

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche scientifique
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI TIZI-OUZOU



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie

Rapport de fin d'études
En vue d'obtention du diplôme de MASTER II en biologie
Option : Biochimie appliquée

THEME

**Evaluation physicochimique de
quelques produits alimentaires
commercialisés**

Travail réalisé par :

-BACHIRI Sabrina
-ZAMOUM Nadja

Devant le jury :

Présidente de jury : M^{me} SENANI-OULARBI Nassima

Promotrice : M^{elle} DERMECHE Samia

Examinatrice : M^{me} GHEZALI-SENOUSSI Chahra

Examineur : M^r TITOUCHE Yacine

Maitre assistante classe A

Maitre assistante classe A

Maitre assistante classe A

Maitre assistant classe A

Promotion 2013-2014

REMERCIEMENTS

Avant tout on tient à remercier celui qui nous a créé, protégé, aidé et celui qui nous a donné la patience et le courage pour pouvoir accomplir notre rapport de Master II dans les meilleures conditions en disant «Dieu Merci ».

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de M^{elle} DERMECHE Samia, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant notre préparation de ce mémoire.

On tient également à remercier :

La présidente Mme SENANI-OULARBI Nassima pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Nos s'insère remerciements s'adressent aux autre membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail :

-Mme GHEZALI-SENOUSSI Chahra

-Mr TITOUCHE Yacine

On remercie aussi, tous ceux et toutes celles qui nous ont aidé ou encouragé, à entreprendre et achever ce rapport, qui est notre modeste contribution au domaine de la Recherche Scientifique.

Dédicaces

**Avec un grand plaisir que je dédie ce travail à mes très chers
parents qui m'ont souvent encouragé.**

-A mes frères et mes sœurs.

-A ma grande mère.

-A ma très chère binôme Sabrina ainsi qu'à toute sa famille.

**-A mes amis(es) : Ghnima, Karima, Kanza, Nacera, Sonia, Samia,
Souhila, Ouiza, Djamila et Rabah.**

A toute la promotion MII Biochimie appliquée 2013-2014.

Nadjia

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir ; à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet, a toi mon très cher mari Ali. Ma vie à tes côtés est remplie de belles surprises, tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, à tous mes frères et mes sœurs (Rachid, Hamid, Fazia, Dehbia, Hassina et Nassima), je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

A toute ma famille et ma belle famille, sans oublier les enfants Maya, Amine, Manis et Samy.

A ma binôme Nadjia ainsi qu'à toute sa famille.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Sabrina



Sommaire

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

1.1. Introduction.....	1
1.2. Généralités.....	1
1.2.1. Définition.....	1
1.2.2. Classification	1
1.2.2.1. Lipides simples	1
1.2.2.1.1. Acides gras	1
1.2.2.1.2. Glycérides	3
1.2.2.1.3. Cérides	3
1.2.2.1.4. Stérois.....	3
1.2.2.2. Lipides polaires.....	4
1.2.2.2.1. Phospholipides	4
1.2.2.2.2. Phytostérois	6
1.2.3. Propriétés physico-chimiques	6
1.2.4. Rôles biologiques.....	8
1.3. Méthodes d'extraction.....	10
1.3.1. Extraction directe	10
1.3.2. Extraction après désagrégation	10
1.3.3. Extraction par centrifugation après désagrégation	10
1.3.4. Autres méthodes	11
1.4. Méthodes de dosage.....	12
1.4.1. Dosage des acides gras libres	12
1.4.2. Dosage des triglycérides	12
1.4.3. Dosage du cholestérol.....	13
1.4.4. Dosage des phospholipides	14
1.5. Conclusion.....	15

II. Stage pratique

2.1. Introduction	16
2.2. Matériel et méthodes	16
2.2.1. Matériel.....	16
2.2.1.1. Matériel et appareillage.....	16
2.2.1.2. Réactifs.....	16
2.2.1.3. Echantillons utilisés	17

2.2.2. Méthodes expérimentales	17
2.2.2.1. Méthodes physicochimique	17
2.2.2.1.1. Dosage de la vitamine C dans un jus d'orange	17
2.2.2.1.2. Détermination des indices d'acidité et d'iode d'une matière grasse	18
2.2.2.1.2.1. Indice d'acide	18
2.2.2.1.2.2. Indice d'iode	18
2.2.2.1.3. Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS).	19
2.2.2.1.4. Dosage des protéines : méthode de LOWRY et <i>al</i> (1951).....	20
2.2.2.2. Méthodes de séparation et purification (méthodes chromatographiques) .	20
2.2.2.2.1. Hydrolyse acide des sucres	20
2.2.2.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	21
2.2.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200	21
2.2.2.3. Méthodes de caractérisation (méthodes électrophorétiques)	22
2.2.2.3.1. Hydrolyse enzymatiques des protéines du lait par la papaïne.....	22
2.2.2.3.2. Électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native).....	24
2.2.2.3.3. Électrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes (PAGE SDS)...	24
2.3. Résultats et discussion	27
2.3.1. Qualité physicochimique	27
2.3.1.1. Teneur en vitamine C dans un jus d'orange	27
2.3.1.2. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse.....	28
2.3.1.2.1. Indice d'acide	28
2.3.1.2.2. Indice d'iode.....	28
2.3.1.3. Teneur en glucides dans un jus d'orange : méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)	29
2.3.1.4. Teneur en protéines dans le jus lacté : méthode de LOWRY et <i>al</i> (1951)	30
2.3.2. Méthodes de séparation et purification (méthodes chromatographiques)	31
2.3.2.1. Hydrolyse acide des sucres	31
2.3.2.2. Isolement des monosaccharides par chromatographie sur couche mince(CCM).	31
2.3.2.3. Isolement des séroprotéines par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200.....	33

2.3.3. Méthodes de caractérisation (méthodes électrophorétiques)	34
2.3.3.1. Hydrolyse enzymatiques des protéines du lait par la papaïne	34
2.3.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des séroprotéines bovines et caprines en conditions natives (PAGE-native)	34
2.3.3.3. Isolement et caractérisation électrophorétiques des hydrolysats de protéines sériques bovines par la papaïne en conditions dénaturantes (PAGE-SDS).....	36
2.4. Conclusion.....	37

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

AG :	Acide gras
AGI :	Acide gras insaturé
AGMI :	Acide gras mono-insaturé
AGPI :	Acide gras poly-insaturé
AGS :	Acide gras saturé
BSA :	Albumine Sérique Bovine
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CG :	Corps gras
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
Da :	Dalton
DAG :	Diacylglycérol
DCPIP :	2,6 dichlorophénol indophenols
DNS :	Acide 3,5 dinitrosalicylique
Fru :	Fructose
Gal :	Galactose
Glc :	Glucose
KDa :	Kilo Dalton
LABAB :	Laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies
M :	Molaire
MAG :	Monoacylglycérol
PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH :	potentiel d'hydrogène
pHi :	pH isoélectrique
PL :	Phospholipide
RMN :	Résonnance magnétique nucléaire
Sac :	Saccharose
SDS :	Dodecyl sulfate de sodium
TAG :	Triacylglycérol
TCA :	Acide trichloracétique
V/V :	Volume/volume
V/V/V :	Volume/volume/ volume

LISTES DES TABLEAUX, FIGURES ET ANNEXES

N° du tableau	Titre du tableau	page
I	Formules et structures de quelques AG.	02
II	pH et les teneurs en vitamine C (mg/l) dans différents jus de fruits.	27
III	Indices d'acide et d'iode dans différentes matières grasses.	29
IV	Teneurs en glucides dans différents échantillons de jus.	30
V	Teneurs en protéines dans différents échantillons.	31
VI	Distances parcourues par les différents monosaccharides par CCM.	32

N° de figure	Titre de la figure	page
01	Structure simplifiée d'un triacylglycérol.	03
02	Structure de cholestérol.	04
03	Structure de phospholipide.	05
04	Structure des glycérophospholipides.	05
05	Structure des sphingolipides.	06
06	Principe de l'hydrolyse.	08
07	Réaction de l'oxydation de la vitamine C.	18
08	Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.	19
09	Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme sucre de référence.	19
10	Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de LOWRY et <i>al</i> (1951), réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence.	20
11	Plaque de chromatographie sur couche mince montrant la migration des standards (Glc, Gal et Fru) et du saccharose.	32
12	Photographie d'une unité de chromatographie basse pression.	21
13	Les étapes suivies de l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne.	22
14	Dépôt des échantillons en électrophorèse.	23
15	Photographie d'une unité d'électrophorèse.	24
16	Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).	25
17	Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.	26
18	Chromatogrammes des protéines sériques bovines et caprines sur séphacryl S200.	33
19	Electrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T= 12 %, C=2,7 %.	36
20	Eléctrophorégramme des hydrolysats (caséines lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; Gel de concentration (T=4% et C=2,7%), gel de séparation (T=17% et C=2,7%).	37

N° de l'annexe	Titre de l'annexe
1	Protocole de détermination de la teneur en vitamine C.
2	Protocole de détermination des indices d'acidité et d'iode des M.G.
3	Protocole suivi pour le dosage des glucides.
4	Protocole de détermination des teneurs en protéines.
5	Protocole suivie pour l'hydrolyse acide des sucres.
6	Les densités optiques des fractions éluées par chromatographie (protéines sériques bovines).
7	Les densités optiques des fractions éluées par chromatographie (protéines sériques caprines lyophilisées).
8	Préparation des solutions tampons pour l'électrophorèse en conditions natives et dénaturantes.

Résumé

Les lipides résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par une liaison ester ou amide, et sont subdivisés en lipides simples, qui sont neutres (Glycérides, cérides, stérides) et lipides complexes (phospholipides, glycérophospholipides, sphingolipides).

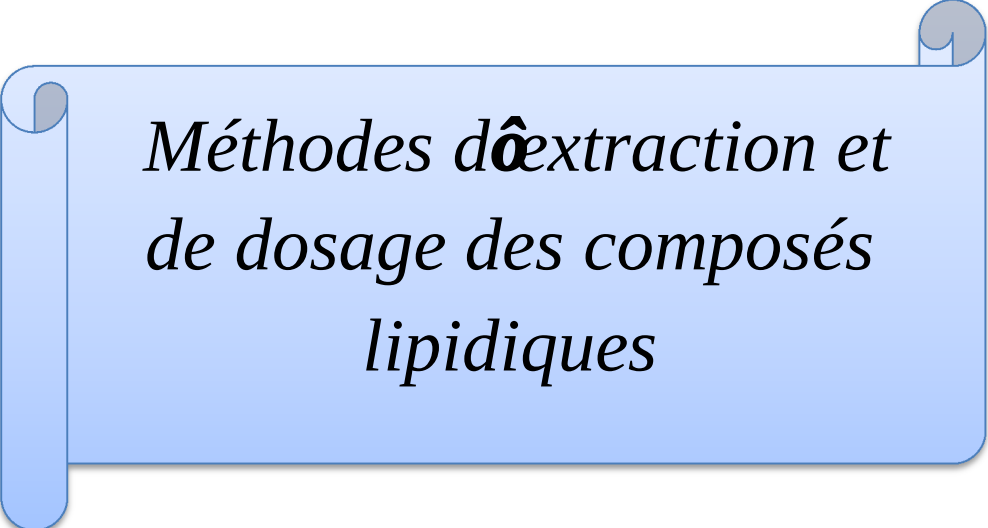
Pour extraire ces lipides plusieurs méthodes d'extraction sont utilisées (extraction directe, extraction après désagrégation, extraction par centrifugation après désagrégation).

De nombreuses méthodes de dosages (enzymatiques, colorimétriques, chimiques, chromatographiques) sont employées pour quantifier et analyser les différentes fractions lipidiques continuent d'être employées pour des études plus fines.

Mots clés : lipides, extraction, dosage.

1. Synthèse bibliographique

Thème



*Méthodes d'␣extraction et
de dosage des composés
lipidiques*

I. Synthèse bibliographique

1.1. Introduction

Le terme de «lipides» pris dans son sens actuel recouvre des substances appelées communément huiles, graisses, cires et bien d'autres composants cellulaires plus cachés, lesquels ont tous en commun d'être insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques, tels que l'éther ou chloroforme. Les lipides répondant à cette définition furent également définis comme des substances naturelles, fossiles ou actuelles, ayant une chaîne carbonée, linéaire ou cyclique, d'au moins dix atomes de carbone (CLAUDE LERAY, 2010).

Selon FAO (1981), il existe deux types de lipides dans les aliments, les lipides visibles et les lipides invisibles. Les premiers sont ceux que l'on voit distinctement comme huile dans une vinaigrette, dans une mayonnaise...etc. Les lipides sont dit invisibles car ils font partie intégrantes de la composition d'un produit alimentaire. C'est cette dernière classe qui pose problème aux consommateurs qui ne peuvent pas facilement juger la quantité de lipides qu'ils ingèrent.

1.2. Généralités

1.2.1. Définition

Les lipides sont des dérivés naturels d'acides gras condensés avec des alcools ou des amines. Ce sont des composés énergétiques puisque l'oxydation d'un gramme de lipides libère 38kj. Ce sont des molécules organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène, chloroforme et l'éther. Ils sont caractérisés par la présence dans la molécule d'au moins un acide gras ou chaîne polycarbonée (TOUITOU, 2005).

1.2.2. Classification

Selon FRENOT et VIERLING (2001), les lipides sont classés en deux catégories, les lipides simples et les lipides complexes.

1.2.2.1. Lipides simples

Ce sont des composés ternaires formés de carbone(C), hydrogène(H) et oxygène(O).

Les acides gras (AG) naturels sont des acides organiques, monocarboxyliques à chaîne hydrocarbonée longue, généralement linéaire, à nombre pair de carbone, formées par la condensation de l'acétyl CoA (FRENOT et VIERLING, 2001). Leur formule générale est $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n \text{COOH}$, elle peut être dépourvue de toute double liaison et dans ce cas, les acides gras sont dits saturés (AGS). Lorsqu'elle présente une ou plusieurs double(s) liaison(s), les acides gras sont alors désignés respectivement par les termes de monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI). La fonction acide carboxylique réagit avec les alcools et les amines

pour former des esters et des amides, c'est sous cette forme qu'ils existent dans les aliments (FRENOT et VIERLING, 2001).

Les acides gras insaturés (AGI) naturels sont plus abondants que les AGS, tout particulièrement dans les plantes. Il y a généralement entre 1 et 4 doubles liaisons dans un AGI. Cependant dans les AG des microorganismes il est exceptionnel d'en observer plus d'une double liaison.

Les différences sont le plus souvent dans la configuration cis. Cette configuration provoque dans la chaîne des AG une pliure, ou courbure qui a de très importantes conséquences pour la structure des membranes biologiques. Les chaînes des AGS peuvent se rapprocher sur presque toute leur longueur et former dans certaines conditions des ensembles compacts, des rangées ordonnées et rigides. Par contre, du fait de leur courbure, les AGI lorsqu'ils sont présents empêchent la formation de ces ensembles compacts, ils se forment des agrégats plus fluides et flexibles (GARRETT et GRISHAM, 2000).

Les mammifères ne synthétisent pas certains AG pourtant indispensables pour leur croissance et leur vie. Ces AG essentiels comprennent surtout l'acide linoléique et l'acide γ -linolénique, les mammifères doivent trouver ces AG dans leur nourriture (GARRETT et GRISHAM, 2000). Les AG peuvent être dénommés ou décrits de plusieurs façons (tableau I).

Tableau I : Formules et structures de quelques AG (GARRETT et GRISHAM, 2000).

AG biologiques les plus communs				
Nombre d'atome de carbone	Nom commun	Nom systématique	Symbole	Structure
Acides gras saturés				
12	A.laurique	A.dodécanoïque	12 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
14	A.myristique	A.tétradécanoïque	14 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
16	A. palmitique	A.héxadécanoïque	16 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
18	A. stéarique	A.octadénoïque	18 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
20	A.arachidique	A.cicosanoïque	20 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
22	A.bébénique	A.docosanoïque	22 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$
24	A.lignocérique	A.tétracosanoïque	24 : 0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$
Acides gras insaturés (pour toutes les doubles liaisons les substituants sont en cis)				
16	A.palmitoléique	A.9-héxadécénoïque	16 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	A. oléique	A.9-octadécénoïque	18 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
18	A. linoléique	A.9,12-octadécadiénoïque	18 : 2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18	A. α -linolénique	A.9,12,15-octadécatriénoïque	18 : 3	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
18	A. γ -linolénique	A.6,9,12-octadécatriénoïque	18 : 3	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$
20	A.arachidonique	A.5,8,11,14-cicosatétrénoïque	20 : 4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
24	A.nervonique	A.15-tétracosénoïque	24 : 1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

1.2.2.1.2. Glycérides

Ce sont des esters d'AG et de glycérol, ils sont très apolaires, il existe trois types : Triacylglycérols (TAG), Diacylglycérols (DAG) et Monoacylglycérols (MAG). La structure générale de TAG est représentée ci-dessous.

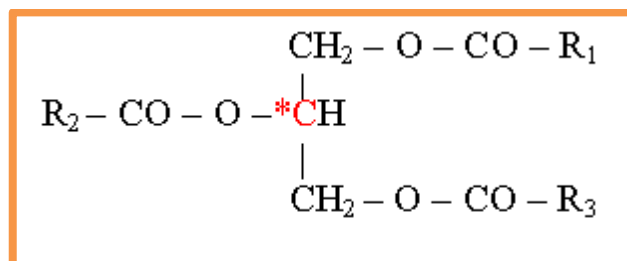


Figure 01: Structure simplifiée d'un triacylglycérol.

R : désigne une chaîne carbonée d'un acide gras.

Les TAG de végétaux sont riches en acides gras insaturés. La position centrale β de la molécule (TAG) est occupée principalement par un AGI (R_2). Les positions α et α' sont occupées soit par les AGS ou AGP (R_1) et (R_3) (GUIGNARD, 2000). Les TAG représentent une importante réserve d'énergie, lorsqu'ils sont localisés sous la peau, ils apportent une protection efficace contre le froid (WEINMAN et MEHUL, 2004). Les DAG sont présent surtout dans les graines végétales, leur principale fonction dans l'organisme est de constituer des réserves énergétiques. Certains DAG membranaires jouent le rôle de molécules informationnelles (second messagers) (DUBOIS, 2005).

1.2.2.1.3. Cérides

Ce sont des mono esters d'un AG et un alcool tous deux à longue chaîne (jusqu'à 40 atomes de carbone). Ces deux éléments d'une molécule sont le plus souvent d'inégale longueur. Les acides gras sont également saturés rarement insaturés et très rarement hydroxylés, ils sont presque toujours solides à température ordinaire (ALAIS *et al.*, 2000).

1.2.2.1.4. Stérols

Chez les animaux, le cholestérol est le stérol le plus abondant, présent dans tous les tissus animaux, comme constituant majeur des membranes cellulaires. Le cholestérol tire son nom du grec *chole* (bile) et de *stereos* (solide) puisqu'il fut découvert par le chimiste CHEVREUL en 1815, sous forme solide dans les calculs biliaires. La molécule de cholestérol comprend quatre cycles carbonés (noyau cyclo-pentano-phénanthrénique), huit carbones asymétriques et une fonction hydroxyle.

Le cholestérol peut exister sous sa forme libre ou estérifié à un AG (ester de cholestérol). De longueur de chaîne et de degré d'insaturation variables. La forme libre

prédomine dans la stabilisation des membranes. La forme estérifiée est la forme préférentielle de transport et de stockage.

Le cholestérol a pour rôle essentiel de moduler la fluidité des membranes en interagissant avec des lipides complexes tels que la phosphatidylcholine et la sphingomyéline et en influençant l'orientation des molécules. La majeure partie du cholestérol présent dans l'organisme est biosynthétisée, principalement dans le foie et l'intestin. Il est également apporté par l'alimentation (viandes, œufs, produits laitiers).

Le cholestérol est une structure composée de 3 cycles hexagonaux avec un cycle pentagonal correspondant au cyclopentanoperhydrophénanthène. Il possède une fonction alcool secondaire en C3 et une double liaison en Δ^5 (figure 02) (TOUITOU, 2005).

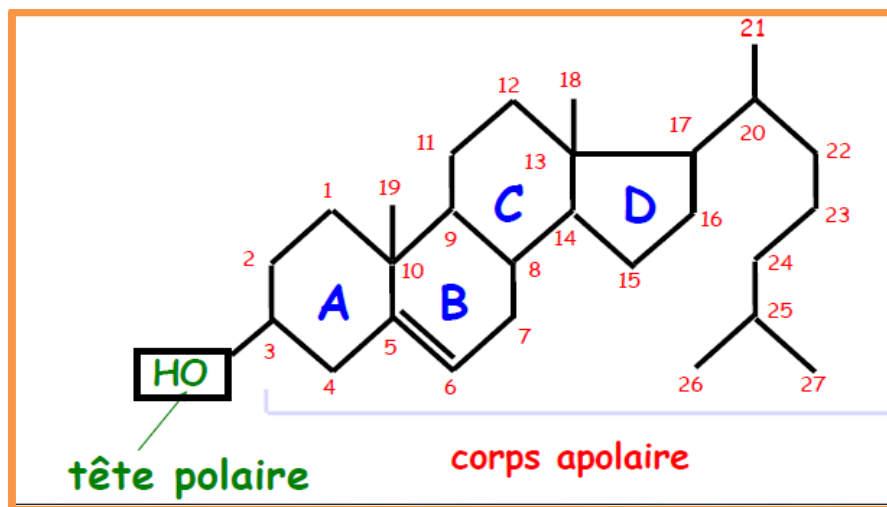


Figure 02 : Structure chimique du cholestérol.

1.2.2.2. Lipides complexes

Ce sont des composés formés de C, H, O, azote(N), phosphore(P) et éventuellement de soufre(S).

1.2.2.2.1. Phospholipides

Sont des lipides complexes contenant en plus de C, H, O de l'azote et du phosphore. Ils sont présents dans tous les animaux (5 à 40% du poids sec) et végétaux (0,1 à 3 %) mais l'apport alimentaire est faible. L'essentiel de l'apport de phospholipides (PL) est d'origine biliaire. La propriété originale des PL est l'amphiphilie. Ils sont miscibles à l'eau et solubles dans les lipides (figure 03), ils servent comme un lien physique entre les lipides et les constituants hydrosolubles comme les protéines. Il existe deux familles des PL: les glycérophospholipides et les sphingolipides (FRENOT et VIERLING, 2001).

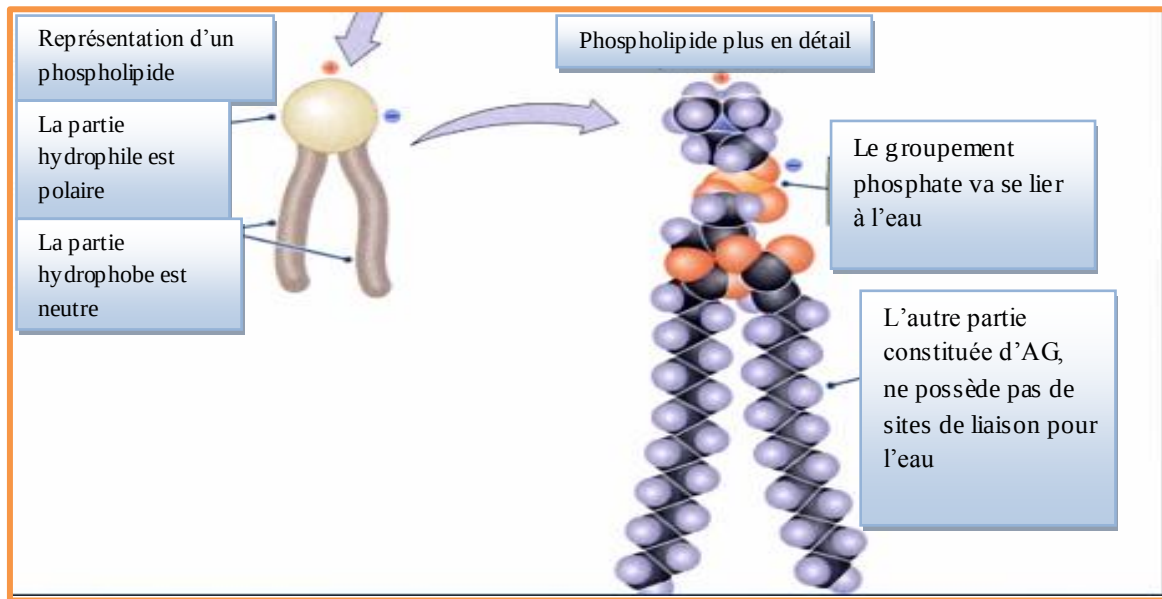


Figure 03 : Structure de phospholipide.

- **Les glycérophospholipides**

Dérivent de l'acide phosphatidique, précurseur commun aux triglycérides (TG) et aux PL. L'orientation biochimique vers l'une et l'autre famille dépend de la disponibilité en substrats : AG pour l'un, choline, sérine, éthanolamine dans le deuxième cas (FRENOT et VIERLING, 2001) (figure 04).

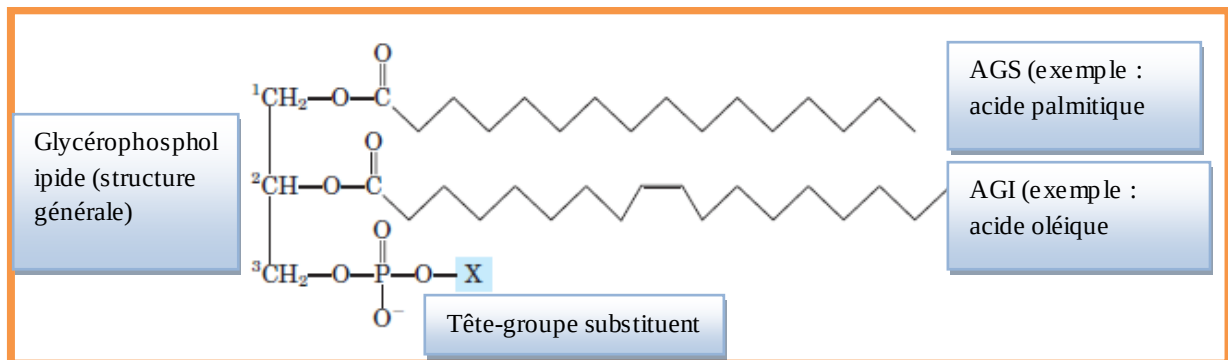


Figure 04 : Structure des glycérophospholipides.

- **Les sphingolipides**

Sont des lipides complexes dans lesquels un AG en C₂₄amidifie une molécule fonctionnelle en C₁₈ : la sphingosine. Ils forment des glycolipides membranaires (figure 05).

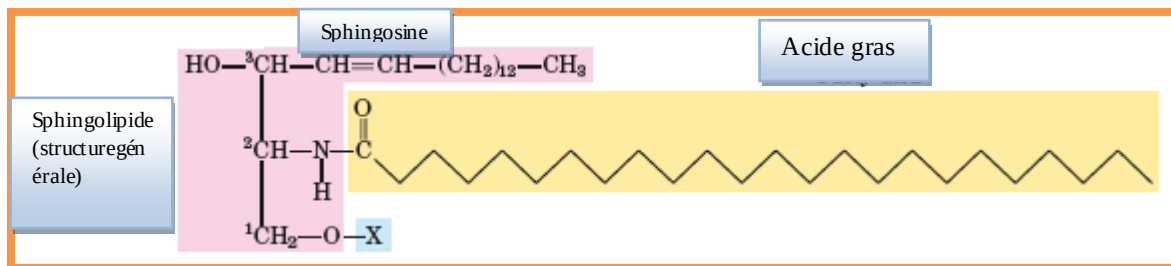


Figure 05 : Structure des sphingolipides.

1.2.2.2.2. Phytostérols

Les plantes contiennent également du cholestérol mais en très faible concentration à l'exception de certaines algues. Les stérols majoritairement chez les plantes sont appelés phytostérols, et appartiennent à la famille de substances naturelles des triterpènes. Les phytostérols sont des composants minoritaires des huiles végétales, des produits céréaliers, des légumineuses et fruits secs (RAPHAIL, 2010).

Leur structure est dérivée de celle du cholestérol et ne diffère que par un groupement méthyle ou éthyle sur le carbone 24 (ROCHE, 2005).

Les phytostérols empêchent l'absorption du cholestérol présent dans les aliments en formant des coprécipités insolubles, non absorbés dans l'intestin. Ils peuvent aussi s'intégrer dans les micelles lipidiques à la place du cholestérol mais ils ne sont pas absorbés (FRENOT et VIERLING, 2001).

1.2.3. Propriétés physicochimiques

1.2.3.1. Propriétés physiques

❖ Point de fusion

Il dépend de la nature des radicaux acyl constitutants, s'il y a 3 AGS, le TG est solide à température (T°) ordinaire comme à 37°C , T° des mammifères. Par contre, la présence d'AGI abaisse le point de fusion. Les TG végétaux sont riches en AGI. Ils sont liquides à la T° ordinaire : ce sont les huiles. Au contraire, les graisses animales, plus riches en AGS, sont solides à la T° ordinaire (RANDOUX, 1997).

❖ Solubilité

Les AG en C_4 et en C_6 sont solubles dans l'eau, au-delà ils sont insolubles. En l'absence d'interaction des lipides avec les molécules polaires, les lipides se montrent très solubles dans de nombreux solvants organiques tels que le trichloréthylène, le benzène, l'acétone et le tétrachloroéthylène (GOUDET et YINDOULA, 2008).

1.2.3.2. Propriétés chimiques

❖ Stabilité

Les lipides sont des composés assez stables qui ne se décomposent qu'à partir de 300°C environ. La décomposition thermique des triglycérides conduit à un mélange de gaz dont l'acroléine qui est un aldéhyde porteur d'une double liaison. Cette molécule de formule $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ a des propriétés lacrymogène (GOUDET et YINDOULA, 2008).

❖ Réactions d'addition

Les glycérides d'AGI peuvent donner des réactions d'additions par ouverture des doubles liaisons :

-Addition de dihydrogène

L'hydrogénation (dite catalytique) transforme les huiles insaturées en graisses. Cette réaction a une grande importance industrielle, elle permet, entre autre d'obtenir des margarines à partir de certaines huiles non directement consommables telles que les huiles de coton (GOUDET et YINDOULA, 2008).

-Addition de diiode

Formellement, le diiode I_2 s'additionne de manière analogue au dihydrogène sur les corps gras insaturés. Cette réaction est utilisée au laboratoire pour évaluer le caractère plus ou moins insaturés des corps gras naturels. Un dosage permet de déterminer la quantité de diiode fixée par une masse connue de corps gras (CG) (GOUDET et YINDOULA, 2008).

❖ Réaction d'oxydation

-Combustion

Les lipides brûlent dans le dioxygène de l'air. La combustion est incomplète et donne une flamme jaunâtre (GOUDET et YINDOULA, 2008).

-Oxydation lente

Les CG non saturés peuvent subir une transformation lente due au dioxygène de l'air. D'une part il peut y avoir libération d'aldéhyde insaturé à l'odeur désagréable comme l'hex-2-énoï, c'est le rancissement.

D'autre part les différentes liaisons peuvent s'ouvrir et fixer des atomes d'oxygène. Dans certaines conditions, et si le dioxygène est en quantité suffisante, les atomes d'oxygènes forme de sorte de ponts qui s'ouvrent et conduisent à des polymères. Ces réactions se manifestent par un durcissement de l'huile, c'est le phénomène de sicativité exploité dans les peintures dites à l'huile (GOUDET et YINDOULA, 2008).

❖ Hydrolyse

Rappelons que cette réaction qui conduit à libérer l'alcool (mono alcool ou poly alcool) et l'acide (ou les acides) constitutifs d'un CG, fonde sur la classification de lipides, cette réaction répond au schéma général suivant (figure 06).

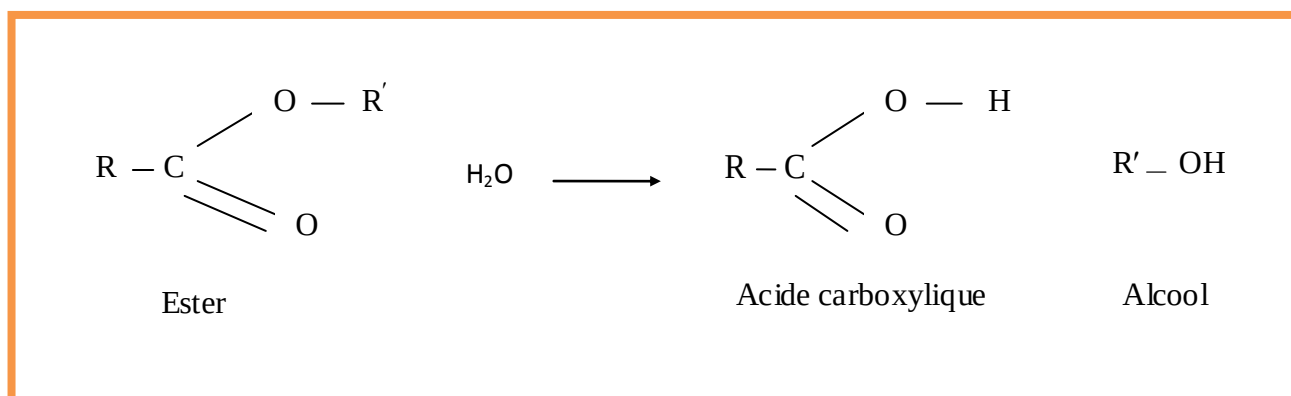


Figure 06 : Principe de l'hydrolyse (GOUDET et YINDOULA, 2008).

❖ Estérification

L'hydrolyse des lipides comme d'une manière plus générale celle de tous les esters, nous indique que ceux-ci résultent de la condensation (combinaison) d'un acide avec un alcool (GOUDET et YINDOULA, 2008).

❖ Saponification

C'est en fait l'hydrolyse alcaline. Elle libère les sels d'AG, appelés savons, et le glycérol. Dans ce type de réaction, tout ce qui se transforme en savons est dit saponifiable. Les savons (sauf les savons de calcium) sont solubles dans l'eau, donc le saponifiable est soluble dans l'eau. Le glycérol est également soluble dans l'eau.

Il existe certaines fractions lipidiques qui ne sont pas solubles au cours des réactions de saponification : on dit qu'il s'agit de l'insaponifiable. Il faut généraliser les termes de saponification et d'insaponifiable. Chaque fois qu'un lipide, quel qu'il soit, est traité par une solution de soude ou de potasse, ce qui conduit à la formation de savons, il s'agit d'une saponification et le résidu insoluble dans la solution alcaline mais extractible par l'éther est appelé insaponifiable (RANDOUX, 1997).

1.2.4. Rôle biologique

- Ils sont une réserve énergétique mobilisable : $1\text{g lipides} \rightarrow 9\text{ Kcal}$;
- Ils ont un rôle de précurseurs : stéroïdes, vitamines et prostaglandines ;

- Deux acides gras polyinsaturés sont des facteurs nutritionnels essentiels car ils ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Ce sont des acides gras indispensables : acide linoléique et acide linolénique ;
- Les membranes ont une structure lipidique ;
- Les plaques d'athérome constituées de dépôt lipidique entraînent le durcissement des artères (Athérosclérose) (TOUITOU, 2005).

I.3. Méthodes d'extraction des lipides

D'une façon générale, la première étape d'analyse de lipides consiste souvent à extraire d'abord les lipides de la matrice. Plusieurs types de solvants ou de combinaison de solvants peuvent être utilisés pour extraire les lipides d'un produit alimentaire. Dans tous les cas, il est important de prendre certaines précautions afin d'assurer que le rendement d'extraction soit total en évitant ou limitant par exemple les phénomènes d'oxydation (auto-oxydation ou oxydation enzymatique) (BAUER *et al.*, 2010).

I.3.1. Extraction directe

C'est une méthode d'extraction à l'éther de pétrole, par malaxage pour les produits solides, en ampoule à décanter pour les liquides ou au moyen d'un appareil à extraction continue. Après évaporation du solvant d'extraction, le résidu gras est séché et pesé (BAUER *et al.*, 2010).

D'autres solvants d'extraction peuvent être utilisés directement ou après séchage de l'échantillon à l'étuve ou sur sulfate de sodium : par exemple : hexane ou mélange alcool-benzène, dioxane-éther de pétrole (BAUER *et al.*, 2010).

Cette extraction directe n'est pas totale lorsque des lipides sont retenus mécaniquement, notamment par les parois cellulaires, ou par adsorption ou sont liés chimiquement à d'autres composés tels que les protéines, dans ces cas une désagrégation est nécessaire avant l'extraction (BAUER *et al.*, 2010).

I.3.2. Extraction après désagrégation

-Désagrégation au moyen d'acide chlorhydrique concentré à chaud ; ce traitement dégrade tous les composés autres que les lipides, qui sont séparés du mélange par filtration ; le contenu du filtre est lavé et séché puis les lipides sont extraits au soxhlet au moyen de l'éther de pétrole (BAUER *et al.*, 2010).

-Désagrégation au moyen d'ammoniaque et d'éthanol méthode de Rose-Gottlieb pour les laits. Après dissolution des protéines et destruction de l'enveloppe des globules gras, la matière grasse est extraite à l'éther de pétrole (BAUER *et al.*, 2010).

-Désagrégation enzymatique (amylases, protéases) puis extraction des lipides au moyen d'un mélange méthanol-chloroforme, cette méthode est probablement la plus universelle (BAUER *et al.*, 2010).

I.3.3. Extraction par centrifugation après désagrégation

Elle se fait à chaud par l'acide sulfurique 65% : méthode acido-butyrométrique de Gerber pour les laits : après dégradation des protéines, adjonction d'isopentanol pour une meilleure séparation des couches et centrifugation, le volume de graisse est mesuré dans un butyromètre gradué (BAUER *et al.*, 2010).

I.3.4. Autres méthodes

I.3.4.1. Méthode de PETTINATI et SWIFT, (1977)

C'est une méthode classique, basée sur une extraction continue, opérée dans un extracteur Soxhlet sur des échantillons secs d'aliments, quelquefois précédée par une hydrolyse acide. Cette technique prend beaucoup de temps et expose les lipides extraits à de hautes températures sur de longues périodes. Le solvant d'extraction utilisé est souvent l'éther de pétrole, qui est moins inflammable que l'étherdiéthyle et donc moins susceptible de former des peroxydes. Cela nécessite des prises d'essai complètement séchées et indemnes de mono- et disaccharides.

L'inconvénient principal de cette technique est que l'extraction des lipides soit incomplète pour beaucoup d'aliments surtout pour les produits de boulangerie et pâtisserie et ceux contenant une quantité considérable de graisse de structure. Les résultats obtenus en utilisant cette méthode demandent un examen minutieux avant leur incorporation dans une banque de données et leur utilisation est déconseillée (GREENFIELD et SOUTHGATE, 2007).

I.3.4.2. Méthode de FOLCH, LEES et STANLEY, (1957) et méthode de BLIGH et DYER, (1959)

Ce sont des méthodes d'extraction qui utilisent le mélange de solvant chloroforme-méthanol. Elles combinent la capacité de pénétration de l'alcool dans les tissus avec le pouvoir dissolvant du chloroforme pour les lipides. Les extraits qui en résultent sont complets, mais peuvent contenir des matières non lipidiques et exigent une extraction supplémentaire pour les éliminer. Ces méthodes d'extraction sont préférables lorsque l'extrait est utilisé pour mesurer les acides gras et les stérols (SHEPHERD, HUBBARD et PROSSER, 1974 ; GREENFIELD et SOUTHGATE, 2007).

I.3.4.3. Méthode de HUBBARD *et al.*, (1977)

C'est une méthode d'extraction efficace pour les aliments complexes et fait partie des méthodes officielles AOAC. Il a été démontré qu'elle est applicable à des aliments tels que la cervelle et l'œuf qui sont riches en phospholipides (GREENFIELD et SOUTHGATE, 2007).

I.3.4.4. Méthode de ROSE-GOTTLIEB et méthode de WEIBULL et SCHMID)

Ce sont des méthodes d'extraction des lipides par un traitement acide (WEIBULL et SCHMID) ou par l'ammoniaque (ROSE-GOTTLIEB), Fournit de bons résultats pour beaucoup d'aliments.

Ces techniques sont reconnues comme des méthodes officielles AOAC et normes de l'Union européenne. Les méthodes alcalines sont exclusivement utilisées pour les aliments laitiers et sont des méthodes normalisées pour ces aliments. Cependant, ces extraits obtenus après un traitement acide ou alcalin ne sont pas adaptés pour l'analyse des acides gras, car une

oxydation et des pertes dues à l'hydrolyse (acide) des lipides peuvent se produire (GREENFIELD et SOUTHGATE, 2007).

I.3.4.5. Méthode de NGEH-NGWAINBI, LIN et CHANDLER, (1997)

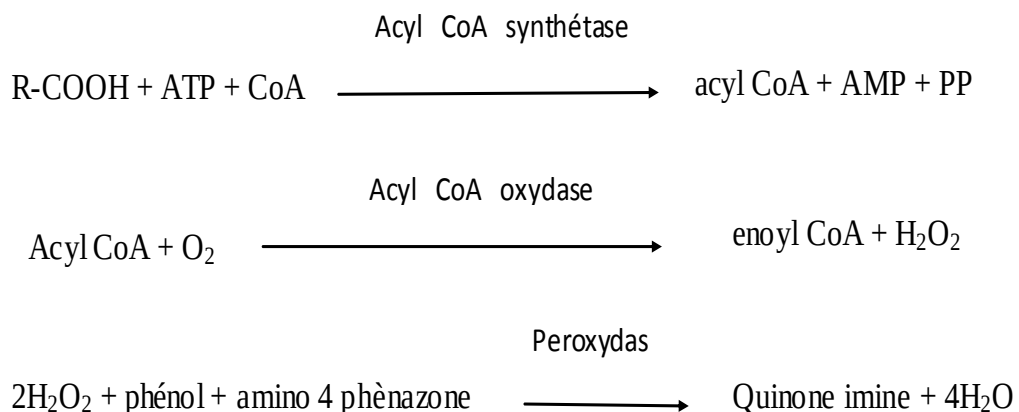
C'est une méthode normalisée par l'AOAC pour déterminer les lipides totaux (incluant les acides gras saturés, insaturés et mono insaturés) dans les aliments, basée sur une hydrolyse acide suivie d'une chromatographie capillaire en phase gazeuse pour se conformer à la définition légale des lipides de la loi américaine d'étiquetage et d'éducation nutritionnelle (NLEA) selon laquelle, cette teneur est la somme des acides gras exprimée en triglycérides (GREENFIELD et SOUTHGATE, 2007).

I.4. Méthodes de dosage

I.4.1. Dosage des acides gras libres

Il s'agit d'un dosage colorimétrique comportant 3 réactions successives (PIERRE, 2000).

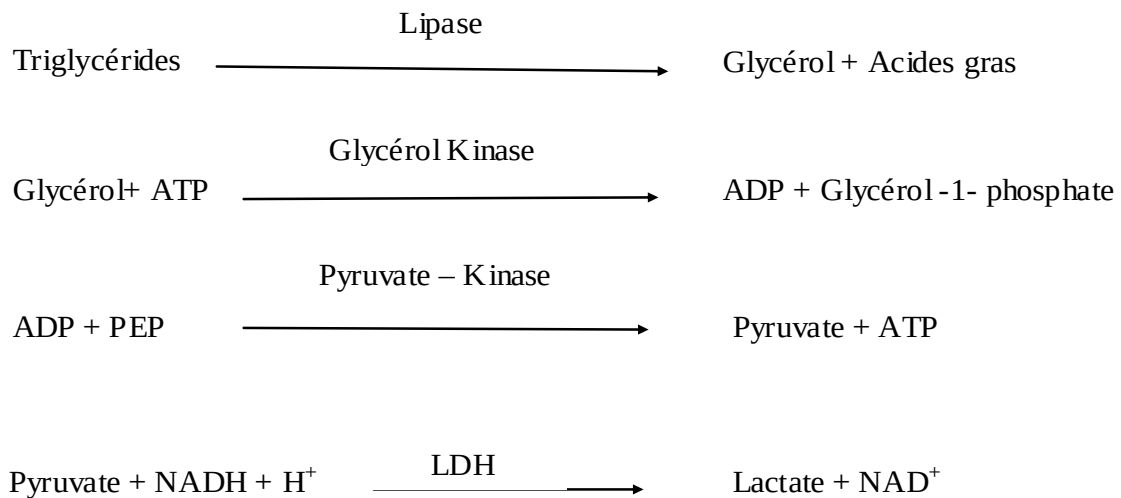
Acyl CoA synthétase catalyse la dégradation des acides gras en Acyl CoA, puis l'Acyl CoA oxydase catalyse l'oxydation des Acyl CoA en enoyl CoA et enfin nous avons la peroxydase qui est une enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en utilisant le réactif amino 4 phénazone.



I.4.2. Dosage des triglycérides

Des techniques enzymatiques sont utilisées par plus de 90 % des laboratoires. Elles reposent sur le dosage enzymatique du glycérol libéré après action de la lipase (BEAUDEUX J.L. et DURAND G., 2011).

Le dosage des triglycérides comporte quatre réactions successives (VAUBOURDOLLE, 2007).



I.4.3. Dosage du cholestérol

Le cholestérol peut être dosé par de très nombreuses méthodes. Les plus anciennes sont colorimétriques, les plus pratiquées sont enzymatiques. La méthode de référence est chromatographique (VAUBOURDOLLE, 2007).

I.4.3.1. Méthodes chromatographiques

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) peut permettre le dosage du cholestérol. Les meilleures méthodes utilisent des colonnes capillaires après triméthylsilylation, ce qui permet de séparer le cholestérol des composés très voisins comme le cholestanol. Cette méthode, couplée à la spectrométrie de masse est considérée comme méthode de référence par la Société française de biologie clinique.

I.4.3.2. Méthodes colorimétriques

Ces méthodes nécessitent une extraction préalable. La mesure du cholestérol se fera en trois étapes : extraction, saponification et coloration. Il existe également des méthodes en deux étapes, qui éliminent la saponification, rendant possible l'automatisation. Des méthodes directes ont également été développées en ajoutant un agent stabilisant (acide arylsulfonique dissous dans l'acide acétique ou le sulfate de sodium) qui permet la solubilisation des protéines associées dans le réactif. La coloration est obtenue par la réaction de LIEBERMANN (développement d'une coloration verte en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique) ou la réaction de ZAK (développement d'une coloration rouge en présence d'acide acétique, de chlorure ferrique et d'acide sulfurique)

Ces réactions ne sont pas spécifiques et il existe de nombreuses interférences (autres stérols, bilirubine, médicaments, etc.). De plus, à 620nm, les esters de cholestérol donnent une coloration plus intense que le cholestérol libre lorsque l'extraction a eu lieu dans le chloroforme.

I.4.3.3. Méthodes enzymatiques

Le cholestérol est actuellement dosé dans la totalité des laboratoires d'analyses médicales par des méthodes enzymatiques, utilisant une estérase et une oxydase (figure1). Le cholestérol estérase réalise l'hydrolyse des esters du cholestérol puis le cholestérol oxydase effectue l'oxydation du cholestérol non estérifié, pour aboutir à la formation de peroxyde d'hydrogène (BEAUDEUX J.L. et DURAND G., 2011). Les différentes méthodes varient selon la procédure utilisée pour la mesure du peroxyde d'hydrogène produit (VAUBOURDOLLE, 2007). La quantification du peroxyde d'hydrogène est le plus souvent effectuée, en présence de peroxydase et d'un chromogène phénolique par la réaction de Trinder (BEAUDEUX J.L. et DURAND G., 2011).

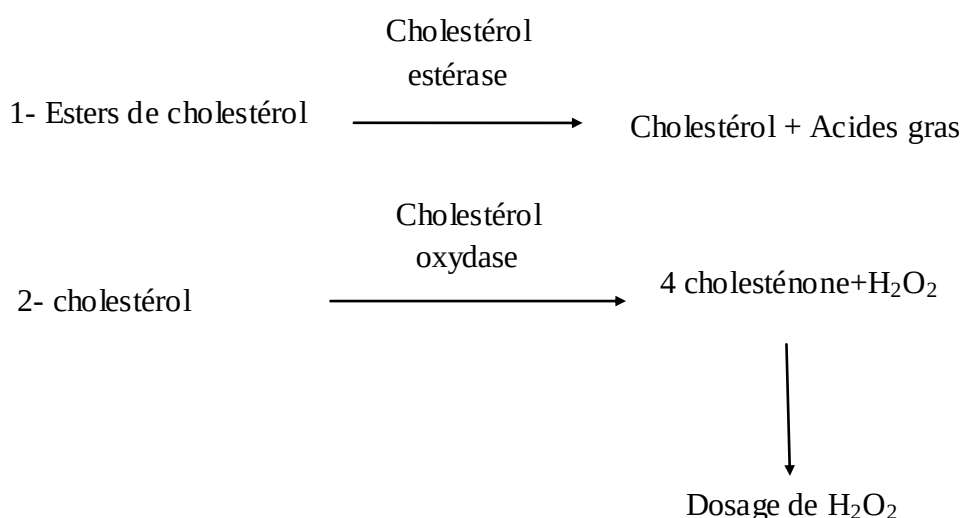


Figure1 : Dosage enzymatique du cholestérol (VAUBOURDOLLE, 2007).

On peut également mesurer directement le peroxyde d'hydrogène formé par une méthode potentiométrique. Enfin, il existe des méthodes mesurant la consommation d'oxygène au cours de l'oxydation du cholestérol par une méthode polarographique. Les méthodes enzymatiques représentent les méthodes de choix pour le laboratoire de routine car elles sont généralement très reproductibles. Les résultats sont également très bien corrélés avec la méthode de référence. La spécificité est aussi très bonne.

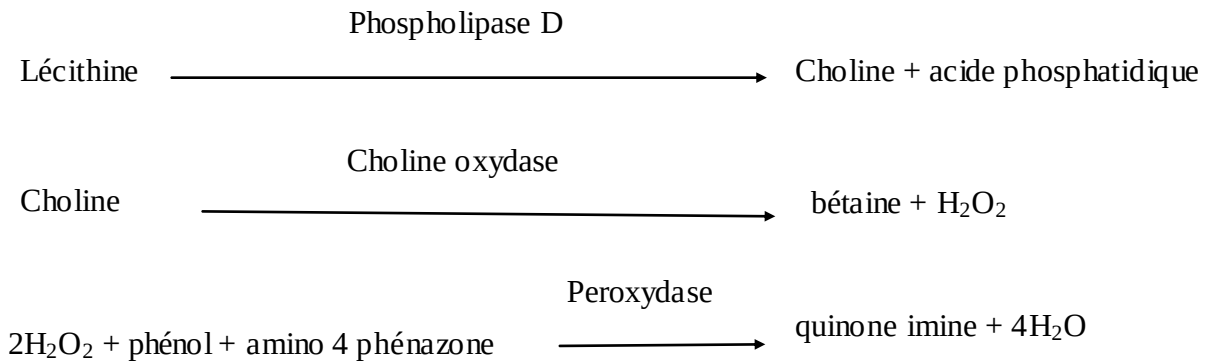
I.4.4. Dosage des phospholipides

Très peu demandé, le dosage des phospholipides (lécithines, phosphatidyléthanolamines, phosphatidyl serines, sphingomyélines et lysolécithines) est effectué par des techniques chimiques ou enzymatiques (PIERRE, 2000).

•Techniques chimiques

Elles sont pratiquées en dosant le phosphore directement ou après minéralisation par formation d'un complexe phosphomolybdique.

•Techniques enzymatiques



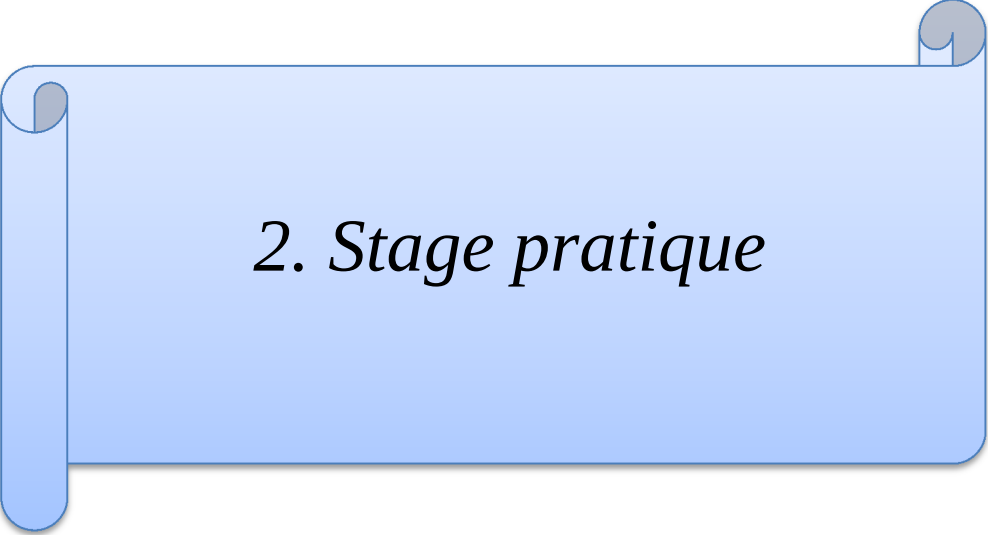
La quinone imine formée est colorée en rosé et la densité optique à 540 nm est proportionnelle à la concentration des phospholipides sériques.

1.5. Conclusion

La quantité de corps gras entrant dans l'alimentation a des conséquences nutritionnelles qui constituent autant de sujets de précautions pour la FAO et l'OMS, du fait de la contribution favorable que ces substances peuvent apporter à l'état de santé et aux capacités de nombreux sujets et nations.

Les connaissances sur la valeur nutritionnelle et les effets physiologiques des différents lipides ont fait, ces dix dernières années, de notables progrès dont certains peuvent conduire à révisions des opinions actuelles sur la qualité des MG alimentaires.

La composition et la nature des lipides alimentaires influencent la composition et la nature des lipides de l'organisme. Un apport excessif en certains lipides est associé à une augmentation du risque de certaines maladies chroniques, en particulier les maladies cardiovasculaires. Par conséquent la qualité des lipides alimentaires est maintenant reconnue comme un facteur très important de l'alimentation, et des recommandations nutritionnelles concernant les apports en lipides ont été établies par des experts.



2. Stage pratique

2.1. Introduction

Au cours de notre stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique afin de s'assurer de la qualité de quelques produits alimentaires commercialisés et cela par le dosage de différents paramètres physicochimiques, à savoir, la vitamine C, l'indice d'iode, l'indice d'acidité, dosage des sucres réducteurs et des protéines ; et par des méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

2.2. Matériel et méthodes

Le stage pratique a été réalisé au niveau du Laboratoire de recherche de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de l'université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU.

2.2.1. Matériel

2.2.1.1. Matériel et appareillage

-La verrerie : tubes à essai, béchers (50, 100, 250, 500 et 1000ml) , pipettes graduées (1 ml, 5ml et 10ml), fioles à jauger (10, 25, 50, 100, 250 et 500ml), éprouvettes (50 et 250 ml), burettes (100ml), seringue d'Hamilton, colonne de chromatographie (20X1Cm), plaque en verre d'électrophorèse (10 X 8 X 0,75 Cm, 12 X 8 X 0,75 Cm).

-Appareils : agitateur magnétique, bain marie, balance, chromatographie (enregistreur, collecteur de fractions, détecteur, pompe), pH mètre, spectrophotomètre, vortex.

-Autres matériels : bavettes, gants, spatules, coupelles, pissettes, cuves, barreaux magnétiques, barre à aimant, poires, portoirs, micropipettes (20-200µl), (100-1000µl), papier pH.

2.2.1.2. Réactifs

-Dosage de la vitamine C : 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP), bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), acide ascorbique, acide acétique glacial ;

-Détermination des indices d'iode et d'acidité : empois d'amidon, éthanol, lugol, potasse (KOH), phénolphthaléine, thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) ;

-Dosage des glucides : Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) ;

-Dosage des protéines : Na_2CO_3 anhydre 2% dans NaOH, 0,1 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5% , tartrate de Na et K, 1%, BSA (Albumine Sérique Bovine), réactif de Folin – ciocalteu ;

-Hydrolyse acide des sucres : H_2SO_4 (72%, V/V), solution d'ammoniaque ;

-CCM : (Butanol : acide acétique : eau) (2/1/1, V/V/V), les solutions standards Glucose (Glc), Galactose (Gal) et Fructose (Fru), Molish, solution de saccharose ;

-Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 : gel de séphacryl S200, tampon tris-HCl 0,02M, pH 8,4, bleu de dextran ;

-L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne : Tampon tris- HCl, 0,5 M, pH 6,4, la papaïne ;

- L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives et dénaturantes (annexe 1).

2.2.1.3. Echantillons utilisés

Le tableau suivant regroupe l'ensemble des échantillons de jus, de laits des matières grasses utilisées dans la partie analyse physicochimiques et les protéines et solution utilisées pour la séparation et purification chromatographique et caractérisations électrophorétiques.

Jus	Protéines	Corps gras	Solution
-Jus d'orange naturel -Jus lacté -Jus de citron naturel -Jus DANA -Jus Ramy	-Lait écrémé -Lactosérum -Protéines sériques du lait de vache -Protéines sériques lyophilisées du lait de brebis	-Huile de soja (Safia) -Huile d'olive vierge (+ de 6 ans), -Huile de Colza, -Beurre de vache -smen (El Mordjane) margarine (Labelle).	-Amidon -Saccharose -Lactose -Glucose -Galactose -Fructose

2.2.2. Méthodes expérimentales

2.2.2.1. Méthodes physicochimiques

2.2.2.1.1. Dosage de la vitamine C dans les jus

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie. Il est basé sur la réduction par l'acide ascorbique d'un colorant: le 2-6-dichlorophenolindophenol (2-6DPIP) qui est bleu en milieu neutre et rouge en milieu acide. Les conditions utilisées sont celles recommandées par AUDIGIE *et al*(1978) (Annexe 01). La solution du 2-6-DPIP est étalonnée par l'emploi d'une solution d'acide ascorbique de concentration connue. La réaction d'oxydation de cette Vitamine est décrite comme suit :

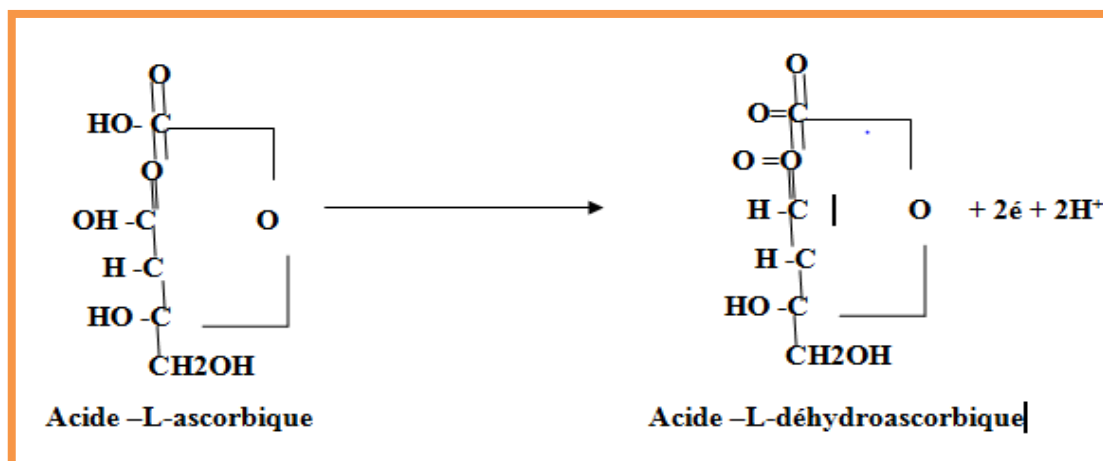


Figure 07 : Réaction de l'oxydation de la vitamine C(AUDIGIE *et al.*,1978).

2.2.2.1.2. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

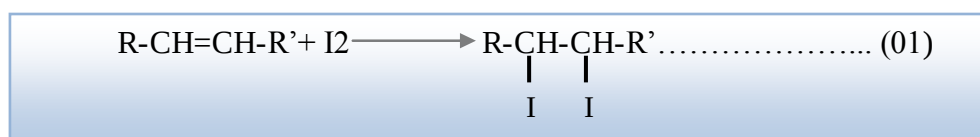
2.2.2.1.2.1. Indice d'acidité

L'indice d'acidité d'une matière grasse est la quantité de potasse en milligramme, nécessaire pour neutraliser les acides gras libres contenus dans un gramme de corps gras. C'est un dosage qui nous permet d'estimer le taux d'acide gras libre. Le protocole expérimental est mentionné en annexe 02.

2.2.2.1.2.2. Indice d'iode

L'indice d'iode est la quantité d'iode, exprimée en gramme, fixée par 100g de la matière grasse. Cet indice nous renseigne sur le nombre de doubles liaisons des chaînes hydrocarbonées des substances qui composent un corps gras, acides gras libres, lipides dont les triglycérides et celles de l'insaponifiable. L'indice d'iode est le degré d'insaturation variant dans le même sens. Le protocole expérimental est résumé en annexe 02.

La fixation des molécules d'iode sur les insaturations des acides gras se représente par la réaction suivante :

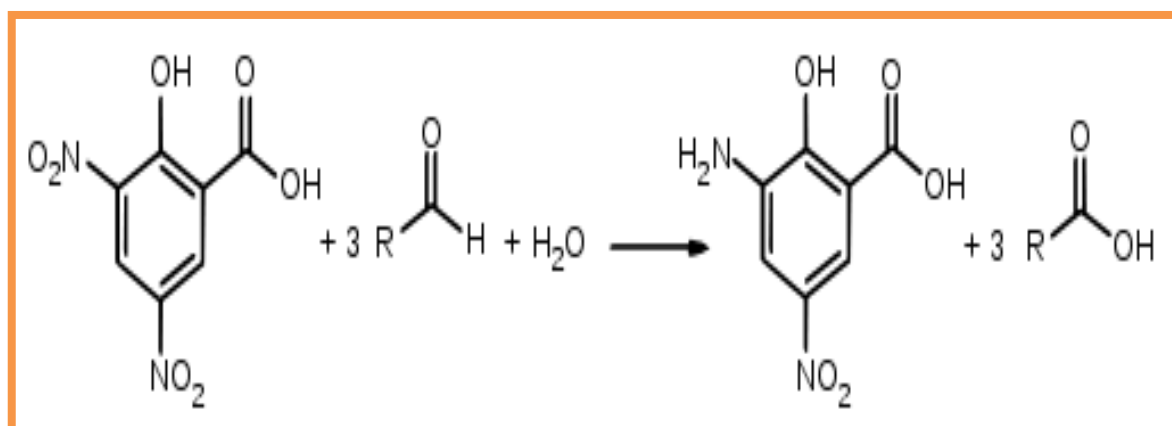


L'excès d'iode non fixé est titré par la solution réductrice de thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃, 0.02N) selon la réaction suivante :



2.2.2.1.3. Dosage des glucides par la méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)

Les glucides réducteurs peuvent être dosés grâce à leurs propriétés réductrices, en milieu alcalin et à chaud, vis-à-vis de l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS). Le DNS jaune est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (figure 08) qui est rouge-orangé, dosable par colorimétrie à 530 nm. Les densités optiques (DO) obtenues permettent de déterminer les concentrations en glucides des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage $DO = f([\text{Glucose}])$ (figure 09). Les conditions opératoires sont décrites en annexe 03.



Acide 3,5dinitrosalicylique

l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique

Figure 08: Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE *et al.*, 1978).

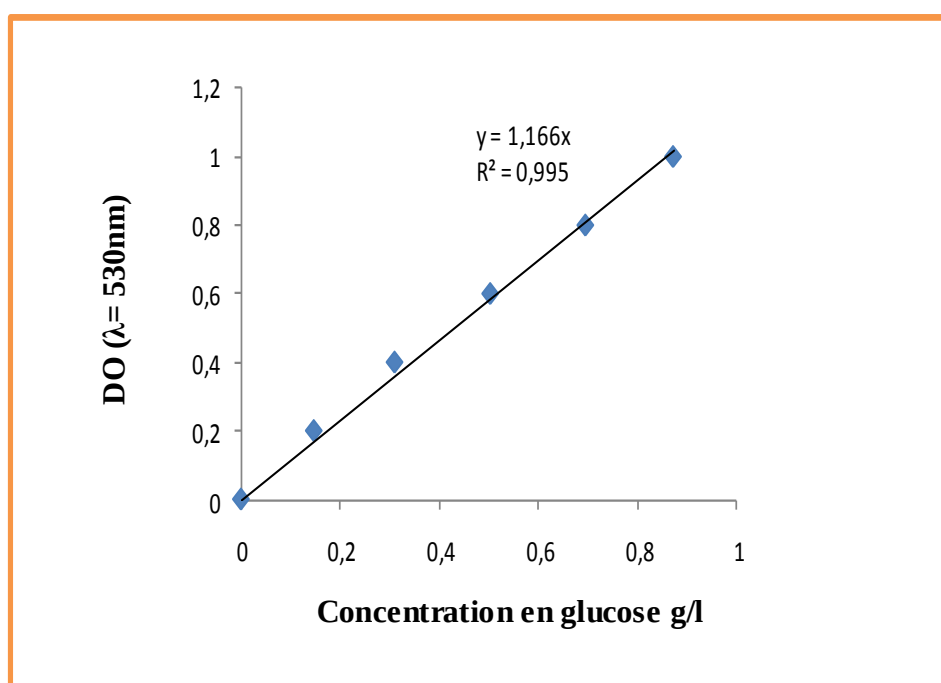


Figure 09: Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du glucose comme standard.

2.2.2.1.4. Dosage des protéines : méthode de LOWRY *et al*(1951)

Le taux de protéines dans le lait et dans ses différentes fractions est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de LOWRY *et al* (1951), en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine de référence. Cette méthode est basée sur l'obtention d'un composé chromogène par une réaction d'oxydo réduction. Cette dernière a lieu entre, d'une part, des groupements de la protéine notamment les groupements phénoliques du tryptophane, de la tyrosine et dans une moindre mesure ceux de la cystéine, cystine et histidine (la liaison peptidique est aussi impliquée) et d'autre part, le réactif de FolinCiocalteu dont l'acide phosphomolybdo-tungstique est le constituant actif. Cette réaction donne naissance à un complexe coloré : le bleu de molybdène (couleur bleu foncée) dont l'intensité est mesurée à 750 nm (Annexe 04). La concentration des protéines est déterminée en se référant à une courbe étalon établie (figure 10) en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine de référence.

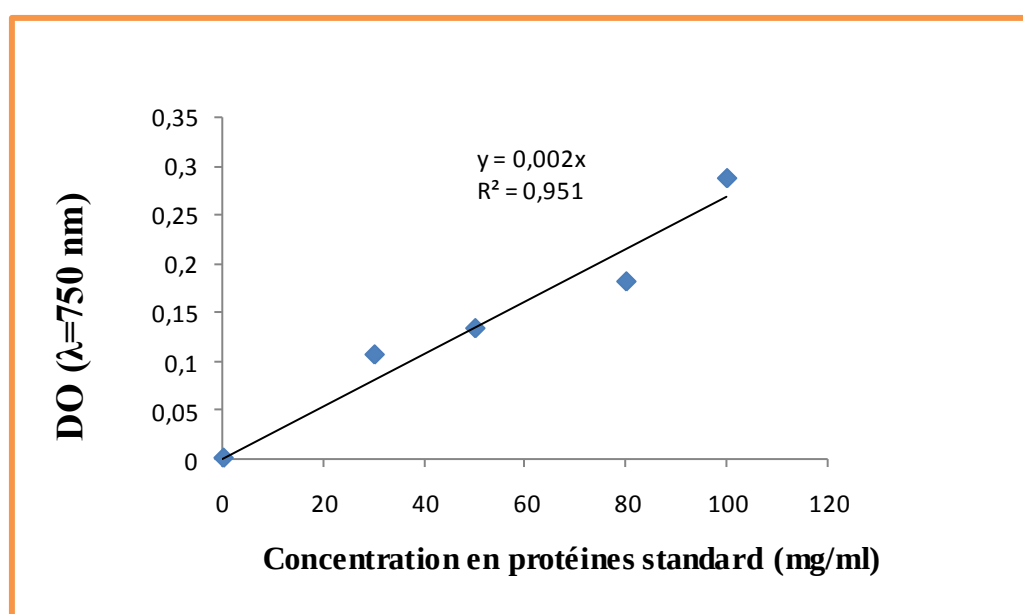


Figure 10: Courbe étalon de dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951), réalisée avec le Sérum Albumine Bovine (BSA) comme protéine de référence.

2.2.2.2. Les méthodes de séparation et purification (méthodes chromatographiques)

2.2.2.2.1. Hydrolyse acide des sucres

L'objectif de cette hydrolyse est d'obtenir des monosaccharides pour une utilisation ultérieure en CCM afin de confirmer l'hydrolyse. Le disaccharide utilisé dans notre manipulation est le saccharose de $M_m=342,30$ et de formule chimique $C_{12}H_{22}O_{11}$, H_2O . Le virage de couleur qui correspond à la neutralité est obtenu après ajout d'un volume d'ammoniac de 1,3ml. Le protocole suivi est mentionné en annexe 05.

2.2.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les solutions à analyser (solution des standards (Glc, Gal et Fru) et de saccharose (Sac) sont déposées et fixées sur le support (un gel de silice déposé en couche mince sur une plaque d'aluminium). Elles sont entraînées par un solvant approprié (butanol, acide acétique, eau) qui migrent par capillarité sur la plaque, les standards et les constituants du mélange (monosaccharides issus de l'hydrolyse) se séparent par migration différentielle. Chacun d'eux est d'autant plus entraîné par l'éluant s'il est plus soluble dans celui-ci et moins adsorbé sur la phase stationnaire.

Après migration, les taches doivent être révélées ; c'est la détection qui se fait par immersion dans le bain de Molish.

2.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

La séparation est effectuée sur une colonne de dimensions : 20 x 1cm (figure12). La phase stationnaire utilisée est le Séphacryl S200 (poly alkyle dextrane-CO-N-N'-méthylènebisacrylamide) ; qui est un gel mixte composé d'acrylamide et d'un agent de pontage : le N-N'-méthylènebisacrylamide. Ce gel présente un taux de réticulation élevé et une grande résistance aux contraintes mécaniques. Le seuil de coupure de Séphacryl S200 est de 5 à 250 KDa. La phase mobile utilisée est une solution tampon composée de Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4.

Le premier échantillon, le lactosérum du lait de vache, est injecté tel quel (4ml) contenant 29,2mg de protéines sériques. Le deuxième échantillon est composé de protéines sériques du lait de brebis, qui sont dissoutes à raison de 100mg /5ml de tampon de chromatographie. L'élution des protéines se fait par passage du tampon dans la colonne avec un débit constant de 28ml/h. L'absorbance de l'éluant est contrôlée à 280 nm.



Figure 12 : Photographie d'une unité de chromatographie basse pression (LABAB UMMTO).

2.2.2.3. Méthodes de caractérisation (méthodes électrophorétiques)

2.2.2.3.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne

On prépare 5 tubes à essai contenant chacun :

- 200ul du tampon d'échantillon SDS,
- 1ml tampon Tris-HCl 0,5 M ; pH 6, 4

Dans un aliquote, 10mg de substrat sont pesées (protéines sériques bovines lyophilisées) et pour lesquelles est rajouté 1ml de tampon Tris, puis à partir de celui-ci on prélève 200ul qu'on rajoute aux 200ul du tampon SDS contenu dans le premier tube correspondant à T'0. Ensuite, cet échantillon est chauffé pendant 5mn au bain-marie à T° optimale pour l'activation de la papaïne T°= 40°C. Dans l'aliquote sont rajoutées 100ul de l'enzyme (papaïne) et l'ensemble est incubé à 100°C pendant 15mn afin d'arrêter la réaction enzymatique. A partir de l'aliquote sont prélevées 200ul lesquelles sont remises dans le deuxième tube à essai correspondant à T'15, et on chauffe à 40°C pendant 5mn pour l'activation de la papaïne. La même opération est répétée pour les tubes correspondant à T'30, T'60 et T'120 (figure 13).

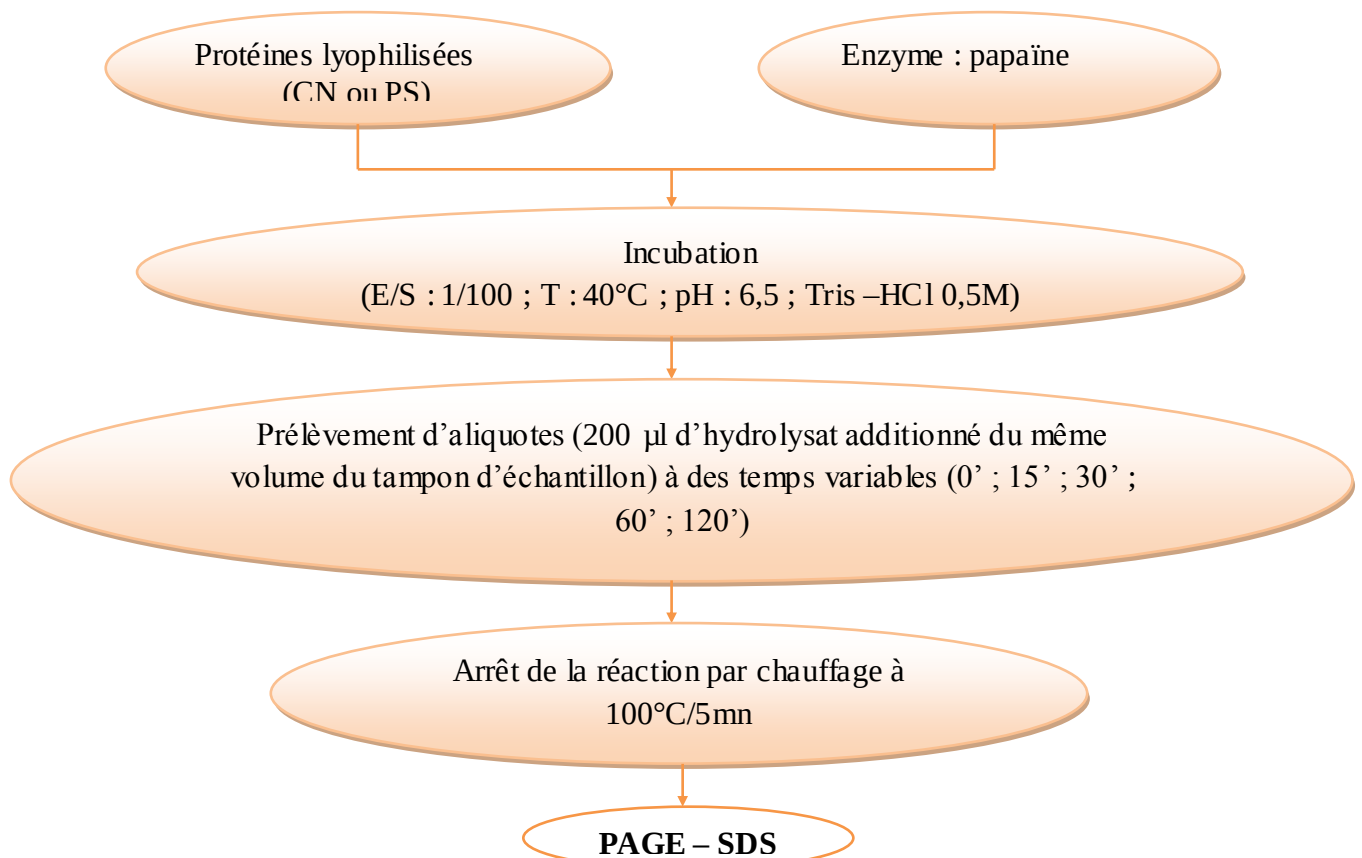


Figure 13 : Les étapes suivies de l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne.

2.2.2.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (PAGE-native) et dénaturantes (PAGE-SDS)

La PAGE est la technique la plus utilisée en raison des avantages qui sont offerts par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité.

Le gel est le résultat du greffage d'unités de N, N'- méthylène- bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) bifonctionnelles sur des chaînes de polyacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) adjacentes. La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composé de persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8$ et de N, N, N, N- Tétraméthylène diamine (TEMED).

La structure du gel est définie par les indices T et C. sa porosité est ajustée en faisant varier les concentrations relatives de a et b, la taille effective d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée et ces indices T et C sont calculés comme suit :

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

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

Avec $\left\{ \begin{array}{l} a : \text{acrylamide (g)} ; \\ b : \text{méthylène-bis-acrylamide (g)} ; \\ V : \text{volume de la solution (ml)} \end{array} \right.$

Les échantillons sont déposés à raison de 10 à 15 μl dans chaque puits, à l'aide d'une seringue Hamilton après avoir monté l'unité électrophorétique et rempli les cuves supérieures et inférieures de tampon d'électrode. L'unité est mise sous tension/courant et voltages constants : 20mA, 250V. (Figure 14).

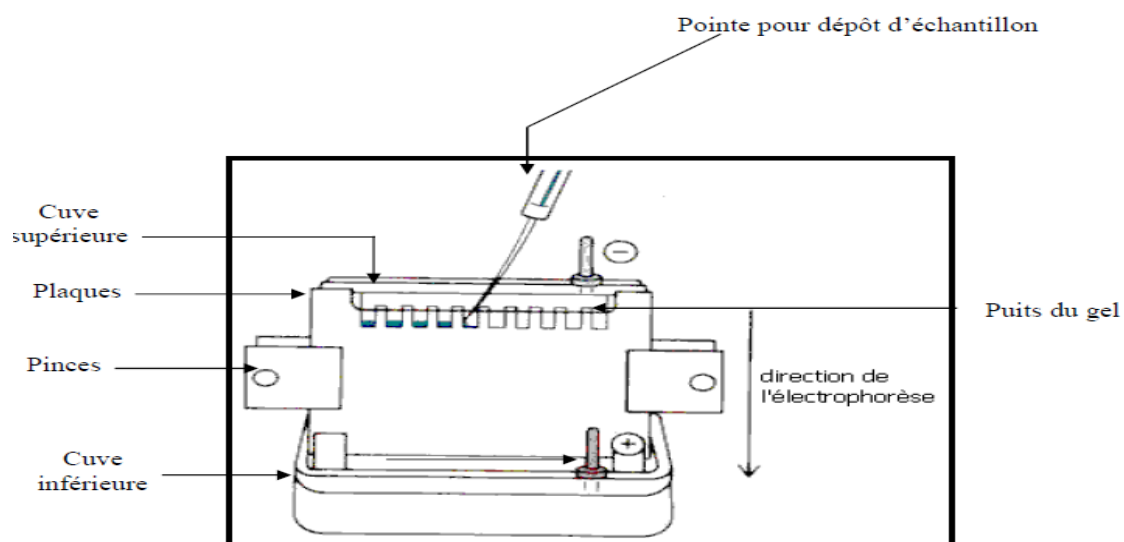


Figure 14 : Dépôt des échantillons en électrophorèse.

2.2.2.3.2.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

L'électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native) est une méthode permettant la séparation des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique. La PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOFFER au niveau du laboratoire LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T=12% ; C=2,7%) (Figure 15).

Le tampon de gel est constitué de Tris 0,75M, pH 8,9. Le tampon d'électrode contient du Tris 5 mM, glycine 77 Mm, pH 8,3. Les échantillons sont dissous dans le tampon d'échantillon qui est composé du tampon de gel (1/10 v/v), de l'eau distillée (7/10 v/v) et du glycérol 10% (v/v) (annexe 08).



Figure 15 : Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260).

A : générateur de courant ; B : cuve de migration

2.2.2.3.2.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes et dissociantes (PAGE-SDS)

Ce type de séparation est basé sur un système biphasique, comprenant deux types de gel : un gel de concentration (T=4% et C=2,7%) en tampon Tris-HCL, pH6,8 faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend plutôt à concentrer les échantillon et un gel de séparation (T=17% et C=2,7%) en tampon Tris- HCL, 8,8 à travers le quel les protéines migrent selon leur poids moléculaire (LAEMMLI et FAVER ,1973) (Annexe 10).

Le SDS [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3^- \text{Na}^+$] est un détergent fortement anionique (10% p/v) qui s'associe avec les protéines et leur confère une charge globale négative. Associé avec le 2-mercaptoéthanol (4% v/v) un agent réducteur assurant la rupture des ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines et provoque la dissociation des polypeptides (Figure 16), ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaines peptidiques et les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et seront séparés suivant leur taille.

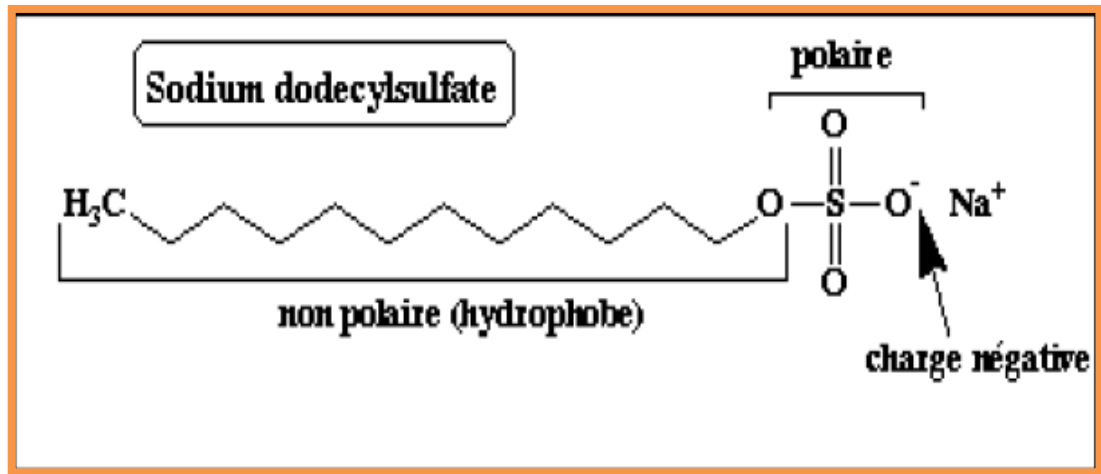


Figure 16 : Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).

2.2.2.3.3. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes (figure 17).

Fixation : réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45min ;

Coloration : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de comassie 0.2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (P/V) ;

Décoloration : réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3.12/1.5/0.37 (V/V/V). (Annexe 11)

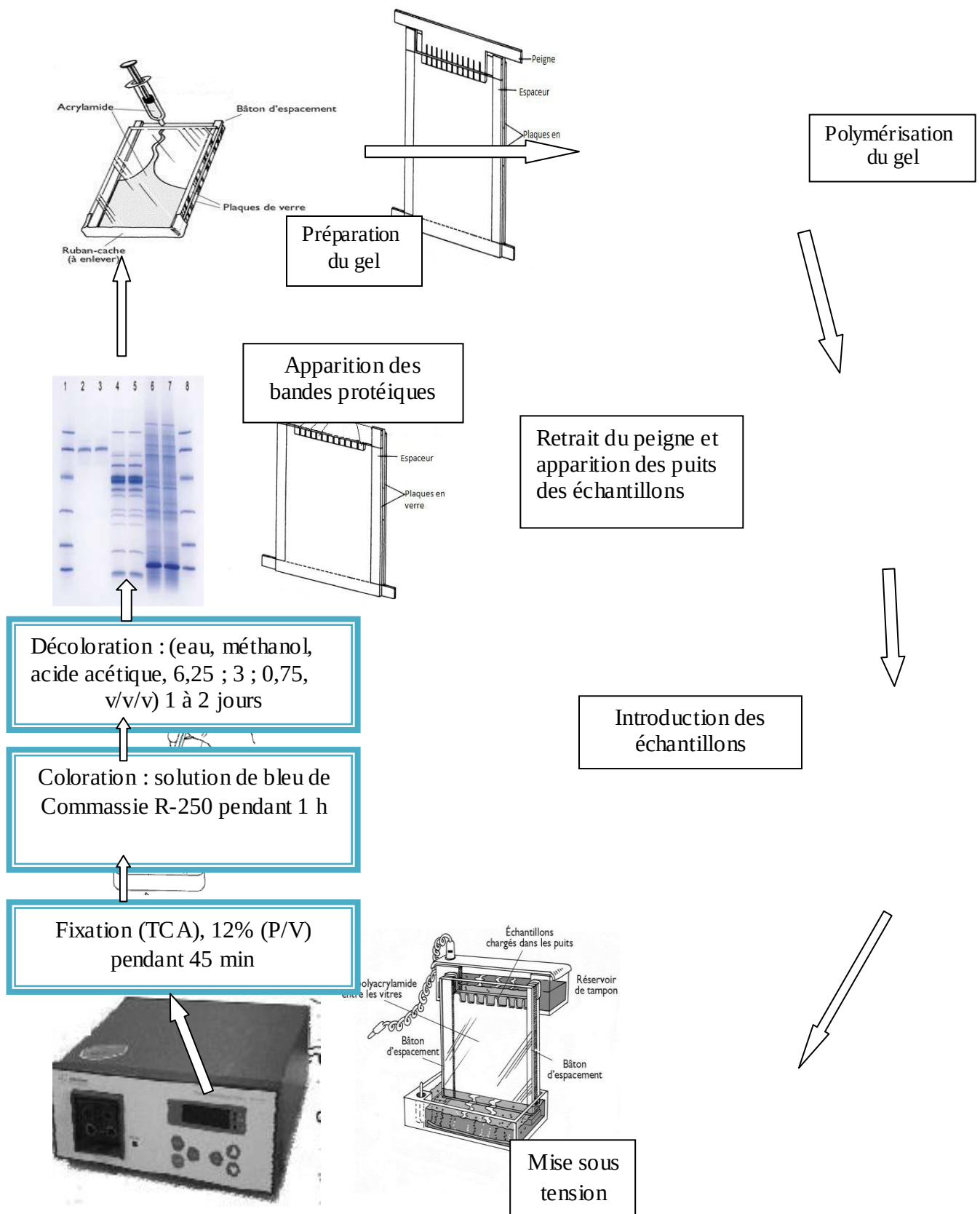


Figure 17 : Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1. Qualité physicochimique

2.3.1.1. Teneur en vitamine C dans un jus d'orange

La vitamine C ou acide ascorbique dont la formule brute est $C_6H_8O_6$ est un réducteur naturel (antioxydant), lors de l'oxydation, les deux fonctions énoles sont oxydées en cétone.

La vitamine C est nécessaire à la synthèse des vaisseaux sanguins et des muscles, elle favorise l'absorption du fer présent dans les aliments, elle intervient dans plusieurs mécanismes hormonaux, elle joue également un rôle dans l'élimination des substances toxiques. Enfin, elle a des propriétés antioxydantes, c'est-à-dire qu'elle limite les effets néfastes des radicaux libres. Une déficience en acide ascorbique peut diminuer la résistance aux infections, sa carence se traduit par une maladie appelée scorbut, par contre sa toxicité est très faible et sans danger.

La vitamine C est présente naturellement dans de nombreux aliments et principalement dans tous les fruits et les légumes. L'industrie agroalimentaire utilise l'acide ascorbique comme antioxydant sous la référence E300. Cet antioxydant en réagissant avec le dioxygène de l'air empêche ainsi le dioxygène d'oxyder d'autres molécules organiques, ce qui provoquerait un rancissement (mauvais goût) ou un changement de couleur (brunissement peu appétissant).

Le dosage de la vitamine C est effectué par titrimétrie, l'acide ascorbique s'oxyde avec le DCPIP qui est étalonné à l'aide d'une solution d'acide ascorbique pur de concentration connue ($C_1 = 0,2\text{g/l}$). Le tableau II résume les résultats obtenus.

Tableau II : pH et teneurs en vitamine C (mg/l) dans différents jus de fruits

Types d'échantillons Paramètre mesuré	Jus de citron	Jus d'orange	Jus Ramy	Jus Light	Jus Rouiba	Vita-jus
pH mesuré	3,63	4,88	4,51	4,33	3,86	4,59
Teneur en vitamine C (mg/l)	0,08	0,116	0,122	0,145	0,096	0,326

D'après les résultats obtenus on remarque que la teneur en vitamine C est élevée dans les jus commercialisés surtout pour Vita-jus du fait de sa richesse en cette vitamine. Cela pourrait être dû aussi à la présence de conservateurs dans le jus commercialisé qui a permis de protéger et ralentir l'oxydation de la vitamine C (conservation plus longtemps); mais la vitamine C est sensible à la chaleur et son taux dans les jus peut diminuer d'une façon très importante après pasteurisation (MAREZ *et al*, 2004).

Par ailleurs, le jus d'orange naturel contient une quantité un peu élevée par rapport au jus de citron, cela reflète la teneur de cette vitamine dans le fruit, qui est de l'ordre de 53mg/100g pour l'orange.

Les méthodes titrimétriques sont basées sur les propriétés réductrices de l'acide L-ascorbique. Le réactif de titrage le plus utilisé est le dichloro-2,6 phénol indophénol (TILIMANS, 1932). Ce réactif est un oxydant idéal en raison de sa sélectivité pour l'acide ascorbique qui s'oxyde facilement en sa présence. D'autres réactifs ont été proposés, mais ils ne présentent pas une meilleure spécificité que le DCPIP, il s'agit par exemple de l'iode (RAO et PRASAD, 1976) et le dihaloiodate de potassium (SKURDIN, 1980).

2.3.1.2. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

2.3.1.2.1. Indice d'acide

Le beurre de vache a un indice d'acide le plus élevé qui est de l'ordre de 39,47 par rapport à la margarine Labelle qui a un indice d'acide de 6,23. Ce résultat indique sa teneur élevée en acides gras libres.

2.3.1.2.2. Indice d'iode :

En présence de diiode, l'empois d'amidon forme un complexe de couleur violette foncée (couleur de la solution avant l'équilibre), après équivalence, toutes les espèces sont incolores, un changement de teinte est observé à l'équivalence. Le rôle de l'empois d'amidon est l'indication de la fin de la réaction.

Les résultats notés pour les différents échantillons testés sont mentionnés dans le tableau III.

Selon le codex alimentarius (2003), la margarine présente un apport essentiel en acides gras mono et polyinsaturés et aussi elle est riche en acides gras indispensables (oméga 3 et oméga 6). Par contre, le beurre est riche en acides gras saturés mais pauvre en acides gras insaturés, parce que les corps gras d'origine animale sont caractérisés par leur richesse en acide gras saturés.

Une autre méthode pourrait être appliquée, il s'agit de la méthode utilisant le réactif de Wijs, ce dernier est une solution de chlore d'iode très dangereux et doit être manipulé sous hotte avec le port de gants et bavettes). L'analyse des résultats obtenus (Tableau III) indique que l'huile d'olive ancienne (plus de six ans) possède l'indice d'acide le plus élevé vue sa teneur élevée en acide oléique et en groupement COOH libres. Pour l'indice d'iode, la margarine Labelle possède l'indice d'iode le plus élevé, vue de son origine végétale, suivi de l'huile de colza et de l'huile de soja (riche en acide linoléique, C18 :3). L'indice d'iode le plus élevé est due à la présence d'insaturations dans leur composition en acide gras. Concernant le beurre de vache et du Smen, ils possèdent un nombre inférieur en insaturations vue leur origine animale.

Tableau III : Indices d'acide et d'iode dans différentes matières grasses

Types d'échantillons Paramètre mesuré	L'huile de soja(Safia)	L'huile d'olive vierge vieille (+6ans)	L'huile de Colza	Margarine (labelle)	Smen (Mordjane)	beurre de vache
L'indice d'acide	17,45	187,49	9,75	6,23	8,35	39,47
L'indice d'iode	37,51	2,67	44,14	50,19	29,7	3.29

2.3.1.3. Teneur en glucides dans un jus d'orange méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS).

Concernant le Jus Rouiba une concentration importante en glucides est enregistrée, elle est de 26.9g/l. Cette teneur élevée serait due aux sucres ajoutés (édulcorants). Cependant, le Jus lacté a révélé une concentration trop faible de 3,15g/l par rapport à ce qu'elle devait être, car en plus du jus cette échantillon contient une certaine quantité du lait, on s'attendait à ce que la teneur en protéines soit élevée. Cette diminution peut être due aux mauvaises conditions de conservation de notre échantillon, car il a été conservé hors de son emballage à 4°C pendant 3 jours après ouverture. De ce fait, des bactéries pourraient être responsables de la dégradation du glucose et la réduction de sa teneur.

Tableau IV: Teneurs en glucides dans différents échantillons de jus

Type d'échantillon paramètre mesuré	Jus d'orange pressé	Jus Ramy	Jus Rouiba	Jus light	Jus lacté
Teneur en glucides (g/l)	4,97	24,7	26,9	9,34	3,12

D'après les résultats obtenus, les teneurs en glucides enregistrées pour les différents jus commercialisés sont différentes par rapport au jus d'orange naturel. Cependant les jus Ramy et Rouiba contiennent une teneur importante, suivi du jus light qui devrait contenir une teneur allégée. Cette méthode n'est pas particulièrement robuste mais elle fournit malgré tout des résultats acceptables sur des mélanges simples de sucres. Mais elle n'est pas très spécifiques ce qui empêche son utilisation pour l'analyse des mélanges (HUDSON et BAILEY, 1980).

Une autre méthode peut être utilisée pour le dosage des sucres réducteurs (Glc, Fru), il s'agit de la méthode de Bertrand, est une méthode à relation empirique, basée sur les propriétés des oses vis-à-vis des ions Cu^{+2} de la liqueur de Fehling en milieu alcalin à chaud, mais ce n'est pas une méthode spécifique des glucides réducteurs, d'autres substances peuvent réduire la liqueur et fausser le dosage.

2.3.1.4. Teneur en protéines dans le jus lacté: méthode de LOWRY et al(1951)

Selon les résultats obtenus, en utilisant la méthode de LOWRY *et al* (1951), l'échantillon de jus utilisé contient peu de protéines provenant du lait ajouté au jus. Le lait écrémé contient beaucoup plus de protéines par rapport au lactosérum de lait de vache et le jus lacté. Cette méthode présente des avantages : elle est rapide, peu coûteuse. Cependant, elle présente aussi des inconvénients lesquels sont : son mécanisme d'action qui est mal connu et la dépendance étroite de la coloration avec la composition en acides aminés des protéines, ainsi que elle peut donner des résultats qui ne sont pas plus fiables.

D'autres méthodes sont utilisées pour doser les protéines du lait tels que: méthode de Bradford, Biuret et Kjeldahl, ces méthodes ont des avantages comme elles ont aussi des inconvénients.

Tableau V : Teneurs en protéines dans différents échantillons

Echantillon	Laitécrémé de vache	Lactosérum de lait de vache	Jus lacté
Concentration (g/l)	35	6,13	5,55

2.3.2. Méthodes de séparation et purification (méthodes chromatographiques)

2.3.2.1. Hydrolyse acide des sucres

Nous avons utilisé l'acide H_2SO_4 afin d'hydrolyser la liaison osidique β (2-1) du saccharose, pour une utilisation ultérieure en CCM.

2.3.2.2. Isolement des monosaccharides par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince fait appel à des forces d'adsorption et des phénomènes de partage entre les solvants. Elle permet de séparer les petites molécules (monosaccharides) selon leur affinité pour 2 phases :

- la phase stationnaire solide, le support est le gel de silice qui joue le rôle d'adsorbant. Il adsorbe des molécules de soluté contenues dans la phase mobile, grâce à des forces de rétention par adsorption entre le support et les solutés. Cette adsorption empêche le déplacement des molécules de soluté, ce qui favorise des interactions plus importantes, donc une meilleure séparation des composés.

- la phase mobile liquide, c'est le solvant qui va permettre le déplacement et la migration des molécules.

Après migration et révélation, des taches rougeâtres violacées sont obtenues pour les standards (Glc, Gal et Fru), quant à l'échantillon (sac), la tâche a été révélée hors du front de migration (figure 11).

Les glucides ne sont pas colorés, il faut donc utiliser la réaction de Molish pour les visualiser. Le réactif est du 1-Naphtol en solution éthanolique et sulfurique, qui est appliquée en bain d'immersion, qui doit se faire délicatement (précaution et port de gant et bavette), car ce réactif est nocif par contact avec la peau et par ingestion.

Pour la révélation de l'échantillon qui était hors le front de migration, cela peut être due à une moindre concentration utilisée (0,2g/l) ou bien à la dégradation de la solution de saccharose préparée, du fait qu'elle était conservée dans le réfrigérateur à $+4^{\circ}C$, il y a eu prolifération microbienne des bactéries ou levures qui utiliseraient les oses (Glc et Fru) comme source d'énergie.

Chaque constituant migre à une certaine hauteur, sur la plaque CCM, caractéristique de la substance et que l'on appelle : rapport frontal ou rétention frontale. Les distances obtenues sur la plaque CCM sont mentionnées dans le tableau VI

$$R_f = \text{hauteur de la tache} / \text{hauteur du front du solvant}$$

Tableau VI : Distances parcourues par les différents monosaccharides par CCM.

Le sucre \ Paramètre mesuré	fructose	glucose	galactose
Distances de migration (cm)	7,1	7,2	6,8
Rapport frontal (cm)	0,46	0,47	0,44
Front du solvant (cm)	15,3		

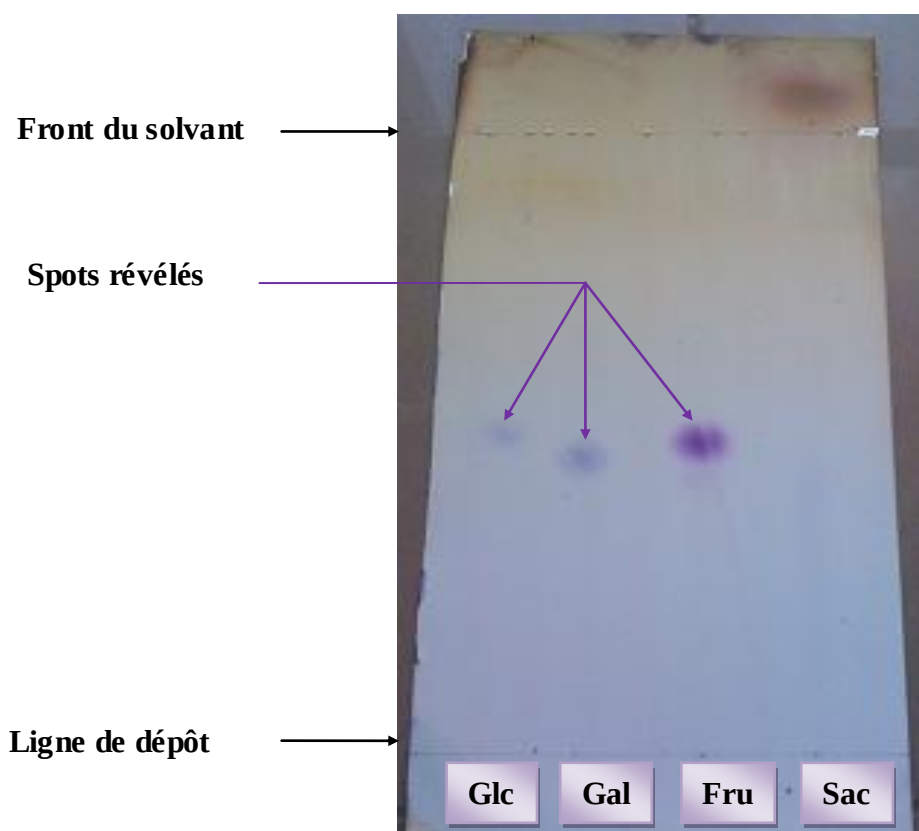


Figure 11 : Plaque de chromatographie sur couche mince montrant la migration des standards (Glc, Gal et Fru) et du saccharose après hydrolyse acide du saccharose.

2.3.2.3. Isolement des séroprotéines par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

La chromatographie de filtration sur gel permet de séparer des molécules selon leur taille et leur forme moléculaire. Cette méthode utilise une phase stationnaire composée de billes poreuses de dimensions précises et uniformes dans lesquelles les molécules de dimensions appropriées peuvent s'insérer et être retenues un certain temps.. Les molécules de grandes tailles (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) passent quant à elles entre les sphères et sont rapidement éluées de la colonne par la phase mobile. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et purification des protéines. Dans cette manipulation, nous avons essayé de fractionner les protéines sériques bovines et caprines, en utilisant la chromatographie de perméation sur Séphacryl S200. Après séparation, les séroprotéines ont été éluées comme indiqué dans le chromatogramme (figure 18A) en quatre piques notés F1, F2, F3 et F4 et la même chose pour les protéines sériques du lait de brebis F'1, F'2, F'3 et F'4 (figure 18B). Le débit utilisé est de 28ml /h. L'élué du bleu de dextran a donné un volume mort $V_0=16,8$ ml.

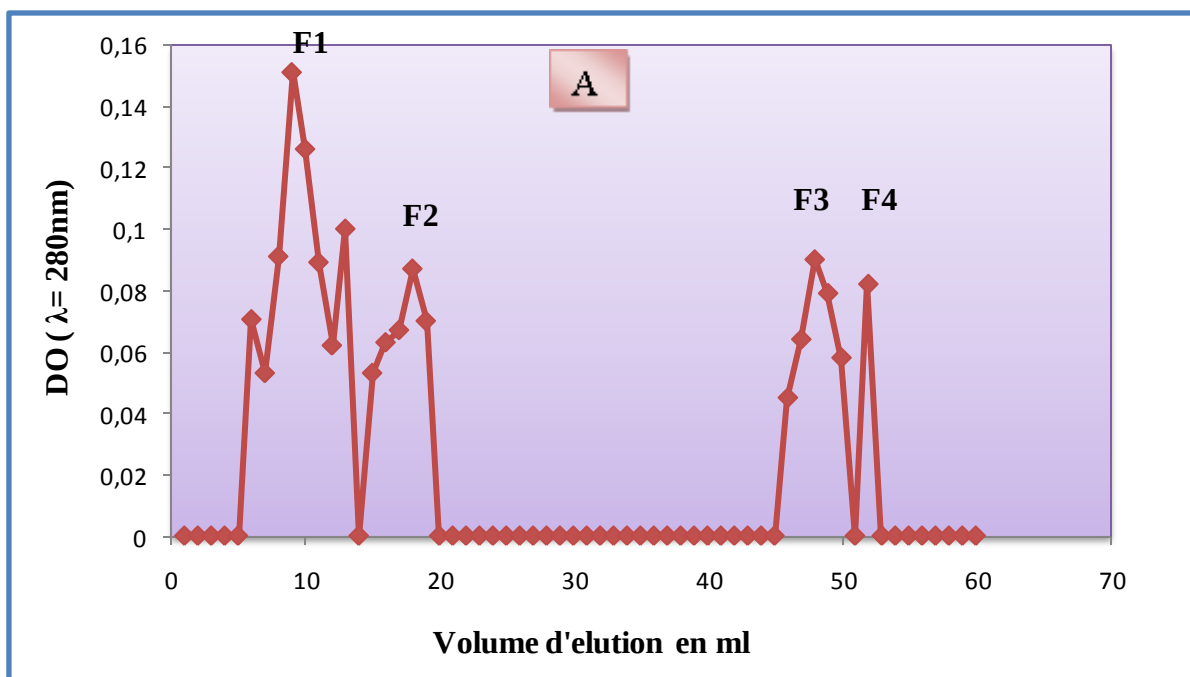


Figure 18A: Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur séphacryle S200.

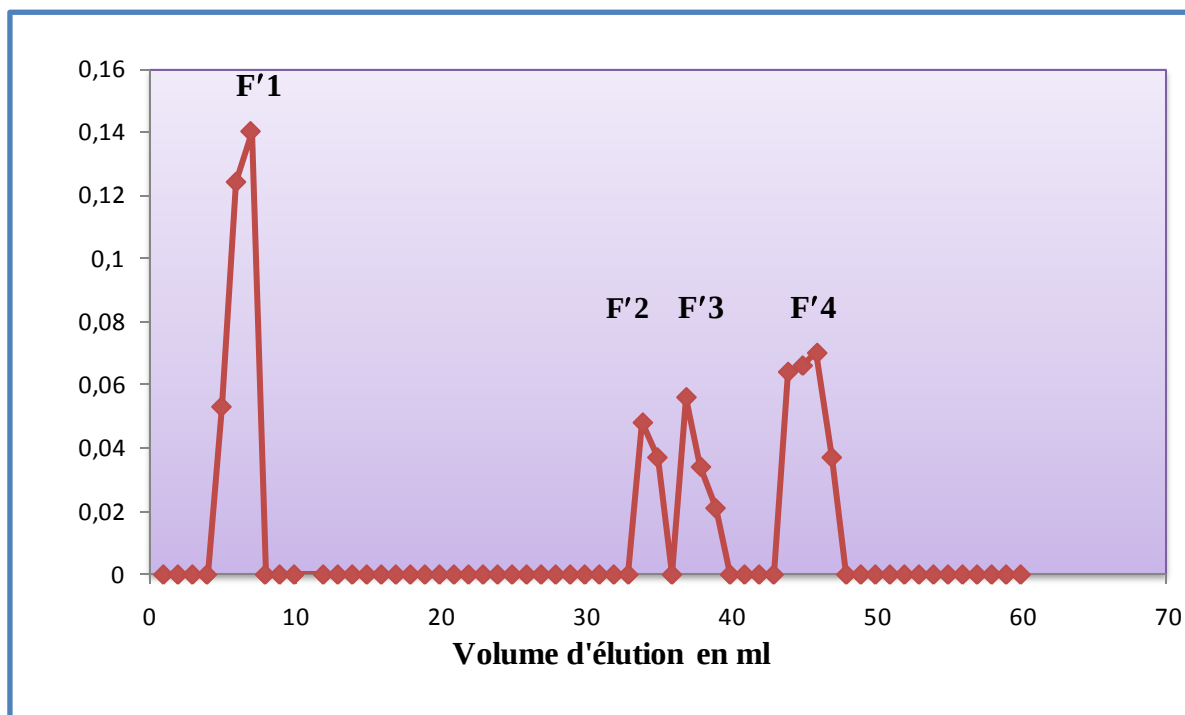


Figure 18B :Chromatogramme des protéines sériques lyophilisés de brebis sur S200.

2.3.3. Méthodes de caractérisation (méthodes électrophorétiques)

2.3.3.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne

La papaïne est une protéase d'origine végétale de PM de 25, qui catalyse l'hydrolyse des protéines dans des sites bien spécifiques, c'est une enzyme d'intérêt industriel dont ces principales applications, l'industrie alimentaire, clarification de la bière, ainsi que la préparation d'hydrolysats de protéines. Elle clive préférentiellement les liaisons peptidiques impliquant les acides aminés basiques, en particulier l'arginine, la lysine et les résidus suivants la phénylalanine (AMRI et MANBOYA, 2012).

Nous avons suivi la cinétique de cette enzyme par électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS). On a obtenu des hydrolysats à différents temps d'incubation notés en minutes comme suit : T'0, T'15, T'30, T'60 et T'120.

2.3.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétique des séroprotéines bovines et caprines en conditions natives (PAGE-native)

L'électrophorèse en PAGE-native permet de garder les protéines dans leur état natif, ce qui fait de la PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques du lait bovin (MATI, 1992). Les molécules sont séparées selon leur poids moléculaire ainsi que leur charge (WITTIG *et al.*, 2007) et apparaissent sous forme de bande de migration variant par leur position et leur intensité.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-native (figure 19) montre l'existence de quatre bandes principales A, B, C et D au niveau de l'échantillon contenant les standards (protéines sériques bovines). Dans le cas du lait bovin, les protéines sériques migrent en cinq bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétique aux immunoglobulines (IgS), le sérum albumine bovine (BSA), l'alpha-lactalbumine (α -La) et à la fin de migration la bêta-lactoglobuline (β -Lg). (KINGSBURY et GAUNT, 1967 ; EGITO *et al*, 2001 ; ERIKSEN *et al.*, 2010).

Le premier puit correspond au témoin a révélé la migration des protéines standards (par rapport à leur poids moléculaire) ordonner comme suit :

$$\text{Ig} < \text{BSA} < \alpha\text{-La} < \beta\text{-Lg}$$

Les Ig sont ceux qui se déplacent le moins sur le gel (mobilité très faible), vue leur PM très élevé qui ne leur permet pas de migrer plus loin, alors que la β -Lg à le niveau de migration le plus loin. Elle représente la principale protéine du lactosérum du lait (bovin, ovin et caprin). Alors que l' α -lactalbumine est la protéine soluble majeure du lait des camélidés (BEG *et al*, 1985; CANTISANI *et al*, 1990), des rongeurs (VILOTTE et SOULIER, 1992) et du lait de l'homme (BRIGNON *et al.*, 1985).

Pour la F1 de lait de vache, on a obtenu cinq bandes correspondant aux différentes protéines sériques, qui sont similaires à celles obtenues par SI AHMED (2009), et bien le même résultat obtenue par SENOUSSE (2011). Pour la F2 on n'a eu que deux bandes correspondant à α -la et β -Lg.

Pour F3 et F4 elles n'ont pas pu être révélées, cela est dû à la concentration infime en protéines dans ces fractions collectées précédemment (chromatographie à basse pression).

Pour le lactosérum du lait de brebis, il n'y a que la F'1 qui a été révélé avec apparition de deux bandes (IgS et BSA). Pour les autres fractions, F'2, F'3 et F'4 n'ont pas été révélées.

D'après MATI *et al* (2012), La β -lactoglobuline apparaît seulement dans le lait de bovin, ce qui est en accord avec les données éditées par FARAH (1986) et OCHIRKHUYAG *et al* (1998).

Dans cette manipulation, il n'y a pas de dosage par Lowry de protéines dans les fractions concentrées, c'est la raison pour laquelle la concentration en protéines dans nos échantillons est inconnue, ce qui a induit des fractions non révélées à savoir F3 et F4 du lactosérum bovin ainsi que F'2, F'3 et F'4 du lactosérum caprin.

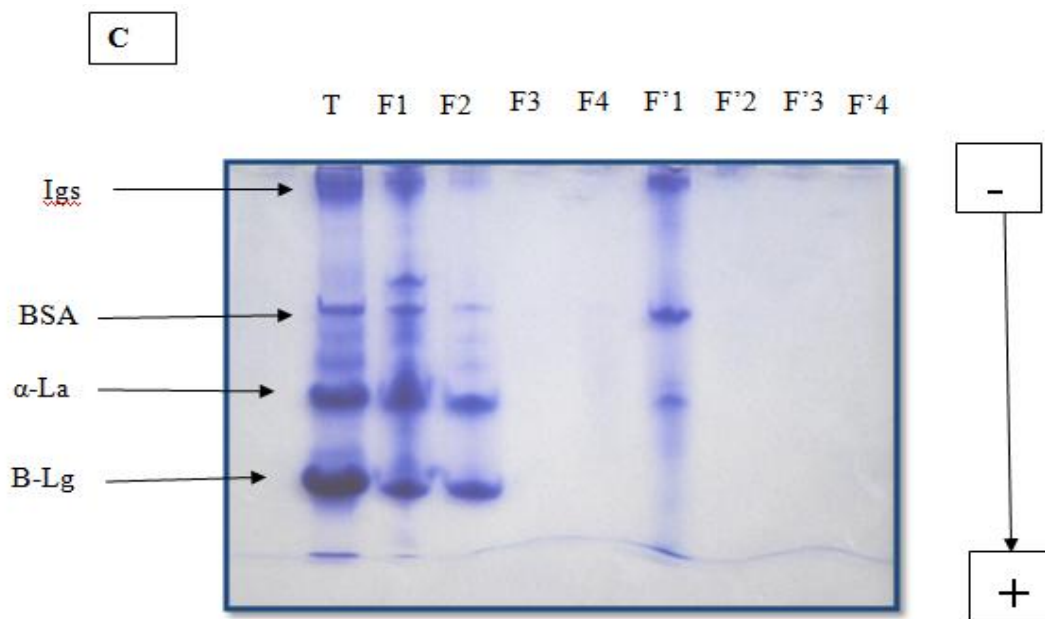


Figure 19: Electrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native); gel à T= 12 %, C=2,7 %.

2.3.3.3. Isolement et caractérisation électrophorétique des hydrolysats de protéines sériques bovines par la papaine en conditions dénaturantes (PAGE-SDS)

En présence de 2-mercaptoéthanol comme agent réducteur, c'est possible de séparer les caséines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cet agent agit en dénaturant les protéines par destruction de leur structures tridimensionnelles natives, on rompant les liaisons hydrogène et les ponts disulfures ce qui permet de réduire les interactions entre les différents sous unités.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS (Figure 20A) montre l'existence de trainée de couleur, cela est dû au gel utilisé ; il y a eu des contaminations lors de son coulage, ou bien lors de sa polymérisation, ceci pourrait être aussi dû à la qualité des échantillons. L'hydrolyse enzymatique n'a pas été bien réalisée, le temps ou la durée d'incubation n'ont pas été bien respectées.

La figure 20 B, montre le profil électrophorétique réalisé par d'autres manipulateurs au laboratoire, son analyse révèle l'existence de bandes serrées au niveau de l'échantillon témoin correspondant à T'0. Concernant l'échantillon T'15, des bandes claires bien séparées sont révélées, traduisant l'hydrolyse enzymatique des protéines en polypeptides. En ce qui concerne l'échantillon T'30, les bandes sont encore plus claires et moins nombreuses. Pour l'échantillon T'60, il ya eu quelques bandes très fines et séparées, par contre pour l'échantillon T'120, il n'a révélé aucune bande, ce qui signifie la dégradation enzymatiques des protéines sériques bovines.

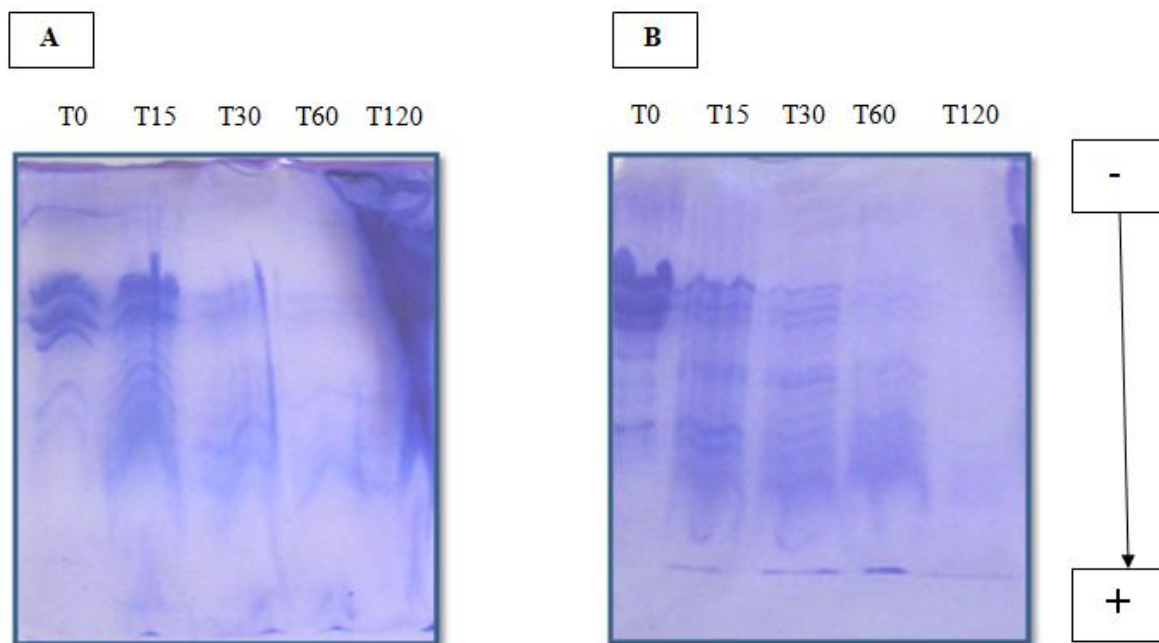


Figure 20 :Électrophorégramme des hydrolysats (caséines lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; Gel de concentration (T=4% et C=2,7%), gel de séparation (T=17% et C=2,7%).

A : profil obtenu par notre manipulation. B : profil obtenu par d'autres manipulateurs.

2.4. Conclusion

L'évaluation des paramètres physicochimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. Si la description des techniques les plus divers laisse bien évidemment un choix étoffé, elle permet néanmoins d'accroître les chances de mener à bien une évaluation de la qualité.

A coté des dosages physicochimiques qui figurent parmi les méthodes les plus répandues (dosage de la vitamine C, dosage des glucides, dosage des protéines et détermination de l'indice d'iode et d'acide), d'autres méthodes prennent l'ampleur. Ainsi les méthodes chromatographiques et électrophorétiques par exemples, constituent d'autres stratégies pour la mise en œuvre d'un protocole de contrôle.

Les méthodes d'analyse classiques permettent de définir la composition d'un produit alimentaire pour élaborer une stratégie d'analyse et de contrôle appropriée selon le produit en présence.

Le contrôle de la qualité d'un produit alimentaire offre la garantie de répondre à cinq critères fondamentaux, il s'agit de la sécurité, soit les critères sanitaires et de salubrité, la santé, soit l'aspect nutritionnel et de non toxicité, la satisfaction, le service, enfin la standardisation.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alain R. (1997). Biochimie dynamique. P. 138-139-114-119.

ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2003). Biochimie alimentaire. Ed. Dunod, Paris, P51-71.

AMRI E. et MANBOYA F. (2012). Papain, a plant enzyme of biological importance. *Am. J. of biochem. and biotech.*, **8(2)**, 99-104.

ASCHERIO A. et WILLET W-C. (1997). Health effects of trans fatty acids, 66.

Association Française de Normalisation (AFNOR) (1984). Recueil de normes françaises des corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés, 3^{ème} Ed.

AUDIGIE C-L., ZONSTAIN F. (1991). Biochimie structurale. Doi editions, France. P. 261.

AUDIGIE C.L., FIGARELLA J. and ZONSTAIN F. (1978). Manipulations d'Analyses Biochimiques. Doi editions, Paris.

BADOUD R., LÖLIGER J. et ALAIN E. (2010). Science et technologie des aliments : principes de chimie. PP 105-147 et 567-568.

BEAUDEUX J.L. et DURAND G. (2011). Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2^{ème} Ed ; Paris ; P 146-147.

BEG O. U., BAHR-LINDSTRÖM H. V., ZAIDI Z. H. and JÖRNVALL H. (1985). The primary structure of α -Lactalbumin from camel milk. *Europeans J Biochemical*, **147**, 233-239.

BESSON M. et GARNEAU I. (2003). Avec du beurre, c'est bien meilleur. *Expo-J*, rapport interne, programme des Sciences de la nature, Cégep de Saint-Félicien, Saint-Félicien, P.13.

BRIGNON G., CHTOUROU A. and RIBADEAU-DUMAS B. (1985). Does β -lactoglobulin occur in human milk. *J of Dairy Science*, **55**, 249-254.

BURCHARD H. (1890). « Beitrage zur Kenntnis des Cholesterins », *Chem. Zentralbl.*, **61**, p. 26.

BURGOT G. et BURGOT J-L. (2002). Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications. Ed : Tec et Doc Lavoisier. pp : 53-103-142.

BURKE R-W., DIAMONDSTONE B-I., VELAPOLDI R-A. et MENIS O. (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clin. Chem.*, **20**, (7), p. 794-801.

CANTISANI A., NAPOLITANO L., GIUFFRIDA M. G. and CONTI A. (1990). Direct identification and characterization of llama Whey proteins by microsequencing after western blotting. *J of Biochemical and Biophysical*, **21**, 227-236.

CERF M. (1986). Les matières grasses alimentaires dans l'organisme. In lipides et santé. Ed : information aux médecines, Boulogne, Lessieur, 38-47.

CHRISTIE W.W., DOBSON G. et ROBERTSON G.W. (1998). Determination of the structure of fatty acids. *Plant Biochem. Phytochem.* P. 104-106.

CLAVERIE I., PANET M. et BARBEAU S. (2008). Biochimie .P. 84-85.

CLEMENT G. (1956). Dosage des lipides dans les produits alimentaires. PP : 237-248.

Codex alimentarius.(2003). Food and Agriculture Organisation of the United Nation. *World Health Organisation*, via delle terme di Caracalla 00100 Rome. Italie.

DEPLANQUE B., JUSSELIN I. et LEROY B. (1999). Intérêt nutritionnel des huiles d'olive O.C.L., 86-93.

DUBOIS N. (2005). Optimisation de l'analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse (CPG) : Application à l'étude de lipides naturels complexes. Thèse de doctorat de l'école pratique des hautes études. Paris.

EGITO A S., GIRARDET J.M., MICLO L. and GAILLARD J. L. (2001). Highly sensitive periodic acid/schiff detection of bovine milk glycoproteins electrotransferred after nondenaturing electrophoresis, urea electrophoresis, and isoelectric focusing. *Lait*, **81**, 775-785.

ERIKSEN E. K., HALVOR H., JENSEN E., AABOE R., TOVE G. D., JACOBSEN M. and VEGARUD G. E. (2010). Different digestion of caprin whey proteins by human and porcine gastrointestinal enzymes B. *J of Nutrition*, **22**, 1-8.

FARAH Z. (1986). Effect of heat treatment on whey proteins of camel milk. *Milchwissenschaft*, **41**, 763-765.

FRANCOISE L., CHRISTIAN P. et PATRICE C. (2000). Exercices de biochimie.

FREDOT E. (2005). Connaissance des aliments bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique. Ed. Tec & Doc. Lavoisier, 424.

FRENOT M. et VIERLING E. (2001). Biochimie des aliments diététiques du sujet bien portant. Ed. doin.cudp. Paris. PP 71-105.

GARRET H. et CHARLES M-G. (2000). Biochimistry, second edition, by Reginale, Paris.

GAVRILOVIC M., MAGINOT M-J., SCHWARTZ-GAVRILOVIC C. et WALLACH J. (1996). Manipulations d'analyse biochimique. Biosciences et techniques. Doïn éditeurs-Paris.

GOUDET P et YINDOULA J. (2008). Chimie biochimie alimentaire Edition : Laurence Audenet verrier. Paris.

GRAILLE J. (2003). Lipides et corps gras alimentaires. Ed. Tec & Doc, Londres, Paris, New york.

GREENFIELD H. et SOUTHGATE D-A-T. (2007) .Données sur la composition des aliments. Éditeurs scientifiques:B.ABurligame et U.R.Charronotère. Organisation de nations unis pour l'alimentation et l'agriculture Rome.

HEATHER G.et SOUTHGATE D-A-T. (2007).Données sur la composition des aliments. Pages 117-122.

HENNEN G. (1996). Biochimie humaine : introduction biochimique à la médecine. P. 373

HENRI D. (1992). Alimentation et nutrition humaine.

HILLIER R-M. (1976).The quantitative measurement of whey proteins using polyacrylamide gel electrophoresis.*J. of Dairy Research*, **43**, 259-265.

HUDSEN et BAILEY (1980). Revue critique des méthodes d'analyses, chapitre 7, 19-20.

JACOTOT B. (1994). Acides gras monoinsaturés alimentaires et lipoprotéines : intérêt du régime méditerranéen O.C.L., 97-98.

JEANTET R., CROGUENNEC T., SCHUCK P.et BRULE G.(2008). Sciences des aliments, T. 2. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 449.

KINGSBURY EDWARD T. and GAUNT STANLEY N. (1967).Heterogeneity in whey proteins of mare milk.*J of Dairy Science*, **60** (2), 274-277.

LAEMMLI U-K. et FAVRE H. (1973). Maturation of the head bacteriophage T4. I. DNA packing events. *J. of mol. Biology*,**80**, 575-599.

LERAY C. (2010). Les lipides dans le monde vivant, édition Tec et Doc. Lavoisier, Paris.

LIEBERMANN N-C.(1885). ÜberdasOxychinoterpen, *Ber.*,**18**, p. 1803.

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

MAREZ M., JEHL B. et MADET N. (2004).L'acide ascorbique et son utilisation entant qu'additif dans les industries alimentaires, licence, Gaulle, Paris.

MATI A. (1992). Les protéoses peptones dans les laits bovin, ovin et caprin : isolement caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Thèse Doctorat ; Université de Nancy I ; Paris ; France.

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

MATHIEU J-M., FONTENEAU M-J. (2008). Le manuel porphyre du préparateur en pharmacie. France, pages 670-680.

MORDRET F. (1992). Analyse des corps gras. In manuel des corps gras. Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1158-1181.

MORDRET F. (1999). La qualité de l'huile d'olive, 69-76.

MULTON J-L. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Ed : Tec et Doc Lavoisier. Volume 4. 289-290, pp : 312-329.

OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. and HAERTLE T. (1998). Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and bacterian camel. *J Food Chemistry*, 22, 105-124.

PASCAL G. (2000). Les lipides dans notre alimentation : comment leurs accorder une juste place sans les diaboliser ni les encenser .O.C.L. 54-59.

PERRIER R., VANDER KEMPA. et ZONSZAIN F. (1997). Expérience faciles et moins faciles en sciences biologiques. Drin éditeur, France.

RAISONNIER A. (2002). Structures biologiques-objectifs prérequis pour biochimie PCEM2, Biochimie métabolique et régulation C1. Faculté de médecine Pierre et Marie curie Paris. VI. P52-55.

RAO N-V. et PRASAD K-M-M. (1976). Azine dyes as iodometric indicators. *Indian J. Chem. Sect. A*, 14A, 290-291.

REGINALD H., GARRETT, CHARLES M. et GRISHAM. (2000). Biochimie.

ROCHE J. (2005). Composition de la graine de tournesol (*Helianthus annuus* L.) : Thèse Doctorat de L'institut national polytechnique de Toulouse. PP16-22.

ROCQUELIN G. et LEGER C-L. (1992). Modulation de la structure et des fonctions des membranes cellulaires par les lipides alimentaires. In manuel des corps gras. Ed. Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 576-607.

ROUESSAC F. et ROUESSAC L. (1995). Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes. 2ème Ed : Masson ; Paris ; P 303.

SI AHMED S. (2009). Isolement, purification et étude de la sensibilité à l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait de dromadaire ; Mémoire de Magister ; Université Mouloud Mammeri ; Tizi-Ouzou ; Algérie.

SENOUSSI C. (2011). Les protéines sériques du lait camelin collecté dans trois régions du sud algérien et de séparation et caractérisation de la fraction protéose peptone ; Mémoire de Magister ; Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou ; Algérie.

SKURIDIN G-M. (1980). Détermination de l'acide ascorbique dans les baies de nerprun par titrage potentiométrique (en russe). *Izv. Sib. Otd. Akad.Nauk.Sev. Biol. Nauk.*, **3**, 122-127.

SOLDATI T. (2010). Travaux pratique de biochimie, Analyse de lipides.

SOUETRE P. (2003). Biochimie structurale. Editions pradel, 1ère édition. P. 20-25 et 66-70.

TILLMANS J., HIRCH P. et JACKISH J. (1932). Reduction capacity of plant foods tuffs and its relations to vitamin C. III-Quantities of Reducting substances in various fruits and vegetables. *Z. Untersuch. Lebensm.*, **63**, 241-267.

TOUITOU Y. (2005). Biochimie : structure des glucides et lipides PCEM1. Faculté de médecine Pierre et Marie curie. Université Paris V. PP31-34.

VAUBOURDOLLE M. (2007). Biochimie, Hématologie. Tome 2, 3e édition ; P. 534-633.

VAUBOURDOLLE M. (2007). Toxicologie sciences mathématiques, physiques et chimiques. Tome 1, 3e édition. P. 653.

VERMA B-C., KUMAR S. et ATWAL B-S. (1980). Indicateurs colorés utilisables pour le dosage cérimétrique de l'acide ascorbique en milieu non aqueux ; para aminophénol et phénylène (en russe). *Zh. Anal. Khim.*, **35**, 366-388.

VERMA K-K. et PALOD S. (1983). Determination of ascorbique acid in fruit and pharmaceutical by titration with thallium. *Mikrochim.*, **2**, 361-367.

VERMA K.K., JAINA. et RAWAT R. (1984). Titrimetric determination of ascorbic acid using chloranil. *J.Assac. Off. Anal. Chem.*, **67**, 262-265.

VILOTTE S.L. and SOULIER S. (1992). Isolation and characterization of the mouse alphasal encoding gene: interspecies comparison, tissue-and stage-specific expression. *Genetics*, **119**, 287- 292.

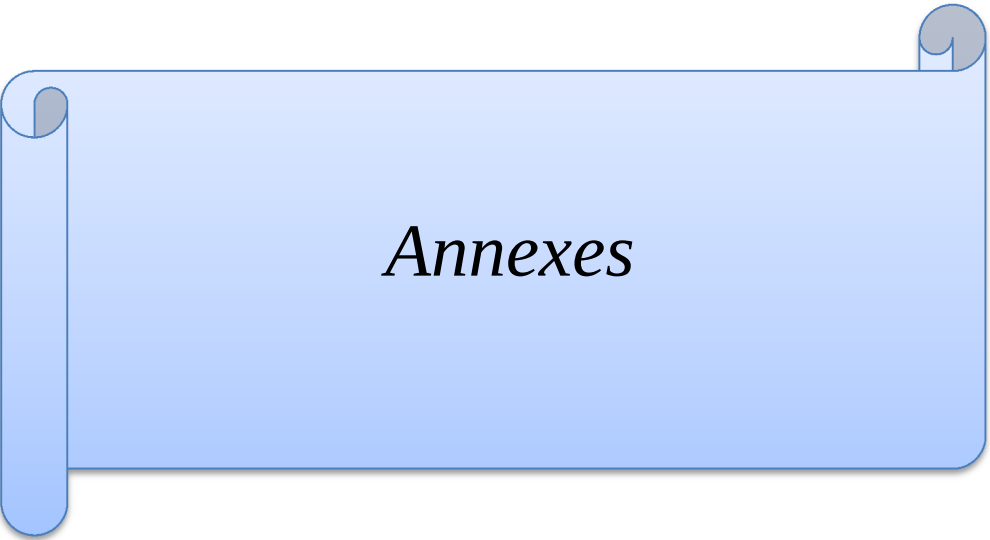
VOET D. et VOET J-G. (2005). Biochimie. Ed. Boeck &Larcier, Bruxelles, P970.

WEIMAN S. et MEHUL P. (2004). Toute la biochimie. Ed. Dunod, Paris. P81.

WERNER J-B., BADOUD R., LOLIGER J. et ALAIN E. (2010). Principes de chimie de constituants et de technologie des procédés. 1re édition, Romande.

WHISHAW K. (2001). Cerveau et comportement. Etats-Unis, New York.

WITTIG IKA., MICHAEL K. and HERMANN S. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Proteins Complexes. *Molecular and Cellular Proteomics*, **6**(7), 1215-1225.



Annexes

ANNEXES

Annexe 01 : Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode au 2-6-DPIP

Réactifs :

Solution de 2-6-dichlorophénol indophénol à 0,05g/l, préparée de la manière suivante :

- Sel de sodium du 2-6-DPIP é é é é é é é é é é é é é é é é 0,05g
- bicarbonate de sodium é é é é é é é é é é é é é é é é .0, 02g
- eau distillée chaude é é é é é é é é é é é é é é é é .300ml
- laisser refroidir et ajuster à 1000ml avec de l'eau distillée froide, puis filtrer.

- Solution d'acide ascorbique à 0, 04g/l
- Acide acétique glacial (99à100%)

Mode opératoire :

Dans un bécher de 10 ml, introduire :

- 1 ml de solution à doser ;
- Ajouter 200 µl d'acide acétique glacial, mélanger ;
- Verser goutte à goutte la solution du 2-6-DPIP à l'aide d'une burette, jusqu'à apparition d'une coloration rose pâle persistante.
- Lire le volume sur la burette (chute de burette), soit V (ml)

Etalonnage de la solution d'acide ascorbique :

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon de concentration $C_1=0,04\text{g/l}$. elle correspond à une chute de burette V_1 (ml).

Expression des résultats :

La teneur en vitamine C en mg/l, est donnée par la relation suivante :

$$C_2 = (C_1 \times V_1 / V_2) \times 1000$$

Où : C_1 : concentration en acide ascorbique de la solution étalon

C_2 : concentration en vitamine C dans le lait inconnue

V_1 : chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon

V_2 : chute de burette dans le cas du lait

Annexe 02 : détermination des indices diode et d'acidité d'une matière grasse

1- l'indice d'acidité :

Protocole expérimental :

-Peser 2,5g de matière grasse (la margarine labelle et le beurre de vache dans des béchers différents) puis on les dissout dans 5 ml d'éthanol ;

-Titrer immédiatement avec la potasse alcoolique (0,1N), en présence de 3 gouttes de phénolphthaleïne jusqu'à l'apparition d'une coloration rose-pâle persistante.

Expression des résultats :

L'indice d'acide est calculé par la relation suivante : $IA = V.N.56,1/m$

IA : indice d'acide ;

N : Normalité de la solution éthanolique de KOH ;

V : Volume de la solution éthanolique de KOH exprimé en ml ;

M : masse de la prise d'essai de la matière grasse en (g) ;

56,1 : masse molaire de KOH.

2-L'indice diode :

Protocole expérimental :

-Préparer deux tubes, un tube témoin qui contient du lugol seul et un autre qui contient le lugol et l'échantillon.

-Titrer avec une solution de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3$, 0,02N), et déterminer les volumes de thiosulfate nécessaire pour le titrage des deux.

1-préparation du tube témoin : introduire dans un tube à essai 5ml de lugol et quelques gouttes d'amidon (le mélange est bleu). Déterminer le volume V1 de thiosulfate de sodium nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans le tube témoin.

2-préparation du tube échantillon : introduire dans un tube à essai 5ml de lugol, 0,5ml de la matière grasse puis chauffer pendant 5min (bien homogénéiser le long du chauffage). Après refroidissement, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon (mélange bleu) puis verser le thiosulfate goutte à goutte en agitant, jusqu'à décoloration. Déterminer le volume V2 nécessaire pour neutraliser l'iode contenu dans l'échantillon.

Expression des résultats :

Ii est calculé par l'équation suivante (AFNOR, 1984) ;

$$Ii(g/100g) = (V_0 - V) \cdot 0,01269 \cdot 100/p$$

V_0 : volume (ml) pour doser le témoin

V : volume du thiosulfate (ml) pour doser l'échantillon

P : poids de la matière grasse.

Calcul de l'indice d'iode :

Puis, on détermine le nombre d'insaturation dans nos matières grasses, donné par l'équation suivante :

$$nI = \frac{I \cdot m}{MI_2} \cdot 100$$

nI : nombre d'insaturation m : masse du corps gras MI_2 : masse molaire de l'iode

Annexe 03 : Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique(DNS)

-Réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de glucose à 1g/l ;

-Préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons inconnus (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} é .) dans le cas où ils sont concentrés (leurs DO à 530 nm après la réaction doit être incluse dans la gamme étalon).

-Gamme étalon :

Numéro du tube	01	02	03	04	05	06
Solution de Glc (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
DNS (ml)	2	2	2	2	2	2

Protocole expérimental :

-Préparation des différentes dilutions de l'échantillon ;

-Mettre 1 ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;

-Ajouter 2ml de réactif (3,5DNS) ;

-Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5mn ;

-Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;

-Ajouter 7 ml d'eau distillée et homogénéiser ;

-Laisser reposer 15 mn à température ambiante ;

- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc.

Expression des résultats :

Une courbe étalon est tracée $DO=f$ (concentration en glucose). Puis la quantité de sucres réducteurs présente dans les jus est déterminée.

Tableau : les densités optiques obtenues lors du dosage des sucres par la méthode utilisant l'acide dinitrosalicylique (DNS)

Les concentrations en glucose (g/l)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Les densités Optiques (nm)	0	0,147	0,310	0,503	0,695	0,872

Annexe 04 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951)

Préparation des solutions :

-Solution A: 2% de Na_2CO_3 (2g dans 100 ml d'eau distillée) dans NaOH, 0,1 mol (Mm NaOH =40g/l=40mg/ml=0,4g/l)

-Solution B : 2ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5% (0,5g dans 100ml+2ml de tartrate de Na^+ et K^+ , 1% (1g dans 100 ml)

-Solution C : 50ml de A+ 1ml de B

Gamme étalon

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

Numéro du tube	01	02	03	04	05
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	0	30	50	80	100
Solution mère de BSA (μl)	0	150	250	400	500
Eau distillée (μl)	500	350	250	100	0

Méthode expérimentale

A 0,5 ml de la solution de l'échantillon contenant entre 25 et 100 μg de protéines :

-ajouter 2,5 ml de la solution C et mélanger ;

- laisser 5-10 mn à température ambiante ;
- ajouter 250 µl de réactif de Folin ï ciocalteu ;
- homogénéiser rapidement et mettre les tubes 30 mn à l'obscurité ;
- après 30 mn, homogénéiser les solutions rapidement et lire la DO à 750nm contre le blanc pour la gamme et l'échantillon.

Expression des résultats :

Une courbe étalon $DO=f(C)$ est tracée. Puis la concentration de la protéine inconnue X est déterminée.

Tableau : Les densités optiques obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de LOWRY, BSA utilisée comme protéine de référence

concentrations (g/ml)	0	30	50	80	100
densités optiques (nm)	0	0,106	0,133	0,181	0,287

Annexe 05 : Protocole suivi pour l'hydrolyse acide des sucres

- Peser 10 mg de saccharose dans un tube à essai à vice, mis dans un bécher sur une balance de précision préalablement tarée ;
- ajouter 125µl d' H_2SO_4 et on homogénéise ;
- incuber pendant 45 mn à température ambiante ;
- ajouter 1,35 ml d'eau distillée ;
- incuber pendant 3h à 100°C au bain marie ;
- laisser refroidir puis neutraliser l'acide obtenu par la solution d'ammoniac (on ajoute 200µl d'ammoniac et on vortex au fur et à mesure tout en vérifiant le virage de la couleur jusqu'à la neutralité obtenue par la couleur verdâtre qui correspond à un pH=7).

Glycine é 7,2g

Eau distillée é 250ml

Tampon d'œchantillon

Tampon du gel (B) é ...100µl

Eau distillée é .700µl

Glycérol 50%.....200µl

Bleu de Bromophénolé é é é é é é é é é é é é é é é é é Une tête d'aiguille

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

Electrophorèse :

Préparation du gel T=12% et C=2,7% (pour une plaque)

Solution A é .3, 25ml

Solution B é 5ml

Eau distillée é ..1,68ml

Dégazer le mélange (maximum 2 mn)

TEMED é .10µl

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

Couler et mettre le peigne immédiatement

Pour la PAGE-SDS :

Solution d'acrylamide (prête à l'emploi)

Tampon de gel de séparation

Trisé ...9,25g

Eau distillée é ..50ml

Ajuster à pH 8,8 avec de Hcl 4N

Tampon de gel de concentration (solution C)

Trisé .1, 5 g

Eau distillée é ...25ml

Ajuster à pH 6,8 avec de Hcl 4N

Tampon d'électrode

Trisé .1,5g

Glycineé ..7,2g

SDSé 0,25g

Eau distilléeé 250ml

Tampon d'échantillon :

Solution Cé ..500µl

Eau distillée é ...250µl

SDS 10%.....250µl

2-mercaptoéthanolé .50µl

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

Chauffer à 100°C pendant 4à5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

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

Solution de fixation

TCAé .24g

Eau distillée é 200ml

Solution de coloration

Bleu de coomassie R250é 1g

TCAé 8g

Méthanolé ..200ml

Eau distilléeé .200ml

Solution de décoloration

Acide acétique é 37,5ml

Eau distilléeé 312,5ml

Méthanolé 150ml

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium 0,1g

Eau distillée 1ml

Conduite de l'électrophorèse

Préparation du gel de séparation : T=17% et C=207%(pour une plaque)

Solution A 4,60ml

Solution S 2,51ml

Eau distillée 2,73ml

Dégazer pendant 2mn maximum

SDS 10%.....100µl

TEMED 13µl

Persulfate d'ammonium 10%.....60µl

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

Préparation du gel de concentration : T=4,8% et C=2,6% (pour une plaque)

Solution A 1,3ml

Solution C 2,5ml

Eau distillée 5,8ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à 10%.....100µl

TEMED 25 µl

Persulfate d'ammonium à 10%.....40 µl

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

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20mA (pour 2 gels 40mA+système de refroidissement), 250V

Fixation : 45 mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 nuit dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration.