STAPH AUREUS FUMOUEZE**

<http://Creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.0/fr/>

Annexe

Produced with ScanTOPDF

Annexe

Réactif de Bradford :

Bleu de comassie G250.....	100mg
Éthanol.....	50ml
Acide orthophosphorique.....	100ml
Eau distillée p.s.q.....	l

Solution mère de BSA :

Albumine sérique bovine.....	3mg
Eau distillée.....	3ml

Solution de sulfate d'ammonium (33%) de saturation

- sulfate d'ammonium 18,58g
- Eau distillée 100ml

Quantité de sulfate d'ammonium (en g) à ajouter pour chaque 100ml de solution %saturation finale en sel																		
%	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
0	11	14	17	20	22,9	26,2	30	33	36,6	40,4	44,2	48,3	52,3	56,7	61,1	65,9	70,7	
5	8	11	14	17	20	23,2	27	30	33,6	37,3	41,1	45	49,1	53,3	57,8	62,4	67,1	
10	5,4	8,2	11	14	17,1	20,3	24	27	30,5	34,2	37,9	41,8	45,8	50	54,4	58,9	63,6	
15	2,6	5,5	8,3	11	14,3	17,4	21	24	27,5	31	34,8	38,6	42,6	46,6	51	55,5	60	
20		2,7	5,6	8,4	11,5	14,5	18	21	24,4	28	31,6	35,4	39,2	43,3	47,6	51,9	56,5	
25			2,7	5,7	8,5	11,7	15	18	21,4	24,8	28,4	32,1	36	40,1	44,2	48,5	52,9	
30				2,8	5,7	8,7	12	15	18,4	21,7	25,3	28,9	32,8	36,7	40,8	45,1	49,5	
35					2,8	5,8	8,8	12	15,3	18,7	22,1	25,8	29,5	33,4	37,4	41,6	45,9	
40						2,9	5,9	9	12,2	15,5	19	22,5	26,2	30	34	38,1	42,4	
45							2,9	6	9,1	12,5	15,8	19,3	22,9	26,7	30,6	34,7	38,8	
50								3	6,1	9,3	12,7	16,1	19,7	23,3	27,2	31,2	35,3	
55									3	6,2	9,3	12,9	16,3	20	23,8	27,7	31,7	
60										3,1	6,3	9,6	13,1	16,6	20,4	24,2	28,3	
65											3,1	6,4	9,8	13,4	17	20,8	24,7	
70												3,2	6,6	10	13,6	17,3	21,2	
75													3,3	6,7	10,2	13,9	17,6	
80														3,3	6,8	10,4	14,1	
85															3,4	6,9	10,6	
90																3,4	7,1	
95																	3,5	

Tampon PBS (pH=7)

Phosphate disodique (Na_2HPO_4).....	1,5g
Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4).....	0,2g
Chlorure de sodium (NaCl).....	8g
Chlorure de potassium (KCl).....	0,2g
Eau distillée.....	1 litre

Produced with ScanTOPDF