

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES
AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE -MICROBIOLOGIE
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vu de l'obtention du

Diplôme de Master II Académique en Sciences Biologies

Option : Biochimie Appliquée

Thème :

***Evaluation Physico-chimique de
quelques produits alimentaires
commercialisés***

Présenté par :

M^{elle} REDJADJ Lehna

M^{elle} OUBELLIL Samia

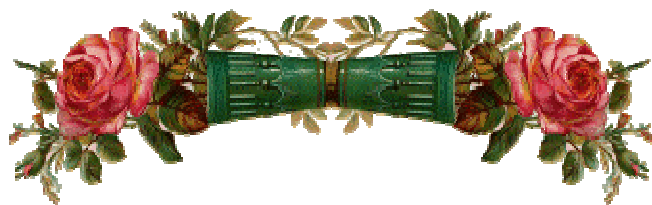
Encadré par M^{me} : SI AHMED Saliha

Devant le jury :

- Présidente : M^{me} SENOUSSE GHEZALI Chahra
- Promotrice : M^{me} SI AHMED ZENNIA Saliha
- Examineur 1 : M^{me} SENANI OULARBI Nassima
- Examineur 2 : M^r TITOUCHE Yacine

Maitre assistante classe A
Maitre assistante classe A
Maitre assistante classe A
Maitre assistant classe B

2013 2014



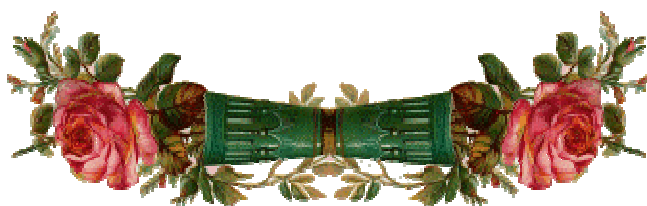
« *Remerciements* »

Avant tout, je remercie Dieu tout puissant de nous avoir donné la volonté, le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au laboratoire pédagogique de biochimie, Hassnaoua II de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Sous la direction du professeur MATI Abderrahmane directeur du laboratoire et responsable du master de Biochimie Appliquée. Nous tenons à lui adresser nos remerciements les plus sincères d'avoir mis à notre disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de la partie pratique de ce travail.

Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice M^{me} SI AHMED-ZENNIA Salîha pour avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir aidé et suivi le long de notre travail.

Enfin nous tenons à remercier les membres du jury qui nous feront l'honneur de juger notre travail.





«« Dédicaces »»

Je tiens en premier lieu à dédier ce travail à mon père Amar et ma mère Fatima qui m'ont toujours soutenue et encouragée durant toute ma scolarité.

- *A mes frère Mouloud, Saïd et Mohamed pour leur encouragement*
- *A mes cousins et cousines, Ahcen, Rafik, Souhila, Amel, Soraya et sa fille Nélya, à mes tantes et oncles*
- *A toute ma grande famille qui m'a soutenue*
- *A tous mes amies et amis*
- *A mes grand parents Mohamed, El Djohar et Tassadit*
- *En hommage et à la mémoire de mon grand père Boudjemia. M*

Et enfin, mes remerciements les plus sincères vont vers l'homme de ma vie Karim pour son soutien précieux le long de mes études et sans oublier toute sa famille.

SAMIA.O

«« Dédicaces »»

J'offre ce modeste travail :

- *A mes chères parents, que je respect et qui m'honorent, ma mère et mon père*
- *A mes grands panards que j'aime beaucoup*
- *A mes chers frères : Lahssen, Arab, Hossine, Azize, Farid et ma sœur Fatima,*
- *Mon marie qui m'encourage sauvant pour continuer mes études*
- *A ma nièce Sara, mes neveux Massi et Maxele*
- *A tout mes amis, Linda, Dyhia, Rosa, Salim, ils sont nombreux ils se reconnaîtront sûrement, et particulièrement Tighrine Abderrahmane pour son soutien durant la réalisation de ce travail. A tous ceux qui m'ont encouragé tout au long de mes Etudes.*

LEHNA.R





Table des matières

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures, tableaux et annexes

I. Synthèse des données bibliographiques

1. Introduction	01
2. Généralités sur les protéines.....	02
2.1. Structure des protéines	02
2.2. Les différents types de protéines	03
2.3. Propriétés des protéines.....	03
2.3.1. Propriétés physicochimiques des protéines.....	03
2.3.2. Propriétés techno-fonctionnelles des protéines	03
2.4. Rôle vital des protéines	04
3. Méthodes de dosage des protéines	05
3.1. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire.....	05
3.1.1. Principe.....	05
3.1.2. Les paramètres qui influent l'absorption.....	06
3.1.2.1. Effets du pH	06
3.1.2.2. Effets du solvant.....	06
3.2. Appareillage	07
3.3. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire appliquée pour l'analyse	
Quantitative	08
3.3.1. Dosage spectrophotométrique direct.....	08
3.3.1.1. Loi de Beer Lambert	08
3.3.1.2. Les conditions de validité de loi de Beer Lambert.....	09
3.3.1.3. Limites de validité de la loi de Beer Lambert	09
3.3.1.4. Loi Additivité des absorbances	09
3.3.2. Dosage spectrophotométrique indirect.....	09
3.3.2.1. Notion de la colorimétrie.....	09
3.3.2.2. La courbe étalon	10
4. Les critères de choix de la méthode de dosage	10
5. Les principes de base les plus utilisés pour le dosage des protéines.....	10
6. Exemples des méthodes spectrophotométrique de dosage des protéines.....	10
6.1. Dosage des protéines par la détermination de l'azote totale	10
6.1.1. Méthode de Kjeldahl	11
6.1.2. Méthode de Dumas par pyrolyse.....	12
6.1.3. La conversion du taux d'azote en taux de protéines	12
6.1.4. Avantages et inconvénients des méthodes de dosage des protéines par la	
détermination de l'azote	12
6.2. Dosage des protéines par absorption de rayonnements.....	13
6.2.1. Spectrophotométrie ultra-violet.....	13
6.2.2. Spectrofluorométrie.....	14
6.2.3. L'absorption à l'infra-rouge	15
6.2.4. Avantages et inconvénient de dosage des protéines par absorption de	

Rayonnement.....	15
6.3. Dosage des protéines par des méthodes immunologiques	16
6.3.1. Méthode de RIA (radio-immunologique)	16
6.3.2. Méthode ELISA (immuno-enzymatique).....	16
6.3.3 Avantages et inconvénients d'immuno-dosage des protéines.....	16
6.4. Méthode de biuret 1949 (liaisons peptidiques)	17
6.4.1. Avantages et inconvénients de la méthode biuret	17
6.5. Dosage des protéines par évaluation des radicaux fonctionnels	18
6.5.1. Méthode de Lowry (1951).....	18
6.5.2. Méthode BCA (avec l'acide bicinchonique).....	18
6.5.3. Dosage avec l'O-phthaldéhyde mercaptoéthanol.....	19
6.5.4. Avantages et inconvénients de dosage par l'évaluation des radicaux Fonctionnels	19
6.6. Dosage des fonctions amines libres	19
6.6.1. Méthode de Dye Binding Capacity (Fixation de colorant)	19
6.6.2. Méthode de Bradford (1976) (Fixations non covalentes de colorant)	20
6.6.3. Avantages et inconvénients de dosage des fonctions amines libres.....	20
7. Domaines d'applications des méthodes de dosages des protéines.....	21
7.1. Domaine Agro-alimentaire.....	21
7.1.1. Industrie laitières	21
7.1.2. Industries céréalière.....	21
7.1.3. Autres industries.....	21
7.2. Domaine médical.....	21
7.2.1. Contrôle au niveau des industries pharmaceutiques	21
7.2.2. Contrôle au niveau des laboratoires d'analyse médicale.....	22
7.3. Domaine de la recherche	23
8. Conclusion et perspective.....	23
II. Partie expérimentale	
1. Introduction	24
2. Matériels et méthodes.....	24
2.1. Matériel	24
2.1.1. Matière première	24
2.1.2. Appareillage	24
2.1.3. Autres matériels.....	25
2.1.4. Produits chimiques et réactifs	25
2.1.5. Verreries	25
2.2. Méthodes	25
2.2.1. Méthodes physicochimiques	25
2.2.1.1. Mesure de pH	25
2.2.1.2. Dosage de la vitamine C dans les jus	25
2.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse	26
2.2.1.3.1. Détermination d'indice d'acidité.....	26
2.2.1.3.2. Détermination d'indice d'iode.....	26
2.2.1.4. Dosage des glucides	27

2.2.1.5. Dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951)	27
2.2.2 Méthode d'identification	28
2.2.2.1. Hydrolyse acide des sucres suivis d'une CCM	28
2.2.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	28
2.2.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200	29
2.2.3. Méthode de caractérisation.....	29
2.2.3.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait (caséines lyophilisées du lait de Vache) par la papaïne	29
2.2.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	31
2.2.3.2.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native).....	32
2.2.3.2.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)	32
2.2.3.3. Révélation des bandes de migration après électrophorèse	33
3. Résultats et discussions	35
3.1. Détermination de quelques paramètres physicochimiques	35
3.1.1. Mesures de pH et teneur en Vitamine C	35
3.1.2. Indice d'acide	36
3.1.3. Indice d'iode.....	37
3.1.4. Teneur en glucides	38
3.1.5. Teneur en protéines	39
3.2. Séparation des sucres par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	41
3.3. Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200.....	42
3.4. Isolement et caractérisation électrophorétique des protéines sériques du lait de Vache et de Brebis (PAGE-native)	43
3.5. Isolement et caractérisation électrophorétique des caséines lyophilisées du lait de Vache (PAGE –SDS)	44
4. Conclusion.....	46

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABREVIATIONS

aa : acide aminé
AC/AG: anticorps/ antigène
BDC : Dye Binding Capacity
BSA: sérum albumin bovin.
CBB : colorant brillant du bleu G-250
CCM : chromatographie sur couche mince
CN : caséines
DCPIP : Dichloro-2,6 dichlorophénolindophenol
DLC : date limite de conservation
DNS : dinitrosalycyclique.
DO : densité optique
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay
F : fraction
FAO : organisation des nations unis pour l'alimentation et agriculture.
FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography
H : hydrolysate
HPLC: High Pressure Liquid Chromatography
Ia : indice d'acide
IAA : industrie agro-alimentaires.
Ii : indice d'iode
IR : infra-rouge
OM : orbitale moléculaire
OMS : organisation mondiale de santé
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH : potentiel d'hydrogène
PS : protéine du lactosérum.
PS : protéines sériques
RF : rétention frontale.
RIA : absorption radio-immunologique.
RX : rayon X.
SA : sérum albumine
SDS : dodécyl sulfat de sodium
SPIR: spectrophotométrie dans le proche infra-rouge
T%: % d'acrylamide et de bis acrylamide dans le volume V du tampon
TCA : acide trichloroacétique
TEMED : N-N-N-N tétraméthyle éthylène diamine
TRIS : tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
UV : ultra-violet.
VIS : visible
 α -La : alpha lactalbumine
 β -Lg : beta lactoglobuline

LISTES DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNAXES

LISTE DES FIGURES

N °DE FIGURE	INTITULE	PAGE
01	Structure des protéines (LAGACHERIE et RICARDEAU, 2005).	02
02	Schéma énergétique et d'excitation d'une molécule par un photon.	05
03	Représentation schématique des transitions σ , π , n, σ^* et π^* d'un groupement carbonyle.	06
04	Longueurs d'ondes d'absorption de tryptophane et tyrosine à pH =11.	06
05	Effets de la polarité du solvant : bathochromique pour les transitions π^* / π et effet hypsochromique pour les transitions n / π	07
06	Schéma représentatif d'un spectrophotomètre du type Monofaisceau.	07
07	Absorption de la lumière par un matériau homogène	08
08	Lois Additivité des absorbances	09
09	Unité de distillation de l'ammoniac (NH ₃).	11
10	Absorption des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane).	14
11	Structure chimique de la fluorone et rhodamine ; B et 6G	14
12	L'émission d'un signal chromogène par catalyse l'hydrolyse du para-nitrophénolphosphate (ROITT <i>et al.</i> , 1977).	16
13	Réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques(BOSSET et BLANC, 1973).	17
14	Les principaux mécanismes réactionnels de la méthode de LOWRY	18
15	Mécanisme réactionnelle de BCA avec le Cuivre.	18
16	Couplage fluorescent entre une amine primaire et la fuorosamine à pH=9 selon DELLOBET(1991).	19
17	Structure chimique de colorant brillant du bleu G-250 de Coomassie.	20
18	Photographie pour l'automate Multispec	22
19	Réaction de l'oxydation de la vitamine C.	26
20	La réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE <i>et al.</i> , 1978).	26
21	Principe d'absorption entre soluté et gel de silice.	28
22	Photographie de l'unité de chromatographie sur colonne de dimensions 30 x 1,6 cm(LABAB UMMTO).	29
23	Les étapes suivies de l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne.	30
24	Mécanisme de polymérisation du gel de polyarylamide	31
25	Dépôt des échantillons en électrophorèse	32
26	Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS)	33
27	Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.	34
28	Apparition de la couleur rose pale dans la solution d'acide ascorbique et les différentes dilutions à un volume donné du DCPIP.	35

29	Dosage des sucres par DNS et coloration de la gamme	38
30	Courbe étalon de dosage des glucides par la méthode utilisant l'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS), représentant les densités optiques en fonction des concentrations en glucide dans le jus Ramy. $DO=f$ (concentration en glucose).	38
31	Coloration de différentes solutions de la gamme étalon par le réactif Folin.	39
32	La courbe étalon représentant les densités optiques en fonction des teneurs en protéines dans lactosérum du lait de vache. $DO=f$ ([BSA]).	40
33	migration des sucres (fructose, glucose, galactose) et le de D(+) Cellobiose par chromatographie sur coche mince.	41
34	Chromatogramme des PS du lait de vache sur séphacryle S 200 ; F1 , F2, F3,F4 : les fractions éluées respectivement à :13, 19, 50, 52ml d'éluant.	42
35	Chromatogramme des PS lyophilisés du lait de brebit sur S200 ; F'1, F'2, F'3, F'4 : les fractions éluées respectivement à : 7, 35, 39, 47ml d'éluant.	42
36	Eléctrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T= 12 %, C=2,7 %.	44
37	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%).	45

LISTE DES TABLEAUX

N° DU TABLEAU	TITRE DU TABLEAU	PAGE
I	Les deux groupes principaux de protéines LOUISOT (1983).	03
II	Les principales propriétés physicochimiques des protéines.	03
III	Application fonctionnelle des protéines laitières.	04
IV	Propriétés fonctionnelle des protéines d'origine végétales.	04
V	Facteurs de conversion de l'azote en protéines (dans les produits alimentaires).	12
VI	Automatisation des méthodes de dosage de l'azote protéique.	12
VII	mesure de pH et la teneur en vitamine C de différents jus : frais et commercialisés.	36
VIII	Comparaison entre les différentes matières grasses : d'origines animales et végétales.	37
IX	Concentration en glucides des les différents jus (g/l)	39
X	Concentration en protéine totale des échantillons ; selon la méthode de LOWRY.	40
XI	Les distances parcourues par les différents monosaccharides par CCM.	41

LISTE DES ANNEXES

N ° D'ANNEXE	INTITULE
01	Dosage de la vitamine C dans le jus de citron.
02	Détermination de l'indice d'acidité
03	Détermination de l'indice d'iode
04	Dosage des glucides
05	Dosage des protéines sériques par la méthode de Lowry
06	Chromatographie sur couche mince.
07	Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200
08	Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines lyophilisées)
09	Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)
10	Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-native et PAGE-SDS)
11	Révélation des bandes de migration après électrophorèse : (SDS et native).

Synthèse bibliographique

Thème :



***Les différentes techniques
spectrophotométriques de
dosage des protéines***

I. Synthèse des données bibliographiques

1. Introduction

Les protéines sont de valeur nutritive indispensable pour les humains et les animaux. Sont présentes dans les produits d'origines végétales, animales et les organismes unicellulaires. Elles présentent non seulement les constituants fondamentaux des organismes vivants, mis aussi jouent un rôle moteur dans leur fonctionnement et même dans la protection.

Les structures biochimiques et les compositions en acides aminés des protéines diffèrent, ce qui leur confère des propriétés fonctionnelles et nutritionnelles spécifiques. Cette diversité de composition, de structure et de propriétés associées, explique le large éventail d'applications des sources protéiques. En outre le développement des techniques d'extraction met à disposition des filières alimentaires et médicales, un nombre croissant d'ingrédients protéiques d'origine animale, végétale et microbienne. Certaines protéines sont utilisées dans la formulation des aliments, pourrait conduire à des modifications qualitatives et quantitatives très intéressantes et d'autres sont utilisées comme des molécules thérapeutiques.

Cette importance, met en valeur la nécessité d'analyses quantitatives des protéines qui se retrouvent soit dans des produits à l'état brute ou transformé, dans le but de contrôler la qualité des matières premières et l'influence des traitements technologiques sur les propriétés et la qualité nutritionnelle des protéines.

Les méthodes de dosage de ces composantes sont nombreuses et procèdent à des stratégies variables, présentent chacune des caractéristiques différentes. En vue de choisir la méthode la plus indiquée pour telle situation ou tel type d'échantillon et cibler ainsi l'objectif de son utilisation, il est nécessaire de comparer leurs performance en considérant un certains nombre de critères d'évaluation : sensibilité, rapidité, simplicité, coût....etc.

Les techniques utilisant l'absorption de l'énergie pour le control et l'analyse des protéines alimentaires et autres ; nont cessé d'évoluer. Les comparateurs visuels de couleurs ont été remplacés par des colorimètres photoélectriques puis par des spectromètres toujours plus performants. Les champs d'applications possibles sont nombreux, aussi bien pour le contrôle de produits divers au niveau des industries agro-alimentaires, pharmaceutiques sans oublier le domaine de la recherche.

Le but principal de cette recherche bibliographique, c'est de faire le point de connaissances sur l'ensemble des méthodes les plus utilisées, pour donner l'estimation la plus proche possible de la teneur en protéines de divers produit biologiques, en parallèle discuter les contraintes et les avantages de chaque méthode.

2. Généralités sur les protéines

Les protéines sont des macromolécules formées par succession d'une chaîne de plusieurs acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques, qui peuvent se représenter sous forme de plusieurs conformations pour donner la forme appropriée pour chaque type de protéine.

2.1. Structure des protéines

Il existe quatre types de structure protéique, primaire, secondaire, tertiaire, et quaternaire (YON, 1969) :

-la structure primaire est composée d'un enchainement d'acides aminés liés les uns aux autres par des liaisons covalentes et éventuellement par des ponts disulfures (CHAKROUN, 2004).

-la structure secondaire d'une protéine décrit la présence de régions repliées de la chaîne polypeptidique. Les deux types de structure secondaire les plus communs sont le feuillet plissé β et l'hélice α (l'état hélicoïdal) (BRANDEN et TOOZE, 1996).

-la structure tertiaire d'une protéine représente l'arrangement tridimensionnel de tous les acides aminés situés dans la chaîne polypeptidique. Cette structure est maintenue par de multiples liaisons non covalentes. (KOOLMAN et ROHM, 1997).

-la structure quaternaire est le niveau le plus élevé d'organisation des protéines (NAVIZET, 2004). C'est l'arrangement spatial des différentes sous-unités polypeptidiques et la nature des interactions existant entre elles (STRYER, 1988) (Figure 01).

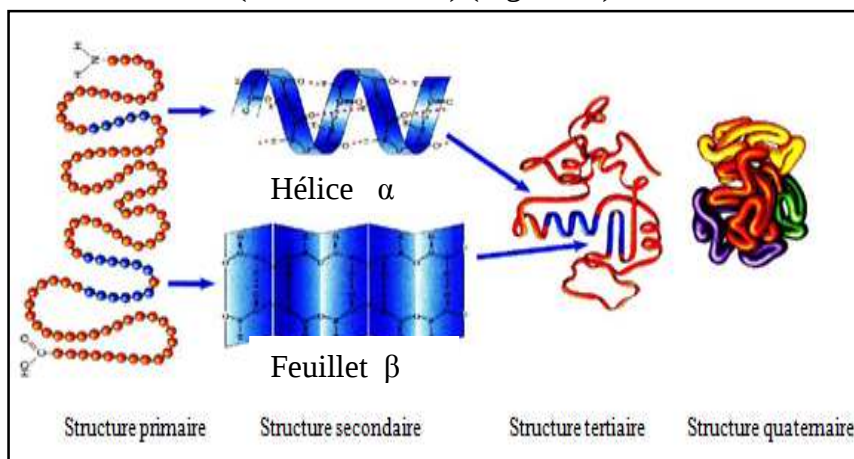


Figure 01: Structure des protéines (LAGACHERIE et RICARDEAU 2005).

2.2. Les différents types de protéines

D'après LOUISOT (1983) on peut classer les protéines en deux groupes : protéines simples et protéines conjuguées (tableau I).

Tableau I : Les deux groupes principaux de protéines (LOUISOT, 1983).

Holoprotéines (simples)	Hétéroprotéines (conjuguées)
Protamines	Phosphoprotéines
Histones	Glycoprotéines
Albumines	Chromoprotéines
Globulines	Lipoprotéines
prolamines	nucléoprotéines
Glutélines et les scléroprotéines	

2.3. Propriétés des protéines

2.3.1. Propriétés physico-chimiques des protéines

Les protéines sont solubles à faible concentration saline ou faible force ionique « salting in ». Par contre, elles sont en général, insolubles dans ces mêmes solutions salines concentrées « salting out » (GRYSON *et al.*, 2008). La température augmente la solubilité des protéines en deçà de la température de dénaturation. Les protéines possèdent des propriétés des chaînes latérales porteuses de groupements fonctionnels comme le groupement phénol (Tyr) : utilisation pour la caractérisation et le dosage par des réactions colorées, en plus de ces propriétés. Les protéines possèdent d'autres propriétés électriques, physiques et chimiques (tableau II) (LORIENT *et al.*, 1991).

Tableau II : les principales propriétés des protéines (LORIENT *et al.*, 1991)

Propriétés des protéines		
Propriétés physiques	Propriétés chimiques	Autres propriétés
Isomérisation optique (isomère D et L)	Action d'exopeptidase et d'endopeptidase	Mobilité électrophorétique
sédimentation	Ionisation des acides aminés	Solubilité
viscosité	Hydrolyse par des enzymes	Amphotère et amphipolaire

2.3.2. Propriétés techno-fonctionnelles des protéines

Les protéines alimentaires possèdent des propriétés techno-fonctionnelles de grande valeur : solubilité, viscosité, hydratation, gélification, propriétés moussantes, propriétés émulsifiantes ...etc. (LORIENT *et al.*, 1991). À cet effet, beaucoup de protéines d'origine animale et végétale sont exploitées par les industries agro-alimentaires, afin de répondre aux besoins du consommateur qui est devenu de plus en plus exigeant. À titre d'exemple d'utilisation des protéines d'origine animale : les protéines laitières dont les domaines d'utilisation sont récapitulés dans le tableau III.

Tableau III : Application fonctionnelle des protéines laitières (BALAGE *et al.*, 2007).

Protéines	Caséines	Caséinate	Protéines sériques
Exemples d'applications	Produits céréaliers Boulangerie Farine Lacto-remplaceurs Industrie pizza	Crèmes glacées et dessert Produits de boulangerie Charcuterie	Confiseries et viennoiseries Biscuit Sauces Soupes

Les protéines végétale alimentaires proviennent majoritairement des graines et sont présentes en quantité importante dans les produits céréaliers, les produits issus du soja et les produits à base de légumineuses (BALAGE *et al.*, 2007). La solubilité est la différence majeure entre ces protéines. En fonction du traitement, des sites hydrophobes ou hydrophiles sur la protéine peuvent être démasqués, d'où des possibilités d'interactions avec l'eau, les lipides, l'air, etc (tableau IV).

Tableau IV: Propriétés fonctionnelles des protéines d'origine végétales (BALAGE *et al.*, 2007).

Interactions	Propriétés	Applications
Protéine /eau	Hydratation gonflement Solubilité viscosité	Boissons
Protéine /protéine	Pouvoir épaississant Pouvoir gélifiant Aptitude à former une pâte	Sauces Desserts gélifiés Produits de cuisson
Protéine /lipide	Rétention des graisses	Produits carnés
Eau/protéine/huile	Propriétés émulsifiantes	Emulsions/sauces
Eau/protéine/air	Propriétés moussantes	Mousses/Desserts /Pâtisserie

2.4. Rôle vital des protéines

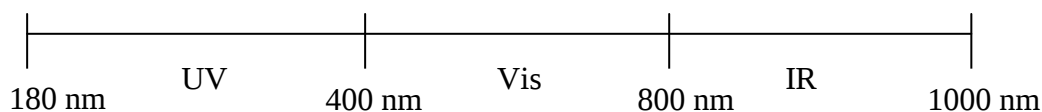
La dégradation des protéines alimentaires par les enzymes digestives, fournit les acides aminés indispensables, leur apport et leur métabolisme sont liés à l'azote. Les protéines constituent plus de la moitié en poids sec du corps humain, elles participent à la constitution plastique des cellules et des tissus de plus elles représentent la majorité des molécules possédant une activité biologique. Parmi celle-ci : les enzymes, les éléments de défense de l'organisme et les hormones qui assurent la régulation du métabolisme. Comme les glucides ; les protides se transforment en composés énergétiques par néoglucogénèse après leur hydrolyse.

3. Les méthodes de dosage des protéines

De nombreuses techniques instrumentales utilisées pour déterminer la concentration de plusieurs espèces organiques (acides aminés et protéines) et inorganiques (métaux...) ; les méthodes spectrophotométriques et plus particulièrement pour le cas des protéines, la spectrophotométrie d'absorption moléculaires.

3.1. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire

Cette méthode est basée sur la mesure de l'intensité d'absorption ou d'émission d'un rayonnement électromagnétique (SKOOG *et al.*, 1997) par les espèces à doser (atomes, molécules, ions) (LINDEN, 1991). Les rayonnements les plus souvent utilisés sont l'ultraviolet (UV), la lumière visible et l'infrarouge (IR) dont les longueurs d'ondes suivantes (GRAVRILOVIE *et al.*, 1996) :



Le domaine le plus propice pour mesurer l'absorption des protéines se situe au dessus de 230 nm (STRONG *et al.*, 1997). A cette longueur d'onde les acides aminés qui possèdent des noyaux aromatiques (phénylalanine, tyrosine et tryptophane) présentent une contribution notable (PIERRE, 2003).

3.1.1. Principe

Lorsqu'un photon (son énergie est donnée par $E = h \nu$) passe au voisinage d'une particule élémentaire (atome, ion ou molécule) cette dernière passe de son état dont le niveau énergétique le plus bas est l'état fondamental à un état d'énergie plus élevée dit ; un état excité (figure 02).

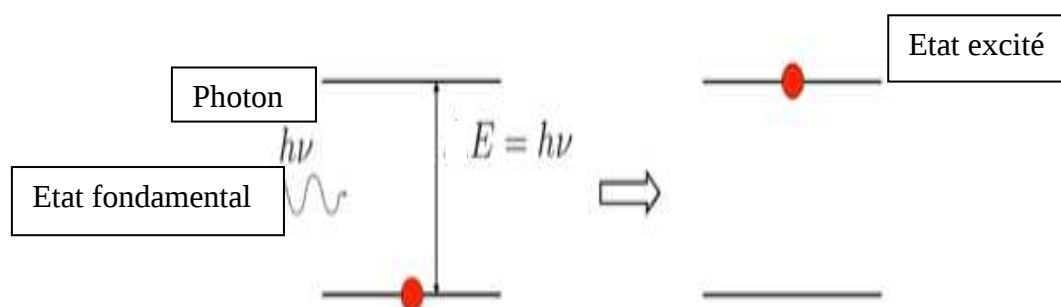


Figure 02 : Schéma énergétique et d'excitation d'une molécule par un photon (ROUESSAC, 1992).

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores ($C=C$, $C=O$, $C=N$, $C=C$, $C=N...$). Cette absorption se traduit par des transitions d'électrons engagés dans les orbitales moléculaires situées à la frontière, entre les derniers niveaux occupés de l'état fondamental et les premiers niveaux non occupés des états excités, chaque transition est caractérisée à la fois par sa longueur d'onde (λ) et par son coefficient d'absorption molaire (ϵ). Parmi les principales transitions électroniques on trouve :

- les transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ont lieu pour des longueurs d'onde très courtes entre 125 et 160 nm ;
- les transitions $n \rightarrow \sigma^*$ ont lieu pour des longueurs d'onde entre 170 et 260 nm ;
- les transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$ ont lieu pour des longueurs d'onde voisines se situant entre 165 et 700 nm.

Par exemple dans le cas d'un groupe carbonyle (C=O) particulièrement abondant dans la structure des protéines, il existe trois types d'orbitales : σ , π , n et leurs transitions possibles (figure 03).

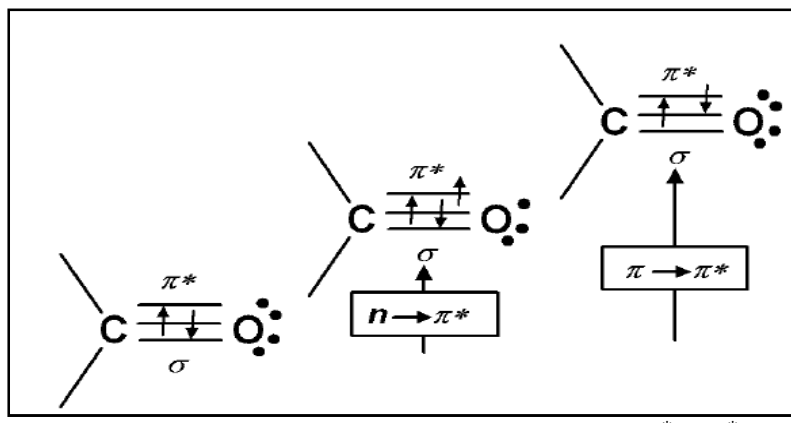


Figure 03 : Représentation schématique des transitions σ , π , n , σ et π d'un groupement carbonyle (ROUESSAC, 1992).

3.1.2. Les paramètres qui influent l'absorption

Les paramètres qui peuvent agir sur le spectre d'absorption d'une substance comprennent la nature du solvant (figure 04), la température, la concentration en électrolytes et la présence des substances interférentes (les substances qui absorbent dans les même régions que la longueur d'onde choisie) (STRONG *et al.*, 1997).

3.1.2.1. Effets du pH

Le pH modifie l'état d'ionisation des acides aminés et notamment la charge globale de la protéine, ce qui influe sur la solubilité et les longueurs d'onde de leurs d'absorption (LARTUNDO, 2007). À pH du milieu égal au pH isoélectrique les protéines sont précipitées dans la solution, donc elles ne sont pas accessibles à l'absorption.

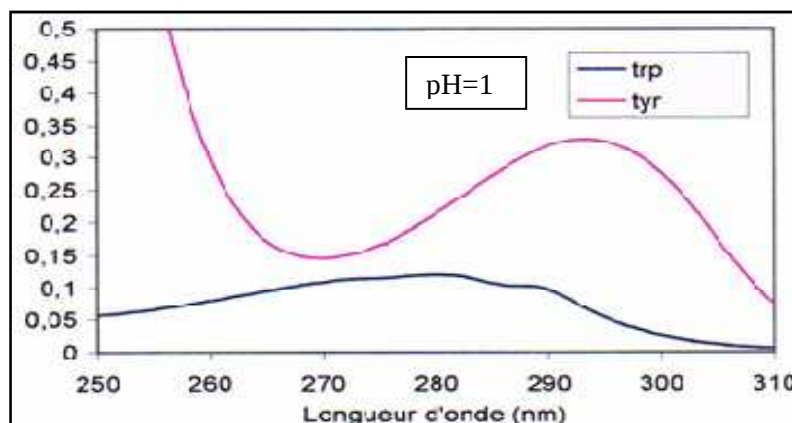


Figure 04 : Longueurs d'ondes absorption de tryptophane et tyrosine à pH=11 (LARTUNDO, 2007).

3.1.2.2 Effets du solvant

L'augmentation de la polarité du solvant s'accompagne, en général, d'un effet bathochromique (déplacement vers des longueurs d'ondes plus élevée) pour les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ et d'un effet hypsochromique (déplacement vers des longueurs d'ondes plus faibles) pour les transitions $n \rightarrow \pi^*$ (Figure 05).

Les effets de ces paramètres doivent être connus et les conditions de l'analyse choisies pour que l'absorbance ne soit pas affectée par de petites variations incontrôlée.

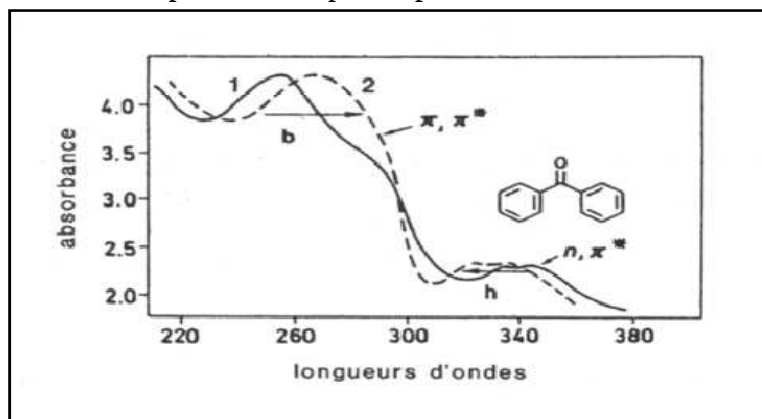


Figure 05 : Effets de la polarité du solvant ; bathochromique pour les transitions π/π^* et effet hypsochromique pour les transitions n/π^*

Si le coefficient d'absorption ϵ ne dépend pas du solvant, on constate expérimentalement des variations dues aux modifications des forces intermoléculaires. De même, des concentrations importantes de sels incolores peuvent modifier les relations entre la densité optique et la concentration en protéine (AUDIGIE *et al.*, 1995).

3.2. Appareillage

Le spectrophotomètre est un appareil qui mesure l'absorbance d'une solution à une longueur d'onde donnée. Un dispositif monochromateur permet de générer à partir d'une source de lumière visible ou ultraviolette une lumière monochromatique (KICHEWASSAMY, 1968). La longueur d'onde est choisie par l'utilisateur. Cette lumière traverse alors une solution colorée. Un photodétecteur convertit l'intensité lumineuse transmise en un signal électrique. Enfin un analyseur traite le signal électrique et affiche la valeur de l'absorbance (PRADYT, 2004).

Il existe également deux types de spectrophotomètre : le Monofaisceau (figure 06) et le double faisceau, le deuxième est plus performant que le premier (CASTEX *et al.*, 1967). La lecture dans le cas du double faisceau représente le rapport de l'échantillon et le faisceau de référence, ceci permet de gagner une meilleure stabilité du signal (BROKAERT, 2005).

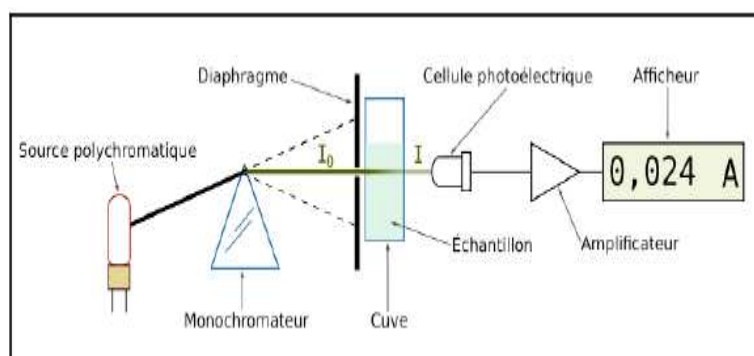


Figure 06: Schéma représentatif d'un spectrophotomètre du type Monofaisceau (PRADYT, 2004).

3.3. La spectrophotométrie d'absorption moléculaire appliquée pour l'analyse quantitative

3.3.1. Dosage spectrophotométriques direct

3.3.1.1. Loi de Beer Lambert

Le principe de l'utilisation de la spectrophotométrie pour l'analyse quantitative directe est basée sur le fait qu'une lumière monochromatique traverse une solution absorbante de concentration C contenue dans une cuve d'épaisseur l cm. Une partie de ce rayonnement sera absorbée par l'échantillon et une partie sera transmise, cela est déterminé par la relation suivante : $I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon l c}$ (figure 07).

Soit I_0 l'intensité de la lumière incidente absorbée et I l'intensité de la lumière transmise, le rapport I_0/I , proportion de lumière incidente que laisse passer une épaisseur l du milieu est appelé transmittance T (AUDIGIE *et al.*, 1995). Son inverse I_0/I , est l'opacité (O). L'absorbance A du milieu est donnée par la relation suivante (:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = -\log_{10}(T) \dots \dots \dots (01)$$

L'absorbance donc est proportionnelle à la concentration de la substance à dosée, qui est donnée par la relation suivante :

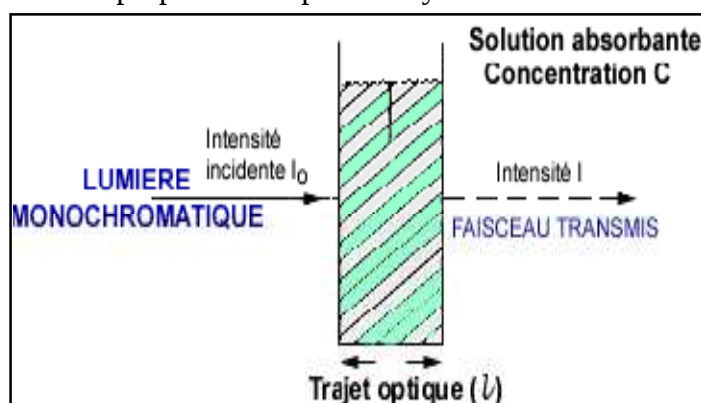
$$A = \epsilon l c \dots \dots \dots (02)$$

A : désigne l'absorbance, paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre ;

L : est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée ;

C : la concentration molaire ;

ϵ : coefficient d'absorbance propre au composé analysé.



Figure(07) : Absorption de la lumière par un matériau homogène (AUDIGIE *et al.*, 1995).

3.3.1.2. Les conditions de validité de loi de Beer Lambert

La loi de Beer Lambert est une loi qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- la lumière utilisée doit être monochromatique ;
- les concentrations doivent être faibles ;
- la solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;

Le soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

3.3.1.3. Limites de validité de la loi de Beer Lambert

Pour vérifier la loi de Beer Lambert, il faut pas s'attendre toujours que la densité optique soit proportionnelle à la concentration, cela pour deux ordres de raison différents :

-la couleur des corps peut se modifier avec la concentration par dissociation électrolytique, polymérisation, changement de l'équilibre entre formes moléculaires différentes (ex la bilirubine).

-la relation $D = \epsilon l c$ n'est valable que pour une radiation monochromatique. En dehors de ce cas, l'absorbant donne un effet de filtre et modifie la lumière incidente ; de sorte que ϵ devient de plus en plus faible lorsque L ou C augmentent. Cet effet dépend de la couleur et de l'intensité de la coloration de la substance qui absorbe, de la nature de la source, de la sélectivité du filtre coloré.

3.3.1.4. Loi d'additivité des absorbances

Les absorbances ont la propriété d'être additives (figure 08). Lorsqu'un faisceau traverse une seule solution ou bien deux solutions successivement, contenant deux substances qui absorbent à la même longueur d'onde, l'absorbance est la somme des absorbances de chaque composant du mélange pour cette longueur d'onde (AUDIGIE *et al.*, 1995).

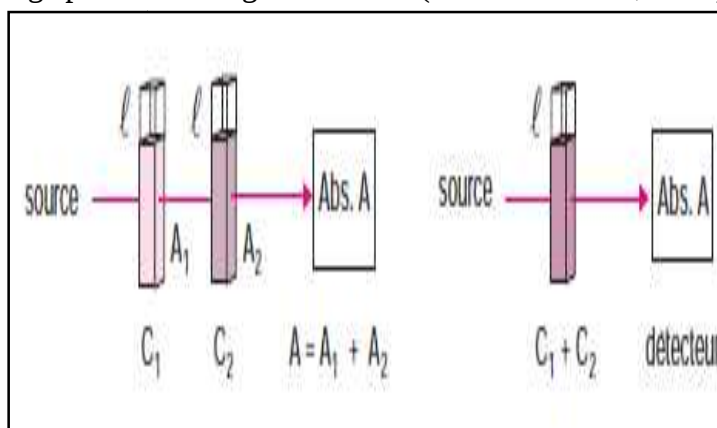


Figure 08 : Lois d'additivité des absorbances (NICOLAS *et al.*, 1999).

3.3.2. Dosage spectrophotométriques indirect

3.3.2.1. Notion de la colorimétrie

Les mesures colorimétriques ont pour principe de comparer, dans des conditions bien déterminés, la couleur d'une substance qui est en quantité inconnue à doser, avec les mêmes couleurs de la même substance en quantité connue (MENDHAM *et al.*, 2006). Avec un spectrophotomètre, il n'est pas crucial de préparer toute une série d'étalons ; le coefficient d'absorption molaire peut être calculé à partir d'une seule mesure d'absorbance ou de transmittance pour une solution étalon, et l'on peut déduire directement la concentration inconnue à partir de la valeur mesurée de l'absorbance et de coefficient molaire par l'équation(03) :

$$Cx = \frac{\log I/I_t}{l} \dots \dots \dots (03)$$

3.3.2.2. La courbe étalon

Pour construire une courbe étalon, il faut mesurer les spectres d'un jeu d'au moins trois solutions d'analyte standards. Les concentrations de la solution standard doivent encadrer la gamme de concentration attendue des échantillons pour l'analyse. Dans l'idéal, toutes les valeurs standards mesurées devraient se trouver sur une ligne droite, mais dans la pratique les

valeurs sont toujours un peu éparpillées (OWEN, 2000). La protéine étalon la plus utilisée au cours des analyses quantitatives spectrophotométriques des protéines, est l'albumine sérique bovine commerciale (BSA).

4. Les critères de choix de la méthode de dosage

Le choix de la méthode de dosage dépend infiniment de la façon dont nous choisissons de définir la protéine et les échantillons qui sont à notre disposition (GILLESPIE *et al.*, 2011).

D'après MULTON (1991), le choix de la méthode dépend :

- de la nature du produit ; d'origine végétale ou animale, solide ou liquide ;
- de la solubilité et la résistance aux traitements thermiques ;
- de la liaison des protéines avec des composés lipidiques, glucidiques ou métaux ;
- du nombre d'échantillon ;
- de la concentration de l'échantillon en protéine.

Plus nous avons une idée sur la structure et la composition de la protéine à doser et la forme dans laquelle se trouvent dans le milieu, plus il sera facile de choisir la méthode la plus adéquate.

5. Les principes de base les plus utilisés pour le dosage des protéines

Les principes de base peuvent être regroupés selon les différents moyens envisagés pour estimer quantitativement la teneur en protéines présentes dans un échantillon d'un produit alimentaire ou autre à savoir :

- l'évaluation d'un élément caractéristique (cas de l'azote) ;
- la mise en évidence de liaisons particulières ;
- l'utilisation des radicaux fonctionnels ;
- l'exploitation des propriétés absorbante des protéines ;
- l'utilisation des réactions immunologiques spécifiques.

6. Exemples des méthodes spectrophotométrique de dosage des protéines

6.1. Dosage des protéines par la détermination de l'azote totale

Généralement l'azote est mesuré par les méthodes de Kjeldahl ou Dumas ou par l'une des formes modifiées de ces méthodes (micro- Kjeldahl et macro- Kjeldahl). Les protéines sont d'habitude calculées à partir de la teneur en azote total multipliée par un facteur de conversion. Les facteurs sont spécifiques de chaque type d'aliments et sont été établis en fonction de la nature et la composition des protéines contenues dans la matrice. Parmi ces méthodes de dosage on trouve :

6.1.1. Méthode de Kjeldahl

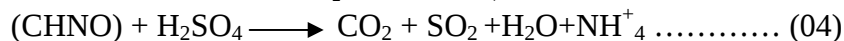
La méthode de Kjeldahl a été présentée en 1883 lors d'une réunion de la société chimique danoise par JOHAN KJELDAHL, en tant que moyens de déterminer l'azote en orge et levure. Aujourd'hui cette méthode est reconnue comme méthode de référence.

Elle consiste à effectuer une minéralisation complète des molécules organiques ; le carbone, l'oxygène et l'hydrogène en gaz carbonique et la transformation de l'azote présent en ammoniacque, qui peut être dosé par différentes méthodes.

6.1.1.1 La minéralisation

Consiste à la digestion de l'azote organique en azote minéral sous forme ammoniacal $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (équation 01) sous l'action d'oxydation par l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique des catalyseurs, qui sont utilisés dans le but d'accélérer les réactions par augmentation de la température d'ébullition jusqu'à 450°C (DUMAS et GRAPIN, 1989).

Le catalyseur le plus employé au cours du processus de minéralisation est Cu SO_4 . Il existe d'autres catalyseurs qui sont plus efficaces comme HgO , mais ils se caractérisent par une précipitation du mercure avant l'étape suivante (REXROAD et CATHEY, 1976).



La minéralisation par l'acide chromique a été proposée, il est assez rapide et moins coûteux en réactifs, sont inconvénient apparait dans les résultats aléatoires qu'il donne (SWAMINATHIN et SUD ,1976)

6.1.1.2. Mesure de l'azote ammoniacal

D'après GUILLOU *et al* (1976) ; trois techniques permettent de doser l'ammoniaque. Elles nécessitent la constitution d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des solutions de concentration connue en sulfate d'ammonium :

-Par titrage après distillation

L'ammoniaque est titrée par un acide (HCl , H_2SO_4) après entraînement à la vapeur (figure 09) piégeage dans une solution d'acide para-hydroxybenzoïque ou d'acide borique (URBAN, 1971). Selon la quantité d'ions d'ammonium des concentrations en acide borique dans la gamme de 0,01 N à 0,5 N sont employés (LIN et RANDOLPH, 1978).



Figure 09: Unité de distillation de l'ammoniac (NH_3) (URBAN, 1971).

-Par potentiométrie

L'introduction dans la solution d'une électrode spécifique de l'ammoniaque permet une mesure directe. Une fois l'équilibre atteint entre l'ammoniac de solution à analyser et les ions d'ammoniums de la solution interne de l'électrode (équation). La différence des potentiels d'électrodes entre la solution étudiée et une solution étalon permet, à l'aide d'un facteur adéquat, de déterminer la quantité d'azote (DESCHREIDER et MEAUX, 1973)



-Par colorimétrie

Un certain nombre de réactions colorimétriques permettent de doser l'ammoniaque. Parmi les réactifs utilisés nous avons : Hg I_4 , (réactif de Nessler), la ninhydrine, le phénol hypochlorite (réaction de Berthelot) (BEECHER et HITTEN, 1970), le salicylate dichloroisocyanurate (BIETZ, 1974).

6.1.2. Méthode de Dumas (par pyrolyse)

La méthode de DUMAS à été introduite par Jans-Baptiste Dumas en 1931. le dosage des protéines par cette méthode est basée sur une calcination de l'échantillon en présence d'oxyde de cuivre .le Carbone et l'hydrogène sont oxydés sous forme de CO_2 et H_2O et piégés. On

mesure alors le volume d'azote dégagé, d'où l'on déduit sa teneur sous forme d'azote gazeux (N₂), qui peut être évalué par différentes méthodes (volumétrie, potentiométrie, luminescence) (SWEENEY et REXOARD, 1987 ; JONES 1991).

6.1.3. La conversion du taux d'azote en taux de protéines

Des contraintes ont été retrouvées dans des cas particuliers, exemple des protéines d'origine végétale qui contient plus d'azote que celles d'origine animale, par conséquent nécessitent un facteur plus bas (STEVENS, 1992).

JONES, MUSEY et WALKER (1970) ont mesuré le contenu en azote d'un grand nombre de protéines isolées et ont proposé des séries de facteurs spécifiques pour différentes catégories d'aliments. Ces facteurs ont été largement adoptés et sont utilisés dans le rapport FAO/OMS (1973) sur les besoins en protéines, qui sont énumérés dans le tableau V.

Tableau V : Facteurs de conversion de l'azote en protéines (en produits alimentaires) (FAO/OMS, 1973).

Produit d'origine animale		Produit d'origine végétale	
Denrées alimentaires	Facteurs	Denrées alimentaires	Facteurs
Viandes et poissons	6.25	Blé	5.83
Gélatine	5.55	Riz et farine de riz	5.83
Laits et produits laitiers	6.38	Siegle et farine de siegle	6.31
Laits maternel	6.37	Orge et farine d'orge	6.51
Œuf	6.25	Avoine	6.25

6.1.4. Avantages et inconvénients de dosage des protéines par la détermination de l'azote

Aujourd'hui ces méthodes sont devenues faciles, simples et plus exacte grâce aux systèmes automatisés qui ont été mis en pratique depuis 1961(tableau VI).

Tableau VI: Automatisation des méthodes de dosage de l'azote protéique (GODEN et LOISEL, 1994).

Méthode	Appareil	Propriété
Kjeldahl	Kjelfoss de foss électric	-duré de 12 min -20 échantillons -bonne précision
	Kjeltec de Tecator	-120 analyses /jrs -performance élevé
Dumas	Carlo Ebra NA 1500	-duré de 3min -bonne sensibilité -bonne précision
	LECO FP-428 et LECO CHN 600	-duré de 3à7 min - bonne sensibilité -bonne précision

Il existe des versions entièrement automatiques pour ces méthodes qui sont imposées pour le dosage en flux continu de l'azote (KRAMÉ *et al*, 1973 ; BIETZ, 1974).

Divers appareils sont proposés sur le marché. Au début, ces méthodes ont été utilisées pour le dosage de microquantités de produits, mais les constructeurs ont maintenant mis au point des appareils permettant l'analyse sur des quantités de produit de l'ordre du gramme (MULTON, 1991).

L'inconvénient majeur des méthodes basées sur la détermination de l'azote totale c'est qu'elles ne permettent pas de distinguer l'azote non protéique de l'azote protéique en revanche ; l'hétérogénéité substantielle d'un échantillon à un autre qui dépend de plusieurs facteurs (espèce, maturation...) (OFTEDDAL *et al.*, 2014), ne rend pas compte de la valeur réelle en protéines de l'échantillon analysé.

Teneur moyenne en azote des protéines purifiées d'origine animale ou végétal est par convention estimée à 16%, celle des cellules bactériennes 14%. Ces approximations entraînent des erreurs souvent non négligeables en fonction de la teneur en azote non protéique de l'échantillon (GAVRILOVIE *et al.*, 1996). Par conséquent, le nutritionniste ou le biochimiste peut aller loin dans leurs analyses par l'élimination de l'azote non protéique considéré comme contaminant. Mais les méthodes d'éliminations tel que la coagulation, la précipitation des protéines, la dialyse et la filtration sont en général peu compatibles avec le dosage de routine ; et de plus elles réalisent des séparations arbitraires, de sorte qu'il faut en rechercher les conditions pour chaque produit (MULTON, 1991).

6.2. Dosage des protéines par absorption de rayonnements

6.2.1. Spectrophotométrie ultra-violet

La spectrophotométrie UV est également très utile pour le dosage des protéines. Les protéines absorbent la lumière dans la gamme UV. Les acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane donnent aux protéines la capacité d'absorber dans l'ultraviolet à 280 nm, qui est généralement utilisée pour estimer la concentration en protéines. La phénylalanine et les ponts disulfures contribuent également à l'absorption à cette longueur d'ondes (GAVRILOVIE *et al.*, 1996) (figure 10).

Les protéines possèdent d'autres propriétés absorbantes dans l'UV tels que :

- la présence des liaisons peptidiques qui absorbent à 190 nm ;
- la plus part des acides aminés qui absorbent entre 180 et 220 nm ;
- la cystine qui absorbe à 240 nm ;
- les ponts disulfures qui absorbent à 250 nm.

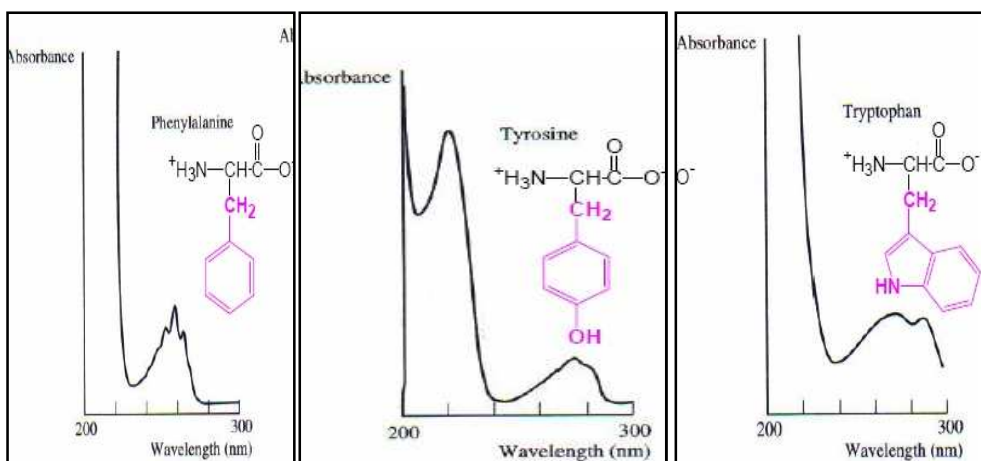


Figure 10: Absorption des l'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) (GAVRILOVIE *et al.*, 1996).

6.2.2. Spectrofluorométrie

Le dosage des protéines par la spectrofluorométrie est réalisé par la mise en œuvre des réactions chimiques par la formation des complexes entre les ions ou les molécules fluorescentes et la molécule à doser.

Les protéines réémettent à 340 nm la lumière qu'elles absorbent à 275nm et la fluorescence ainsi apparue peut être utilisée pour le dosage des protéines.

Des marqueurs fluorescents greffés de façon covalente sur la protéine afin d'effectuer son dosage (KRESS *et al.*, 2003). Des marqueurs sont développés depuis plusieurs décennies pour différents types d'applications biologiques telles que l'imagerie, l'histologie ou la cryométrie. Parmi les familles de molécule utilisées, celle des rhodamines, dont la structure de base est la Fluorone (Figure 11). Elle est, de plus, moins sensible aux variations de pH que les dérivés de la fluoescéine (BRANDTZAEG 1975; MCKAY *et al.*, 1981).

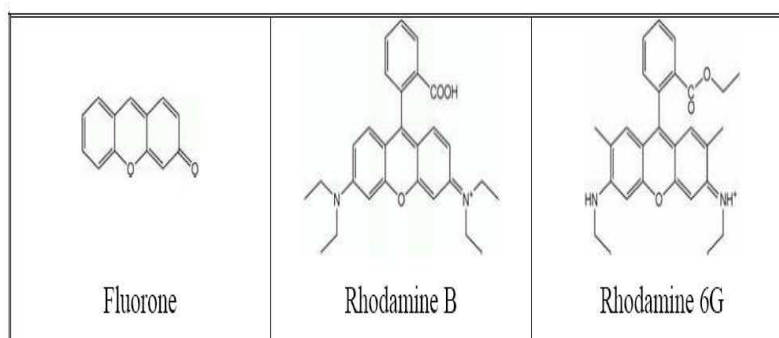


Figure 11 : Structure chimique de la fluorone et rhodamine (KRESS *et al.*, 2003).

6.2.3. Spectrophotométrie infrarouge

Le rayonnement infra-rouge produit de la chaleur. Quand un échantillon est chauffé, de l'agitation moléculaire sera produite: les atomes constituant les molécules vibrent autour de leurs liaisons. Comme dans les autres spectroscopies, les niveaux d'énergie sont quantifiés, les liaisons ne peuvent pas vibrer à n'importe quelle fréquence.

Le dosage des protéines est également une application majeure de la SPIR. Les protéines présentent de nombreuses bandes d'absorption, une des plus caractéristiques se situe à 2180 nm (combinaison amide 1 et amide 2). Dans de nombreux domaines, la précision obtenue est exilante. L'erreur résiduelle est de l'ordre de 0,25 % de la matière sèche

dans le cas des farines de blé .Ce chiffre est tirés voisin de l'erreur associé aux essais de reproductibilité de la méthode de Kjeldahl (LINDEN, 1991).

6.2.4. Avantages et inconvénient de dosage des protéines par absorption de rayonnement

Les méthodes spectrophotométriques dans l'UV et l'IR, sont des méthodes très intéressantes car elles sont rapides, simples et performantes. Elles demandent moins de manipulation que les méthodes chimiques, mais exigent un matériel couteux et très spécialisé.

L'avantage de la quantification des protéines par les méthodes physiques ; c'est que l'échantillon peut être récupéré et il est relativement quantitatif si un coefficient précis d'extinction est connu (LEACH et SCHERAGA, 1980). De plus il n'est pas affectée par la diffusion de la lumière ce qui permet de l'utiliser directement sur des suspensions sans filtration ni centrifugation (NAKAMURA et PISANO, 1976), donc coût de chaque analyse est souvent faible.

L'absorption des protéines dans l'UV n'est pas très intense ainsi que le dosage n'est pas précis. Elle a cependant un inconvénient majeur, particulièrement pour un dosage quantitatif.

En effet, la présence de contaminants ayant une absorption dans les mêmes régions que les protéines, peuvent fausser les résultats. Parmi les contaminants potentiels, on retrouve les acides nucléiques qui absorbent fortement autour de 254 nm, ce qui entraîne des mauvaises corrélations avec la méthode de Kjeldahl (HUIDSON et LUCAS, 1983).

En plus d'effet du pH sur l'absorption de l'acide aminée tyrosine et tryptophane, parmi les autres contaminants. Les produits tampons et les détergents peuvent aussi être souvent problématiques. Il faut donc faire des corrections du fond spectral et rechercher des conditions de solubilisations maximales du produit dans les bases ou les acides dilués, ou dans les solutions concentrées de l'urée (CARBALLIDO *et al.*, 1978)

De nombreuses substances fluorescentes non protéiques contenues dans l'échantillon, notamment dans les aliments interfère les résultats. De sorte que ce dosage est mieux adapté à pour les protéines purifier, qu'à l'analyse d'une protéine qui se trouve dans un échantillon hétérogène (MULTON, 1991).

Les équations de prédiction de la teneur en protéine avec l'IR incluent généralement d'autres longueurs d'ondes, pour tenir compte d'interférences liées aux bandes d'absorption exemple d'amidon (2100 nm) (DEVEAUX, 1989). Il est cependant préférable d'utiliser des facteurs de correction pour toutes les longueurs d'ondes pour régler le problème l'hétérogénéité des aliments (GUILLOU *et al.*, 1986).

Dans les années 1980, l'apparition d'une nouvelle génération d'appareils de conception totalement nouvelle a radicalement modifie les données du problème d'analyse quantitative effectuées par l'IR (VESSIERES *et al.*, 1992).

6.3. Dosage des proteines par les techniques immunologiques

Les méthodes immunologiques regroupent l'ensemble des techniques mettant enjeu la réaction antigène-anticorps. Cette réaction a été utilisée en premier lieu en milieu gélifié pour détecter la présence d'antigène. Depuis la première description du dosage de l'insuline en 1959 par ROSALYN et SOLOMON, les méthodes de dosage en milieu liquide sont devenues possible pour quantifier les protéines (Ag).

6.3.1. Méthode de RIA (radio-immunologique)

Les techniques radio-immunologiques reposent sur l'utilisation d'antigènes ou d'anticorps marqués avec un isotope (tritium ^3H ou le plus souvent ^{125}I). Elles sont très sensibles (jusqu'à 0.01 ng/ml) mais nécessitent un lourd équipement de mesure et ne peuvent pas être mises en œuvre que dans certains laboratoires (LINDEN, 1991).

6.3.2. Technique d'ELISA (immuno-enzymatique)

La méthode est réalisée par l'utilisation des anticorps polyclonaux ou monoclonaux pour la reconnaissance de la protéine à doser avec une grande affinité et spécificité. Ces anticorps possèdent une partie constante sur la chaîne lourde qui peut être reconnue par d'autres anticorps (anticorps anti-souris, anti-lapin, anti chèvre,...). Ces anticorps sont couplés chimiquement à des enzymes qui serviront de marqueurs (ENGVALL et PERLMAN, 1971). Ces enzymes peuvent être la phosphatase alcaline ou la peroxydase, catalysant l'hydrolyse du para-nitrophénolphosphate, ce substrat devient jaune conduit à l'émission d'un signal chromogène qui est proportionnelle à la concentration de l'antigène (Figure 12), absorbe dans les régions d'ultra-violet à 405 nm (ROITT *et al.*, 1977).

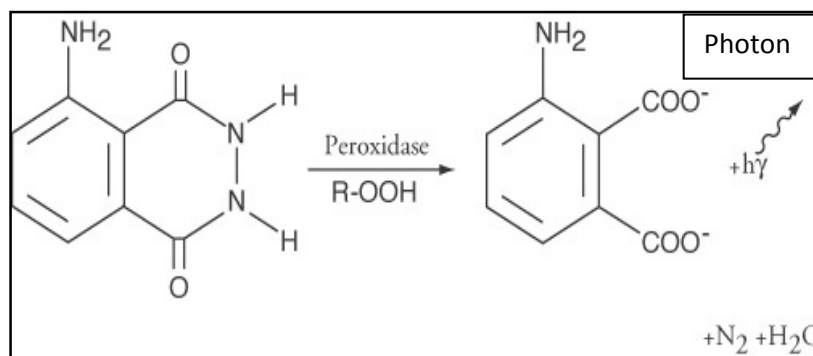


Figure 12: L'émission d'un signal chromogène par catalyse l'hydrolyse du para-nitrophénolphosphate (ROITT *et al.*, 1977).

6.3.3. Avantages et inconvénients d'immuno-dosage des protéines

Pendant longtemps, seuls les marqueurs radioactifs ont été utilisés, dont la qualité essentielle est liée à leurs propriétés d'émission non modifiées par l'environnement physicochimique, et à la sensibilité de la détection.

A cause des contraintes et limitations liées ; à l'emploi des traceurs radioactifs, à leur durée de vie limitée, leurs stockages et au traitement des déchets radioactifs, constituent la pierre d'achoppement de ce type de dosage (VESSIERES *et al.*, 1992). Cependant, l'utilisation de la radioactivité présente un inconvénient majeur puisqu'elle est restreinte seulement aux laboratoires agréés pour la manipulation de radioéléments (SPITZ, 2006).

Malgré une très forte sensibilité et une facilité de mise en œuvre, les immunodosages ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambiguïté le composé qui est analysé, et la spécificité des anticorps utilisés ne permettent pas toujours d'éliminer les réactions croisées avec des molécules interférentes (LANG *et al.*, 2006). La présence d'une molécule possédant un épitope semblable à l'épitope de l'antigène à analyser peut entraîner une réaction avec l'anticorps utilisé.

Une autre source d'erreur apparaît lors de liaisons non spécifiques entre les réactifs, par l'intermédiaire de substances semblables aux réactifs (HERMAN *et al.*, 1997).

6.4. Méthode de biuret 1949 (liaisons peptidiques)

La méthode de Biuret basée sur la réaction entre les liaisons peptidiques des protéines et un métal de transition (Cu, Ni...) pour former un complexe coloré sable (RICHTERICH, 1965). Les ions Cu^{2+} (ajoutés sous forme de sulfate de cuivre) se lient aux atomes d'azote de ces liaisons dans des conditions de pH alcalin (figure 13), produisant ainsi un complexe de couleur mauve avec absorption maximale à 540-550 nm (GVRILLOVIE *et al.*, 1996), la coloration violette observée en milieu très alcalin est très probablement due à la formation d'un complexe de coordination des ions cuivriques avec les doublets électroniques libres des atomes d'azote et d'oxygène dans certains cas (BOSSET et BLANC, 1973).

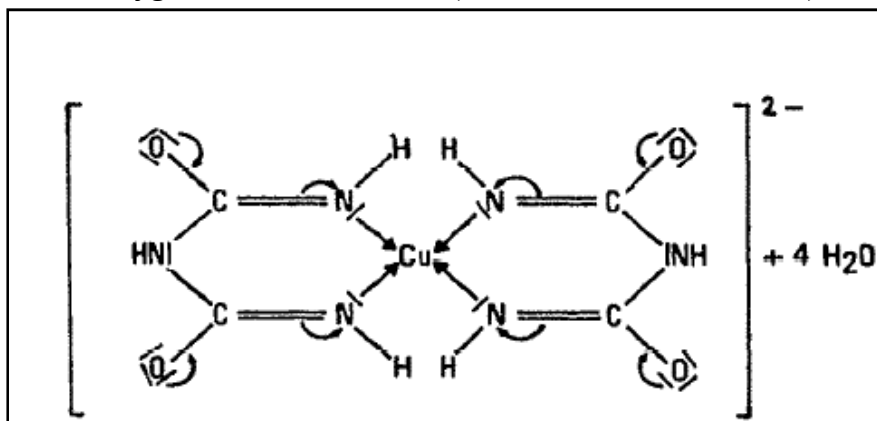


Figure 13: Réaction du cuivre avec les liaisons peptidiques (BOSSET et BLANC, 1973).

6.4.1. Avantages et inconvénients de la méthode biuret

Cette méthode présente un intérêt plus grand pour une détermination quantitative de protéines, puisqu'elle fait appel à une caractéristique commune à toutes les protéines (GRAPPIN et JEUNET, 1976).

Les principaux paramètres de la méthode biuret sont optimisés, à savoir la concentration en réactif (soude et Cu(EDTA) Na), le temps et la température de la réaction (BOSSET et, BLANC, 1973).

Les risques de réduction des ions cuivriques par les sucres réducteurs, en milieu alcalin limite l'utilisation de cette méthode notamment en agro-alimentaire. Ainsi la réaction de biuret ne donne pas des résultats just pour le dosage des protéines du lait entier à cause du lactose (3,6% en masse) qui interfère par son caractère réducteur, mais aussi la turbidité de ce milieu par la matière grasse et les caséines (RENNER *et al.*, 1972).

6.5. Dosage des protéines par évaluation des radicaux fonctionnels

6.5.1. Méthode de Lowry (1951)

Cette méthode est basée sur l'obtention d'un composé chromogène par la réaction d'oxydoréduction, cette dernière a lieu d'une part des groupements de protéines notamment les groupements phényles du tryptophane, de la tyrosine et dans une moindre mesure ceux de la cystéine et histidines (la liaison peptidique et aussi impliquée) et d'autre part, le réactif de Folin-Ciocalteu dont l'acide phosphomolybdotungstique est le constituant actif en milieu alcalin (LOWRY *et al.*, 1951). Cette réaction donne naissance à une coloration en bleu de molybdène (couleur bleu foncée) dont l'intensité est mesurée à 750 nm elle permet de doser du réactif de Folin-Ciocalteu par le complexe dans la figure 15 qui est dans le format original proposé par LOWRY (figure 14).

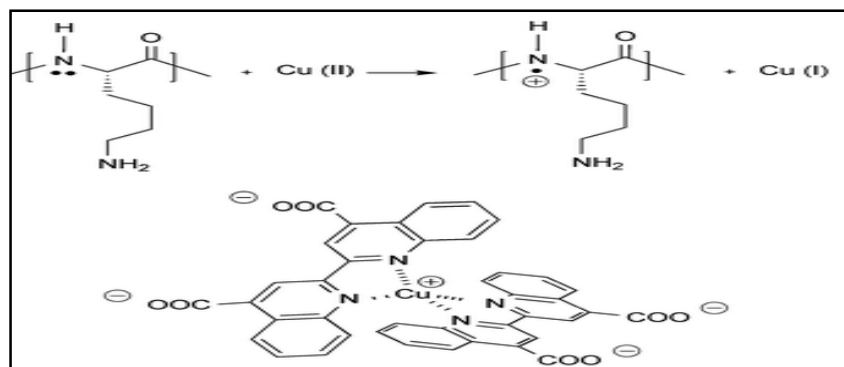


Figure 14 : Les principaux mécanismes réactionnels de la méthode de LOWRY 1951.

6.5.2. La méthode de BCA (dosage avec l'acide bicinchonique)

Cette méthode est basée sur des réactions chimiques à l'aide de BCA qui met en jeu deux solutions commercialisées (WALKER, 1994). Une l'acide bicinchonique et une autre de sulfate de cuivre.

Les ions Cu^{2+} sont réduits en Cu^+ en présence de protéines (figure 15), cela induit un virage dans la solution au pourpre donc ; les protéines en suspension peuvent être dosé à 562nm.

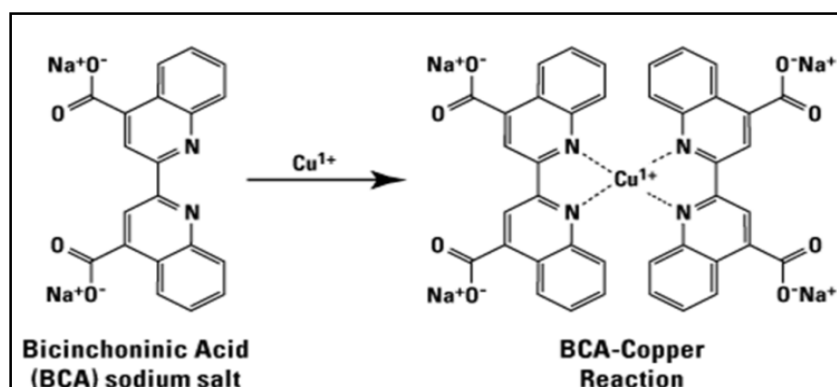


Figure 15 : Mécanisme réactionnel de BCA avec le Cuivre (WALKER, 1994).

6.5.3. Dosage avec l'O-phthaldéhyde mercaptoéthanol

Cette méthode conduit à la formation d'un composé fluorescent, l'émission de la fluorescence peut être mesurée par fluorométrie couplée à un spectrophotomètre, (MAKAMURA et PISANO, 1976). La réaction a lieu pendant 20 minutes pour des mesures dans un volume de l'ordre de nano-litre (Figure 16), la fluoescamine réagit avec les aminés primaires conduisant à la formation de composés fluorescents. En conséquence, plus il y aura d'aminés primaires initialement disponibles sur la protéine, plus le signal de fluorescence sera important.

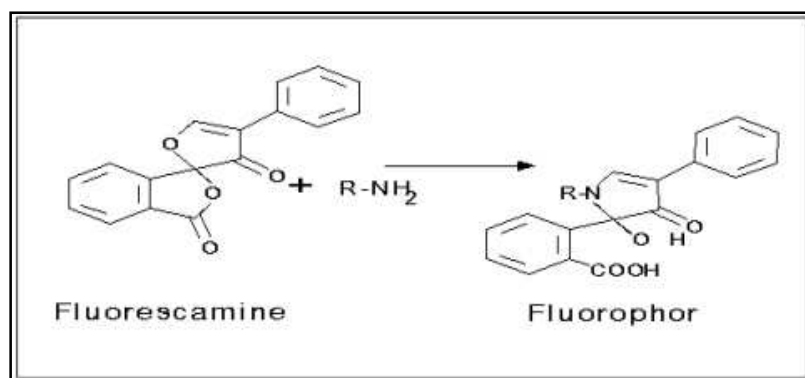


Figure 16: Couplage fluorescent entre une amine primaire et la fuorosamine à pH=9 selon DELLOBET (1991).

6.5.4. Avantage et inconvénients de dosage par l'évaluation des radicaux fonctionnels

L'analyse par la méthode de Lowry est une analyse influencée par d'autres solutés ainsi, elle donne une indication fausse de protéine en présence des polyphénols, vue que toutes les deux réduisent le réactif de Folin- Ciocalteu, contribuant à l'absorbance dans la même région du spectre pour les complexes de protéine (750 nm) (SMITH *et al.*, 1979). Elle est très sensible à de très nombreuses substances interférentes comme : certains peptides, des acides aminés, le saccharose, le glycérol, les dérivés mercaptan, l'EDTA, de nombreux détergents, etc. (BENSADOUN, 1976; PETERSON, 1979). De nombreuses variantes ont été développées pour contrecarrer ces défauts, citons une méthode permettant d'éliminer les substances interférentes par micro précipitation des protéines à l'acide trichloracétique après complexation avec du déoxycholate (PETERSON, 1977).

La méthode BCA est très sensible que la méthode de LOWRY, mais elle reste spécifique juste pour quelques produits. Par contre le dosage avec l'o-phthaldéhyde mercaptoéthanol dans le cas des protéines en physiologie, elle est très sensible dans la mesure des quantités d'albumines de l'ordre de picogramme (pg).

6.6. Dosage des fonctions amines libres

Les fonctions amines des résidus des protéines présentent une certaine réactivité. Lorsqu'elles sont libres elles peuvent donner lieu à des applications analytiques par deux types de réaction : liaisons avec de type électrostatique avec des colorants acides, et substitution par des dérivés fluorescents.

6.6.1. Méthode de Dye Binding Capacity (Fixation de colorant)

Elle consiste à évaluer par spectrophotométrie un colorant de l'acide sulfoniques en excès après sa fixation sur les protéines insolubilisés (MCSWEENEY et FOX, 1997). Les colorants les plus utilisés sont : le Noir Amido 10 B, Orange G ET Acide Green. La quantité de colorant fixée sur les protéines est calculée par plusieurs méthodes. Elle est proportionnelle à la quantité de résidus basiques des protéines de l'échantillon analysé.

6.6.2. Méthode de Bradford 1976 (Fixations non covalentes de colorants)

L'analyse par la méthode de Bradford est fondée sur des interactions entre les résidus de base d'acides aminés (principalement arginine, lysine et histidine) avec le colorant brillant du bleu G-250 de Coomassie (figure 17). D'après (BIANCHI *et al.*, 1996) la réalisation de la réaction de Bradford dans une solution de CBB acide, permet de diminuer le temps

d'incubation. Dans ces conditions le colorant se lie facilement aux acides aminés aromatiques (BONMATI *et al.*, 2009). Après la liaison du réactif avec ces acides aminés hydrophobes ; la solution vire vers une coloration rouge, l'absorbance peut être obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre dans la longueur d'onde maximale de 465-595 nm donc ; à partir de cette absorbance la concentration en protéines est facilement déduite par la loi de BEER-LAMBERT (BRADFORD, 1976).

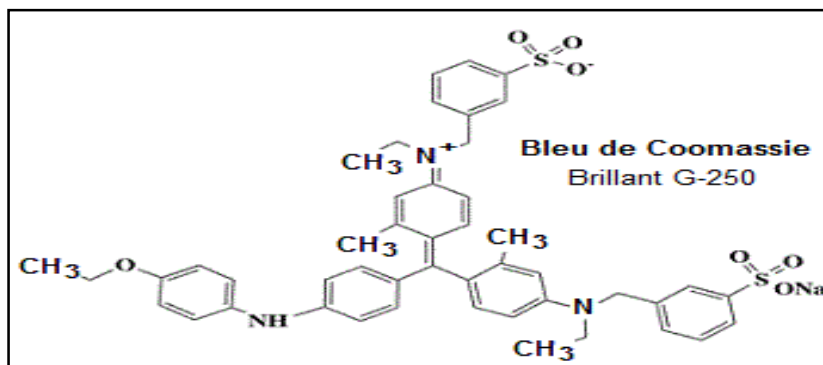


Figure 17 : Structure chimique de colorant brillant du bleu G-250 de Coomassie (BRADFORD, 1976).

6.6.3. Les avantages et inconvénients de dosage des fonctions amines libres

L'analyse de Bradford est devenue la méthode colorimétrique de choix, cela est due principalement à sa sensibilité élevée, linéarités perçues et à la vitesse de l'analyse (SAPAN *et al.*, 1999). Elle permet de doser des quantités de protéine de l'ordre du microgramme.

L'analyse de Bradford est caractérisée par des interactions entre le réactif et les hydrates qui se trouvent dans la suspension à analyser, notamment avec des sels, des détergents et drogues (REMILE *et al.*, 2013). Les mêmes types d'interactions qui existent entre les protéines et le bleu de Coomassie G-250, peuvent également exister entre le colorant et les parties hydrophobes ou aromatiques de l'ADN ou de l'ARN (CESCO *et al.*, 2012).

Un autre défaut lié à sa réactivité qui est très différente face à diverses protéines. En effet le contenu en arginine et en certains acides aminés hydrophobes est très variable. La sensibilité du bleu G-250 de Coomassie pour l'albumine est plus grande que pour des globulines et pour cela les courbes standards pour la méthode de biuret sont plus linéaires que ceux pour la méthode de Bradford (WILGENBURG, 1981). Une protéine pure dosée par cette méthode aura tendance à donner une valeur plus fiable qu'un mélange de protéine (LINDEN, 1991).

La méthode BDC simple, sa rapidité est de l'ordre de 60 à 180 échantillons /heure, elle présente une bonne reproductibilité (GUILLOU *et al.*, 1984). Comme toutes les autres méthodes ; la BDC présente aussi des inconvénients et le plus courant c'est la présence de composés (Hg, Cl₂, K₂ Cr₂ O₇) entrant en compétition de fixation avec le colorant sur les protéines (GRAPPIN *et al.*, 1976).

7. Domaines d'applications des méthodes de dosages des protéines

7.1. Domaine agro-alimentaire

7.1.1. Industrie laitières

Parmi les produits d'origine biologique, le lait présente une source abondante de protéines animales et qui présentent environ 90 à 95% d'azote protéique, ces protéines possèdent de très bonnes propriétés nutritionnelles car elles présentent une excellente digestibilité en plus des propriétés et techno-fonctionnels à la base de la fabrication de plusieurs produits. Dans le cas des protéines lactiques (caséines et les protéines du lactosérum), la détermination de la teneur en protéines totales se fait par la méthode du Kjeldahl, par fixation de colorant ou par spectrométrie dans l'infrarouge et l'ultraviolet. La méthode par fixation de colorant (principalement le noir amido) et la spectrophotométrie dans l'infrarouge sont les plus utilisées dans les laboratoires de contrôle de l'industrie laitière (GUILLOU, 1976). La variabilité des résultats sont relative aux facteurs naturels (race, stade de lactation, saison, alimentation.....) qu'à la méthode de dosage utilisée (GROVES, 1960).

7.1.2. Industrie céréalières

Les protéines d'origine végétale les plus exploitées à l'échelle industrielle sont celles des céréales comme le blé et l'orge (gliadines et gluténines). Ces protéines occupent une place très importante sur le plan nutritionnel et économique car elles permettent la fabrication d'un certain nombre de produits à forte consommation : pâtes, pain, biscuits....etc (GODON et LOISEL, 1994).

La méthode idéale pour le dosage des protéines des céréales est Kjeldahl car ces dernières contiennent peu d'azote non organique (GODON et LOISEL, 1997)

7.1.3. Autres industries

Des produits agricoles ou alimentaires provoquant ainsi la formation d'anticorps qui peuvent être utilisés pour leurs dosages (ROSSENEU *et al.*, 1981).

Pour les protéines d'origine animale, la méthode de référence adoptée est la méthode de Kjeldahl (GUILLOU *et al.*, 1976). Par contre la méthode Dumas est très préférable pour les protéines végétales, il y a plusieurs raisons : le produit doit être sec, d'où la nécessité de le déshydrater avant l'analyse ; il doit être finement broyé et bien homogénéisé pour diminuer le risque d'erreur (MULTON, 1991) ce qui est compliquée pour les denrées alimentaires d'origine animale, vu leur variabilité en terme texture.

L'application répandue de dosage de l'azote total, a prolongé sa portée à la détermination de l'azote de protéines des produits à base de viande, bière et d'autres matériaux de nourriture, vu que cette teneur influe énormément sur la qualité de ces produits (HENRY, 1984).

7.2. Domaine médicale

7.2.1 Contrôle au niveau des industries pharmaceutiques

Dans l'industrie pharmaceutique (par ex. d'un vaccin), la teneur en protéines des milieux de culture doit être souvent déterminée dans le cadre de contrôles de qualité des produits. Il existe aujourd'hui un grand nombre de méthodes pour cet effet. La plupart de ces méthodes réalisent les tests de quantification des protéines selon Lowry, Bradford, BCA et Biuret, qui sont basées sur des réactions de coloration diverses avec le reste d'acides aminés, ensuite avec divers mesure soit par absorption à des longueurs d'onde définies dans le

domaine spectral visible, soit par la méthode d'absorption UV directe et par une méthode d'analyse par fluorescence (BLETZINGER et JENA , 2011),

Aujourd'hui grâce aux systèmes automatisés dans ce contexte, les industries pharmaceutiques arrivent à réaliser des contrôles de médicament très sensibles à titre d'exemple contrôle des préparations chimio thérapeutiques à base d'anticorps monoclonaux par l'automate Multispec utilisé (figure 18), combine la spectrométrie UV et IR (BAZIN *et al.*, 2010) .

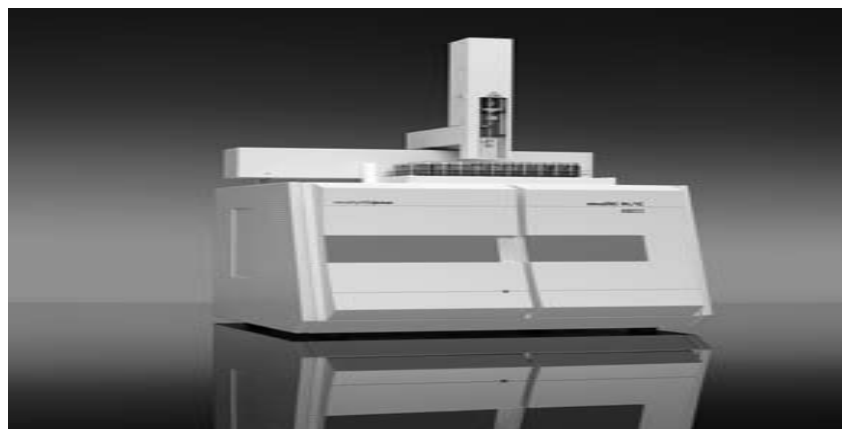


Figure 18 : photographie pour l'automate Multispec (BAZIN *et al.*, 2010).

7.2.2. Contrôle au niveau des laboratoires d'analyse médicale

En virologie, un meilleur choix des souches vaccinales, consiste à analyser le génome virale ou ses produits, protéines virales, la majorité des cas, ses protéines ; ne représentent qu'une très faible quantité des protéines totales, ce qui est délicat pour une analyse quantitative. Donc, des techniques radio-immunologiques mis en œuvre pour effectuer le dosage de ce type d'échantillon à l'aide des anticorps très spécifiques ; anticorps monoclonal (LATORRE *et al.*, 1984).

Les connaissances acquises sur l'endocrinologie de la gestation ont fortement évoluées, grâce au développement de différents systèmes de dosage des protéines associées, dans le sang et dans le lait par des méthodes radio-immunologiques (BAPTIST, 2012).

La détermination quantitative des protéines en fluides biologiques, en utilisant la méthode de Bradford, a été évaluée en comparant cette méthode à la méthode de biuret (WILGENBURG, 1981) l'analyse avec du bleu de Coomassie G-250 est plus laborieuse et prend beaucoup plus de temps que la réaction de biuret (PIERCE, 1977).

Afin de diagnostiquer une éventuelle maladie, le dosage spécifique des protéines sériques par des techniques immunologiques est très répandu au niveau des laboratoires d'analyses médicales et cette dernière peut être automatisée.

Contrairement au sérum, il n'existe pas de méthode de référence pour le dosage quantitatif des protéines urinaires (IMAI, 1986). Ceci s'explique par la diversité d'origine des protéines présentes dans l'urine. Les faibles concentrations physiologiques doublées d'une amplitude considérable de variation (facteur 1 000) et enfin la complexité physico-chimique de l'urine (sels, métabolites endogènes et exogènes)

Selon (HATTCHOUEL *et al.*, 2009) les techniques les plus utilisées pour le dosage des protéines totales au niveau des laboratoires d'analyses médicales est la méthode colorimétrique fondée sur la réaction du Biuret (avec ou sans iodure de potassium), près de 99% d'utilisateurs et 1% pour la mesure de l'indice de réfraction du sérum (réfractométrie).

7.3. Domaine de la recherche

Des techniques de hautes performances notamment l'HPLC, l'électrophorèse capillaire et la FPLC permettent de quantifier de très petites quantités de protéines (de l'ordre du micro et du nanogramme) présentes dans un mélange. Ces techniques sont malheureusement très coûteuses pour être utilisées comme méthodes de dosage de routine

Lors de l'extraction des enzymes d'origine végétale, microbienne et animale, le contrôle de taux purification par des techniques spectrophotométriques est très utilisé, ces enzymes sont dosées par des méthodes colorimétriques couplées à une évaluation de l'activité enzymatique (HAMBERT et ALIAS, 1979 ; LINDEN ,1986).

8. Conclusion et perspective

Dans les organismes vivants ; les protéines constituent la classe la plus nombreuse et la plus complexe, et pour cela de grands progrès ont été réalisés dans les méthodes de leurs études qualitatives et quantitatives

Il ressort de cette recherche bibliographique que l'analyse quantitative des protéines dans une matrice alimentaire ou non alimentaire, peut être réalisé par plusieurs méthodes qui diffèrent selon le principe de base utilisé mise aussi les conditions expérimentales mises en œuvre.

La méthode de KJELDAHL est la méthode de référence, appliqué à tous les types de protéines. Le principal avantage de la méthode est la remarquable précision de la détermination du taux d'azote (0,5 à 1%). En revanche, cette précision n'est pas tout à fait représentative de la valeur réelle de la concentration en protéines. En effet des fluctuations peuvent être rencontrées lors de l'analyse des produits d'origine divers, d'une part, et d'autre part, à cause des proportions variables dans l'échantillon.

En dehors de la méthode de KJELDAHL qui s'adapte à tous les cas de figures, les autres méthodes décrites précédemment reposent sur la nature des protéines considérées et l'objectif de quantification. Il existe d'autres méthodes chimiques et physiques qui sont pas présentés dans cette étude, car elles sont considérées comme dépassées à cause de leur reproductibilité et leur sensibilité qui sont moins bonnes et aussi leur manque de fidélité ces méthodes sont : le dosage par formol titration, par déplacement par une base, par titrage au formaldéhyde, par action d'exopeptidase, par méthodes d'électrodes spécifiques,etc.

Actuellement, une large gamme de tests utilisant les analystes marqués par des enzymes, des traceurs fluorescents, luminescents ou autres sont disponibles. Une nouvelle méthode immunodosages non isotopique qui utilise comme traceurs des complexes organométalliques, du cobalt ou du manganèse carbonyle et comme méthode de détection et de dosage dans les zones de l'infra-rouge. Le principe de ce dosage est basé sur les propriétés spectrales particulières de ces complexes, qui ont de très fortes bandes d'absorption dans Le domaine 1800-2200 nm ; une région dans laquelle les protéines et les molécules organiques n'absorbent pas.

La technologie de la fabrication des spectrophotomètres à barrette d'iode est considérée comme une révolution du siècle pour les domaines qui font appel aux techniques optiques, notamment pour celles d'analyse des molécules biologiques, comme techniques spectrophotométriques de dosage des protéines. Des spectrophotomètres puissants, disponibles sur le marché pour la mesure simultanée du spectre lumineux complet, de l'ultra-violet au visible en seulement 0,1 seconde comme ils permettent l'analyse multicomposés des mélanges, avec robustesse et fiabilité exceptionnelles.

II. Partie expérimentale

1. Introduction

Parmi les objectifs de la biochimie alimentaire, la séparation et la quantification des différents constituants présents dans les aliments (protéines, lipides, glucides et vitamines). La séparation permet leur identification ultérieure (nature et fonction des constituants) et la quantification permet de déterminer leur teneur relative suivant le but recherché.

Le contrôle des produits alimentaires commercialisés, permet d'évaluer la qualité, la stabilité et la consistance du produit en ce qui concerne ses caractéristiques nutritionnelles et organoleptiques qui sont intimement liées à son origine (espèce, climat....etc.), à son processus de fabrication, ainsi que le mode de conservation impliquée.

Le stage a été réalisé au laboratoire pédagogique de biochimie, Hassnaoua II de l'université M. Mammeri de Tizi-Ouzou. Il a été soutenu par le matériel et les méthodes ci après indiqués.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel

2.1.1. Matière première

Les échantillons utilisés dans le cadre de cette étude sont de diverse nature :

- **Les échantillons de jus** : Jus frais d'orange et de citron, jus commercial (Ramy, Rouïba, Vita-jus), jus lacté et un jus light.
- **Les échantillons du lait** : lait écrémé, lactosérum lyophilisé du lait de vache, lactosérum non lyophilisé du lait de brebis.
- **Les échantillons d'huile** : huiles d'olive, huile de soja (Safia), huile de colza.
- **Autres échantillons** : la margarine, smen, le beurre de vache nature.

2.1.2. Appareillage

- unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales comprenant : cuves d'électrophorèse, générateur de courant, plaques en verre et en hydroxyde d'alumine (10 x 8 cm), des espaceurs, peigne.
- unité de chromatographie liquide basse pression comprenant: une colonne chromatographique contenant le gel (dimension 1.6 x 30cm), un détecteur UV, une pompe péristaltique, un collecteur et un enregistreur graphique ;
- balance de précision à 0,01mg (SARTORIUS) et balances analytiques à affichage digital (0,01g) (Denver Instrument) ;
- spectrophotomètre UV Visible (SCHIMADZU, Japon) ;
- pH mètre (Hanna-instruments) ;
- lyophilisateur à plateau (BETA, Allemagne) ;
- centrifugeuse réfrigérée, max 28 000 x g (SIGMA) ;
- agitateurs variés (de tubes, à plateau, à barreaux magnétiques chauffant et non chauffant...) ;
- dessiccateur ;
- bain Marie (Mammert, Allemagne) ;
- pompe pour le dégazage.

2.1.3. Autres matériels

Barrots magnétiques, crème anti fuite, étiquettes, filtres, la barre magnétique, la coupelle, les emboues, les gants, moule, papier pH, piécette, pince, spatule, barre à aimant, poire, portoirs, micropipettes (20-200µl), (100-1000µl), bavettes.

2.1.4. Produits chimiques et réactifs

- Dosage de la vitamine C : 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) ; bicarbonate de sodium (NaCO_3) ; acide ascorbique ; acide acétique glaciale.
- Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse : éthanol ; potasse KOH ; phénolphthaléine, thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,02N) ; lugol.
- Dosage des glucides : le 3,5 dinitrosalicylique (DNS).
- Dosage des protéines : Na_2CO_3 anhydrid, NaOH, CuSO_4 , tartrate de Na et K ,1%, réactif de Folin-Ciocalteu, Albumine Sérique Bovine (BSA).
- Hydrolyse acide des sucres : H_2SO_4 (72%, V/V), solution d'ammoniaque.
- la CCM : gel de silice, solvants (butanol, acide acétique, éthanol), réactif de Molisch, acide sulfurique 20%, alpha-Neftoli, des solutions standards (Glucose, Galactose, Fructose, cellobiose) ;
- hydrolyse enzymatique des protéines du lait : tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 6,4 ; enzyme la papaine.

2.1.5. Verreries

Béchers (50, 100, 250, 500 et 1000ml); Burette de 100ml ; entonnoir ; erlenmeyer ; fiole à vide de 100ml; éprouvettes (50 et 250 ml) ; seringue d'Hamilton, fiole jaugée(10, 25, 50, 100, 250 et 500ml)et de 1L. Pipette jaugée de (1 ml, 5ml et 10ml), 10ml ; tubes à essai.

2.2 Méthodes

2.2.1 Méthodes physicochimiques

2.2.1.1. Mesure de pH

La valeur du pH est lue directement sur le pH mètre après immersion de son électrode dans l'échantillon à analyser. Les mesures sont précédées d'une étape d'étalonnage qui consiste en un ajustement du cadre de lecture du pH à l'aide d'une solution tampon.

2.2.1.2. Dosage de la vitamine C dans les jus

L'acide ascorbique (Vit C) est une molécule très répandue dans les aliments notamment dans les jus de fruits. De très nombreuses études ont été faites, que se soit sur le métabolisme ou sur ses influences multiples dans des domaines aussi variés que les réactions immunitaires, le système cytochrome P-450, la division cellulaire, l'hydroxylation de collagène et de l'élastine (SEIB *et al.*, 1982).

Principe :

Les méthodes de dosages de la vitamine C sont très variées et utilisent principalement ses propriétés réductrices. le choix de la méthodologie dépend surtout de sa concentration et la complexité du milieu dans lequel on la dose (GRAVILOVIE *et al.*, 1996).

La méthode la plus utilisé est celle du titrage volumétrique de la forme réduite de 2,6 dichlorophénol indophénol qui a pour particularité l'oxydation de la Vit C en milieu acide (figure 19), ce qui renforce cette stabilité donnant une coloration rose caractéristique (AOAC, 1984). Les conditions utilisées sont celles recommandées par AUDIGIE *et al* (1978). (annexe 01). La réaction d'oxydation de cette Vitamine s'écrit :

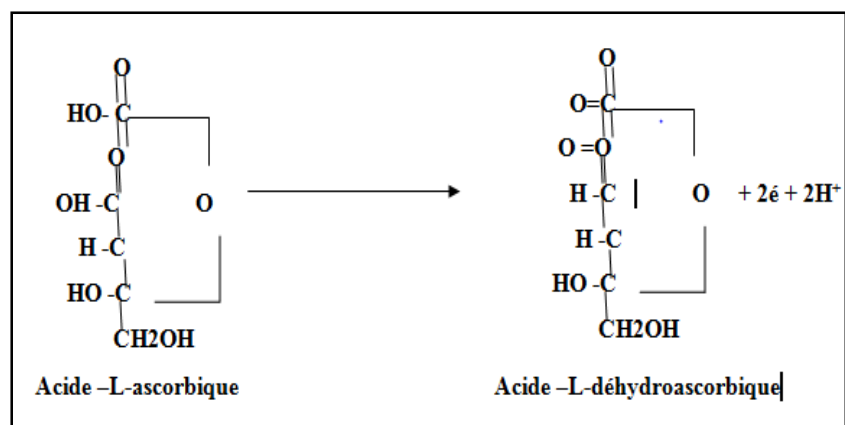


Figure 19 : Réaction de l'oxydation de la vitamine C (AUDIGIE *et al.*, 1978).

2.2.1.3 Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

2.2.1.3.1 Détermination d'indice d'acidité

Principe

L'indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse exprimée en milligramme, nécessaire pour neutraliser toutes les fonctions acides libres contenues dans un gramme de corps gras (FIGARELLA, 1996).



L'indice d'acide permet aussi de mesurer la quantité d'acides gras libres résultant des réactions d'hydrolyse et d'oxydation des triglycérides (NDEYE, 2001). Les huiles destinées à la consommation doivent contenir moins de 1% d'acides libres (MAMBAP, 1989).

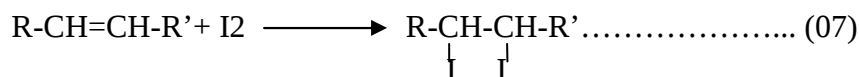
C'est un dosage qui nous permet d'estimer le taux d'acide gras libre par la détermination du nombre de mole (n KOH) (Annexe 02).

2.2.1.3.2 Détermination d'indice d'iode

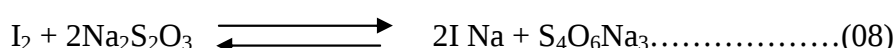
Principe

L'indice d'iode est le nombre de grammes d'iode fixe sur les doubles liaisons de 100 grammes de matières grasses. Cet indice permet de déterminer le nombre d'insaturation d'un corps gras et par suite sa prédisposition à l'oxydation (DJOM, 1993). Un corps gras est plus sensible à l'oxygène lorsqu'il est constitué d'un nombre élevé de doubles liaisons (Annexe 03).

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 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0.02N) selon la réaction suivante :



2.2.1.4 Dosage des glucides

Principe : L'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS) réagit avec les oses réducteurs et autres molécules réductrices pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique (figure 20) qui est en milieu alcalin et à chaud absorbe fortement la lumière à 530 nm. Dans cette réaction, la couleur de la solution passe du jaune-orange au rouge (Annexe 04).

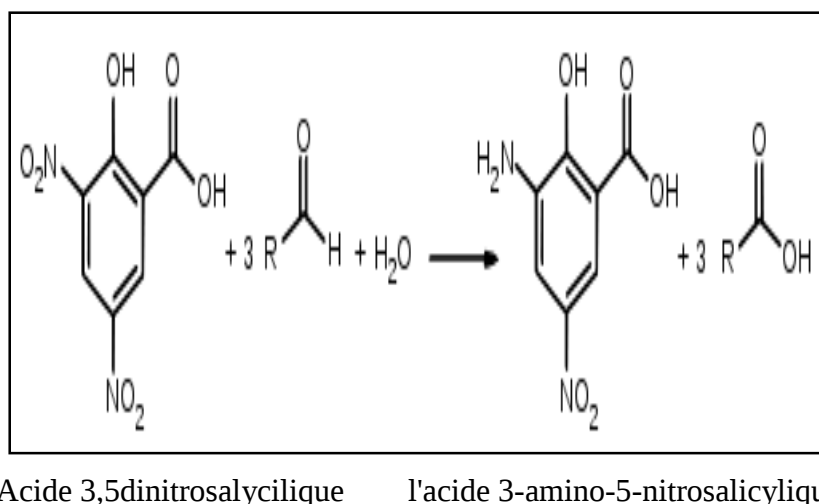


Figure 20 : La réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs (AUDIGIE *et al.*, 1978).

2.2.1.5 Dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951)

Un grand nombre de méthodes a été utilisée pour le dosage des protéines du lait (protéines totales, caséines, protéines du lactosérum) : méthodes de dosage nécessitant la dégradation par voie chimique des protéines (méthode de Kjeldahl, Dumas, Kofranyi, dosage des acides sialiques), méthodes par titrage à la formaldéhyde, par fixation de colorant, par colorimétrie, par spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge et l'ultraviolet ou par fluorescence dans l'ultraviolet, méthodes turbidimétriques, méthodes électrophorétiques, méthodes chromatographiques, méthode immunologiques et par action d'exopeptidases (carboxypeptidase A) (GUILLOU *et al.*, 1976).

Principe

L'addition successive à une solution protéique diluée d'un sel de cuivre en milieu alcalin puis du réactif de Folin-Ciocalteu donne une coloration bleue foncée. Celle-ci résulte de la réaction du cuivre sur les liaisons peptidiques et la réduction de l'acide phospho-tungsto-molybdique par la tyrosine, le tryptophane et la cystéine (DELOBETTE *et al.*, 1991). Les espèces réduites absorbent à 750 nm. A cette longueur d'onde, le spectrophotomètre donne une valeur de densité optique (DO) qui permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon analysé en se référant par projection à une courbe d'étalonnage $DO = f(c)$ où l'albumine sérique bovine commerciale est utilisé comme protéine étalon, le mode opératoire est donné en (Annexe 05).

2.2.2 Méthode d'identification

2.2.2.1 Hydrolyse acide des sucres suivis d'une CCM

Méthode

- Peser dans un tube à essai 0,01g (10mg) de D(+) Cellobiose sur une balance de précision ;
- ajouter un volume de 125µl d'H₂SO₄ (72%, V/V) qui est un acide utilisé afin d'hydrolyser la liaison osidique β (1-4) du lactose, bien homogénéiser, le mélange est incubé pendant 45min à température ambiante;
 - après incubation, un volume de 1.35ml d'eau distillée est ajouté, vortexer et incubé pendant 3H à T°= 100°C pour accélérer la réaction;
 - après refroidissement, la neutralisation se fera avec une solution d'ammoniaque 8,5% ;
 - a chaque fois qu'on ajoute 200µl, vortexer, déposer une goutte sur le papier pH si on obtient la couleur verte /bleu on s'arrête ça veut dire le pH de la solution est de 7, si la goutte déposer sur le papier pH est de couleur rose on ajoute encore 200µl on vortex jusqu'à ce que la couleur verte apparait ;
 - prendre le volume de ce dernier ayant servi à la neutralisation.

2.2.2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Principe

La chromatographie sur couches minces (CCM) est une méthode d'analyse couramment utilisée pour l'identification de composés organiques, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté des produits analysés (AUTRAN, 1991). De plus, étant donné que la CCM indique le nombre de composants d'un mélange, semble employer pour suivre la progression d'une réaction comme dans le cas de l'hydrolyse de polysaccharides (DELATTRE, 2005). Selon deux phases :

- la phase stationnaire solide, le support est le gel de silice qui joue le rôle d'adsorbant (figure 21). 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, ce qui favorise des interactions plus importantes, donc une meilleure séparation des composés.
- la phase mobile liquide : le solvant va permettre le déplacement et la migration des molécules (Annexe 06).

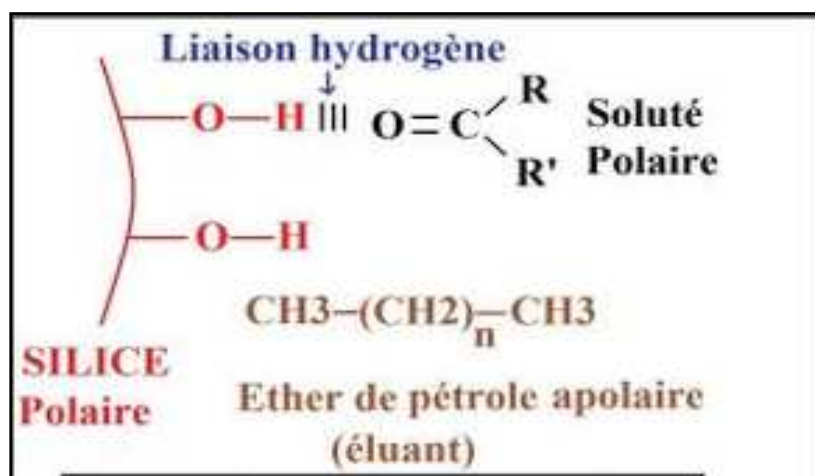


Figure 21 : Principe d'absorption entre soluté et gel de silice.

2.2.2.3 Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

Principe

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort (V_m ou V_0). Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses dans le gel, leur migration est freinée.

Les conditions de la chromatographie sont modifiées et ajustées aux protéines étudiées. La séparation est effectuée sur colonne de dimensions : 30 x 1,6 cm (figure 22).

Les protéines sériques du lait bovin seront fractionnées selon la masse moléculaire en utilisant une phase stationnaire constituée de séphacryl S200 qui est un gel préparé par réticulation covalente d'un allyle de dextrane avec du N, N' méthylène bisacrylamide. Ce gel, ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 5.10^3 et $2,5.10^5$ Da (Annexe 07).

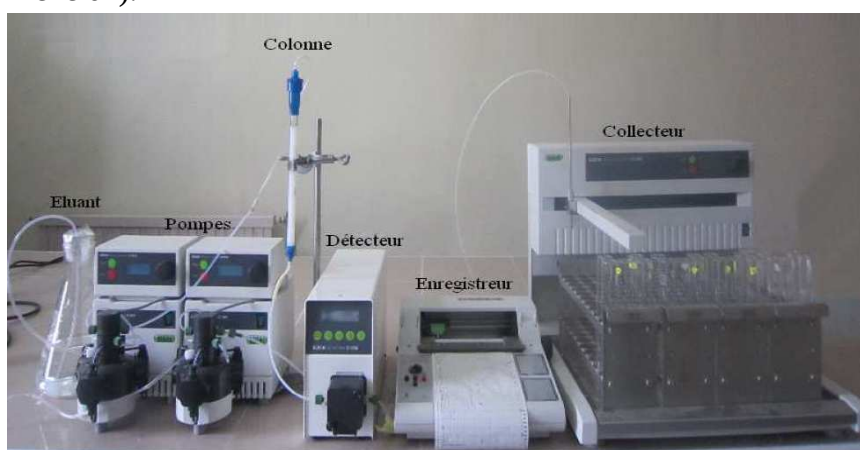


Figure 22: Photographie de l'unité de chromatographie sur colonne de dimensions 30 x 1,6 cm (LABAB UMMTO).

2.2.3. Méthode de caractérisation

2.2.3.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines lyophilisées) 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. Mais les liaisons les plus coupées sont celles engagées le groupe carboxyle d'un résidu Arginine ou Lysine, ainsi que le carboxyle des acides aminés précédés par un résidu Phe (RAO *et al.*, 1998). C'est une enzyme qui est produite extracellulairement comme intracellulairement (KUMAR *et al.*, 2008). Largement utilisée dans l'industrie pour la préparation des hydrolysats de protéines très solubles et aromatisés (SCRIBAN, 1993; PELMONT, 1995), mais elle est moins utilisée pour les préparations coagulantes au cours de la fabrication des produits laitiers en raison de l'arrière goût qu'elle confère aux produits (RAMET, 1990).

L'activité de la papaïne dépend des conditions du milieu, notamment le pH et la concentration en NaCl (SANOGO, 1988).

Méthode

- dissoudre 1 à 2 mg de protéines lyophilisées dans 800µl de ce tampon ;
- chauffage à 100°C pendant 4à5min puis refroidir dans un bain d'eau froide ;
- ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol.
- préparer 5 tubes secs (0' ; 15';30' ; 60' ; 120'), on met 200µl du tampon d'échantillon SDS, 1ml tampon Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,4 ; (Annexe 08)
- préparation du milieu réactionnelle : 10 mg de caséines du lait de vache lyophilisées dissous dans 1ml du tampon Tris-HCL, bien homogénéisé et avant de mettre l'enzyme on prélève 200µl de ce milieu mis dans le premier tube qui est le témoin à t=0s ;
- juste après l'ajout de 100µl d'enzyme, incuber dans le bain marie à température optimale pour l'activation de la papaïne T°=40°C ;
- après t= 15s on prélève 200µl ensuite on incube toujours le milieu réactionnelle afin de poursuivre l'hydrolyse enzymatique ;
- arrêter la réaction dans le tube t=15s par chauffage à100°C pendant 5min, et la même chose pour les autres tubes et au temps qui les convient à t=30s ; 60s ; 120s (Figure 24).
- pour contrôler le produit de l'hydrolyse, on a effectué une électrophorèse PAGE-SDS pour les hydrolysats obtenus.

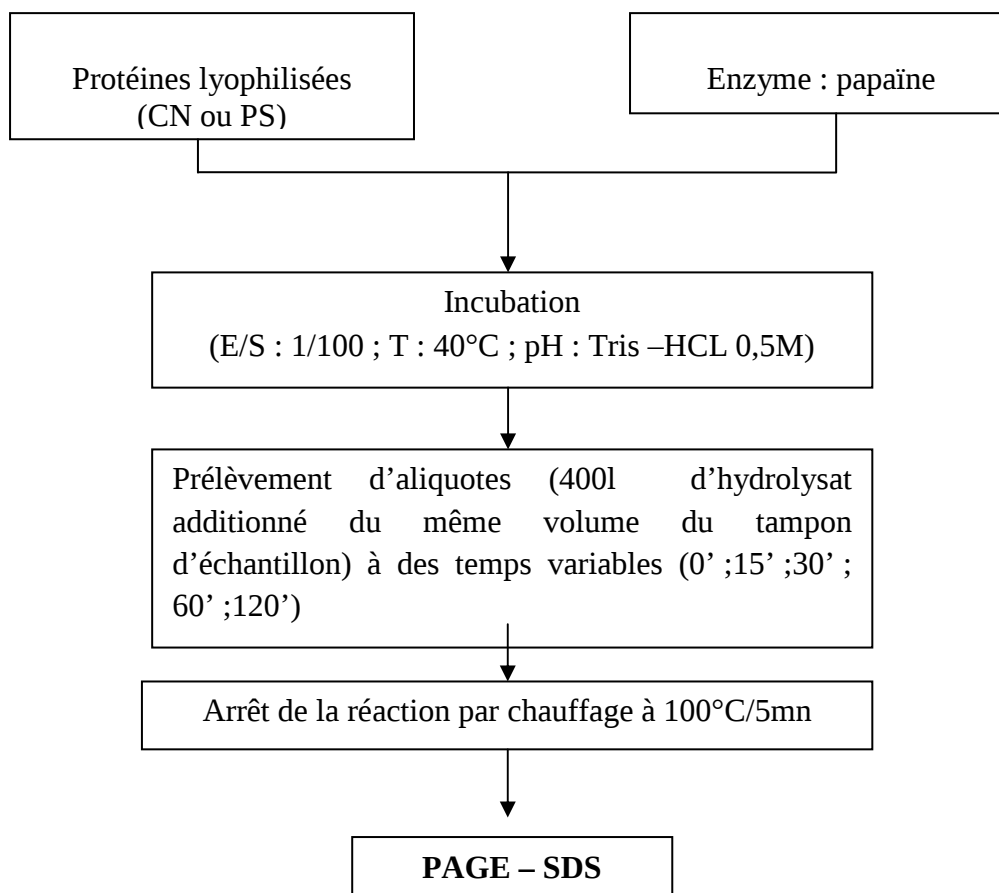


Figure 23: Les étapes suivies de l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la papaïne.

2.2.3.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Principe

Les protéines majeure du lait en raison de leurs caractères amphotère sont solubilisés dans un tampon de pH supérieur à leur pHi (pH alcalin) .il en résulte leur acquisition d'une charge (-) et leur migration sous l'effet du champ électrique appliqué vers le pole (+).

La PAGE est la technique la plus utilisé en raison des avantages qui sont offert par les propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevé 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 chaines 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) (Figure 24).

La structure du gel est définit par les indices T et C. sa porosité est ajusté en faisant varier les concentration 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 :

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

$$\text{Avec : } \begin{cases} a : \text{acrylamide (g)} ; \\ b : \text{méthylène-bis-acrylamide (g)} ; \\ v : \text{volume de la solution (ml)} \end{cases}$$

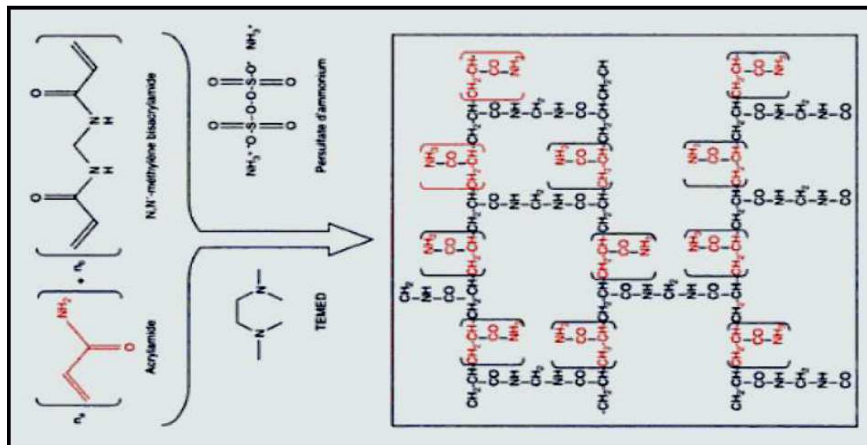


Figure 24: mécanisme de polymérisation du gel de polyarylamide.

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 remplir les cuves supérieurs et inférieurs de tampon d'électrode. L'unité est mise sous tension/courant et voltages constants : 20mA, 250V (Figure 25).

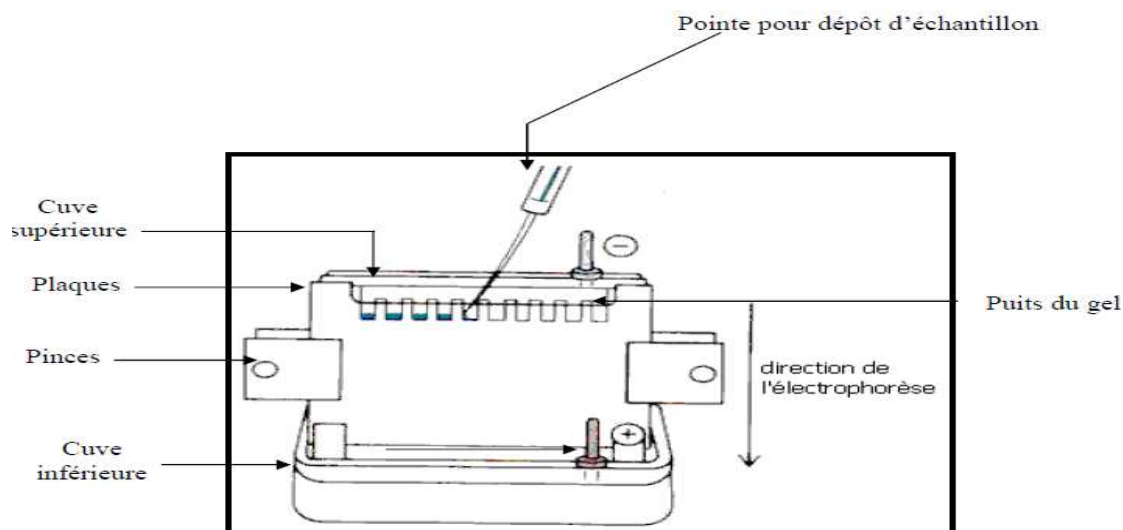


Figure 25 : Dépôt des échantillons en électrophorèse.

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

L'électrophorèse est une technique puissante et facile à utiliser, et particulièrement résolutive pour les protéines sériques du lait. Les différentes étapes sont montrées dans la figure)

En se basant sur la méthode de HILLIER (1976), nous avons utilisé un gel de polyacrylamide à T=12% et C=2,7%.le tampon de gel est composé de (Tris HCL, 0.75 M, pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (Tris, 5mM ; glycine ; 77mM ; pH 8,3). Les fraction protéiques récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200, sont déposées dans des puits à raison de 2mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel(1/10 V/V),de l'eau distillée(7/10 V/V)et du glycérol 10%(V/V). (Annexe 09)

2.2.3.2.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Ce type de séparation est basé sur un système biphasique, comprenant deux type 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 [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_3^- \text{Na}^+$] est un détergent fortement anionique qui s'associe avec les protéines et leur confère une charge globale négative. Associé avec le 2-mercaptoéthanol (2-ME), un agent réducteur assurant la rupture des ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines et provoque la dissociation des polypeptides (Figure 26).

Dans ces conditions, l'effet de charge entre constituants est annulé. Leur migration dans le support ne dépend plus que de leur taille (PM).

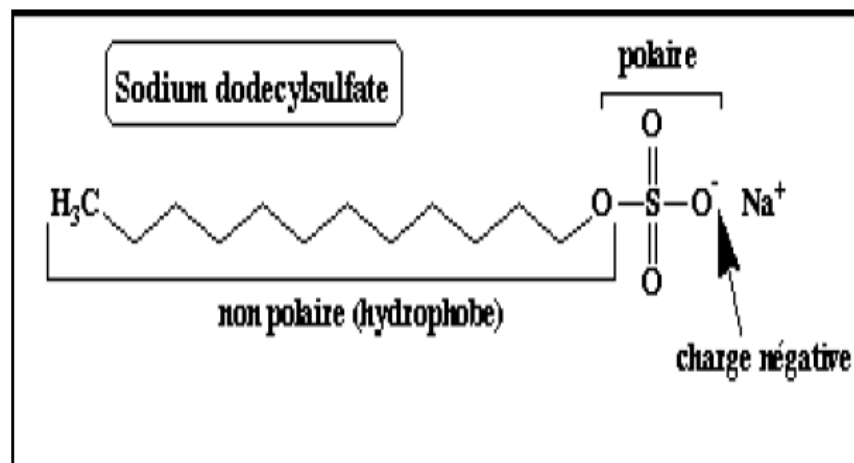


Figure 26 : Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).

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 27).

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 commassie 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)

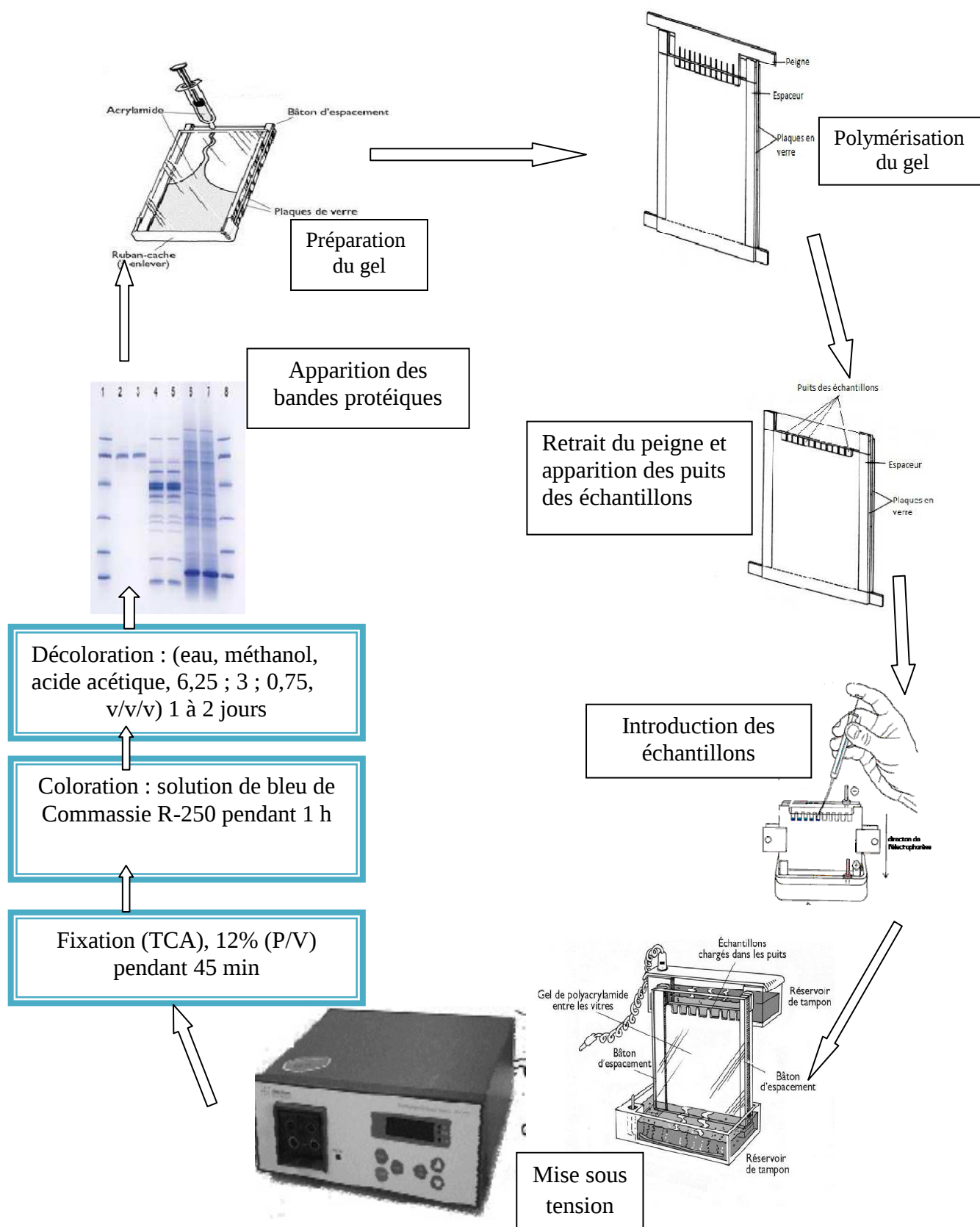


Figure 27 : Principales étapes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation des protéines.

3. Résultats et discussions

3. 1. Détermination de quelques paramètres physicochimique

3. 1. 1. Mesure de pH et teneur en Vitamine C

Après réduction du 2-6 dichlorophénol- indophénol de couleur bleu en milieu acide, cet indicateur prend une coloration rose pale qui persiste après quelques secondes (TREMOLIERES *et al.*, 1984) (figure 28)

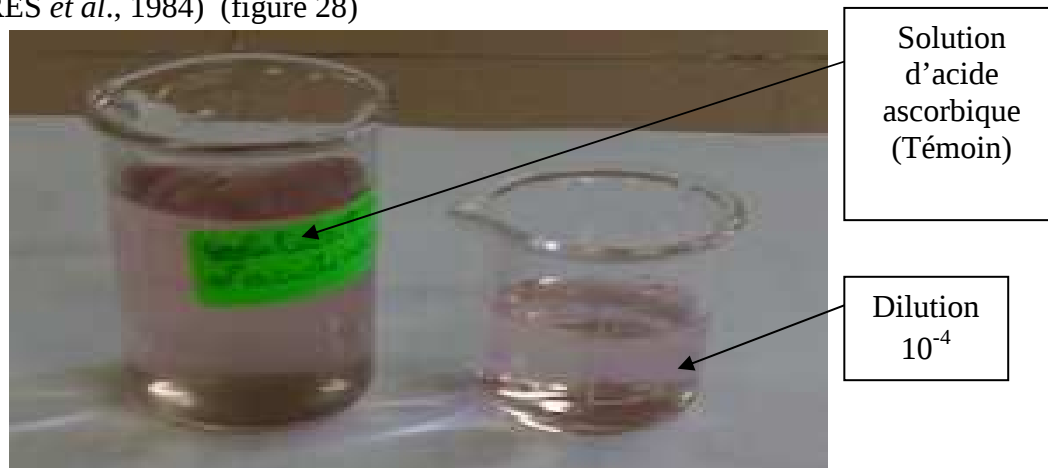


Figure 28 : Apparition de la couleur rose pale dans la solution d'acide ascorbique et les différentes dilutions à un volume donné du DCPIP.

La mesure du pH dans les jus est très importante. Car elle détermine la conservabilité et les caractéristiques organoleptiques des produits. Le pH mesuré pour le jus d'orange est de 4,88 cette valeur est plus élevée par rapport au jus de citron avec un pH de 3,63. Le pH de ce dernier est plus faible par rapport aux jus commercialisés, qui ont révélé les valeurs suivantes : 4,59 pour Vita-jus, 3,86 pour Rouïba, Ramy 4,51 et Light avec une valeur de 4,33(tableau VII).

Le jus de citron présente une teneur en vitamine C de 860 mg/l, cette valeur est élevée par rapport celle du jus d'orange qui est de 116 mg/l. Cela signifie que cette vitamine est mieux conservée en milieu acide (pH bas) ces résultats sont compatibles avec ceux de TREMOLIERES *et al* (1984), qui ont établis que plus un aliment est acide, plus la Vit C est préservée de l'oxydation et mieux elle s'y conserve. Ces jus n'ayant subi aucun traitement technologique ni addition d'un agent conservateur, ont été réfrigéré juste après leur extraction, car leur DLC est limité (BETON et BROCHRD ,1993 ; VERLING, 2003). Selon BOURGEOIS (2003) la teneur en vitamine varie au sein de la même espèce selon le degré de maturité du fruit et le milieu ambiant.

La composition intrinsèque des jus commercialisés est plus complexe par rapport à celle des jus frais. Vita-jus présente une teneur de 348 mg/l qui est la plus élevée par rapport aux autres jus commercialisés Ramy, light et Rouïba ont révélé des teneurs qui sont de 118, 121 et 96 mg/l respectivement. La variation de la quantité en vitamine C peut être liée aux plusieurs types d'adjonction de cette dernière. Soit par la restauration (compensation), l'enrichissement (E300 et ses dérivés) et la préservation.

La perte en Vit C est liée à la perméabilité de l'emballage vis-à-vis de l'oxygène et la lumière (KANAN *et al.*, 1992). Donc la nature de l'emballage est très importante pour les jus de fruit. À température ambiante, la pénétration de 1 mg d'oxygène correspond à la perte de

11mg de la Vit C d'un jus. BOURGEOIS (2003) a noté qu'une perte en cette vitamine dans un jus d'orange maintenue à 20°C et conditionné dans deux types d'emballages en verre avec une perte de 21% et 30% pour le jus emballer avec Brick pack. KLIMCZAK *et al* (2007) ont indiqué que l'augmentation de la température par 10°C cause une diminution importante de la vitamine C, ils ont aussi constaté une diminution de 21% (18°C), 31% (28°C) et 81% (38°C) de l'acide ascorbique dans un jus d'orange après stockage à une durée de six mois.

Tableau VII : Mesure de pH et la teneur en vitamine C de différent jus frais et commercialisés

Type du jus Echantillons	Jus frais		Jus commercialisés			
	Jus de citron	Jus d'orange	Ramy	Light	Rouïba	Vita-jus
pH mesuré	3,63	4,88	4,51	4,33	3,86	4,59
Teneur en Vit C mg /L	860	116	118	121	96	348

3. 1. 2. Indice d'acide

L'indice d'acide est un indicateur qui permet d'évaluer la qualité de l'huile et d'évaluer sont altération, consécutive à de mauvais traitements ou à une mauvaise conservation (WOLFF, 1991).

L'huile d'olive est une huile qui est riche en acide gras saturés avec 14% et 81% d'acide gras insaturés (acide oléique) (CHARLES et DEN, 1997). Dans notre étude l'indice d'acide de cette huile utilisée a été de 42,39 mg KOH/g de corps gras (tableau VIII). Ce résultat peut être expliqué par la longue durée de stockage (cette huile est stockée pendant 06 ans), son exposition à l'air et à la lumière provoque des réactions d'auto oxydation (KONDRATOWICZ et OSTASZ, 2000), cette quantité est expliqué aussi par la dégradation des acides gras insaturés (acide oléique et linoléique) et à la production de composés secondaires d'oxydation dont certains ont été prouvés nuisibles à la santé (aldéhydes et cétones.. etc.)(CHIMI, 2006). D'après BOSCOU (1996) des facteurs affectant défavorablement la qualité d'une huile d'olive peuvent être présents même aux premières étapes, par exemple, pendant la formation d'acide gras dans le fruit. Des anomalies pendant le processus de la biosynthèse, des activités microbiennes et des processus d'extraction (raffinage) sont toutes liées à la formation de l'huile à une acidité élevée (MEFTAH *et al.*, 2014). Cependant, un niveau élevé d'acidité peut être également attribué à l'état de maturité avancé du fruit. D'ailleurs DUGO *et al* (2004) ont montré que la récolte précoce produit des huiles dont l'acidité est inférieure à 1%.

L'huile de Soja est une huile qui est riche en acides gras poly-insaturés 58%, dont 50 à 60% d'acide linoléique et 20 à 30% d'acide oléique et 5 à 9% d'acide linoléique. Elle présente un indice d'acide relativement élevé qui est de 17,45 mg KOH/g de corps gras. Il convient toutefois de relever que les valeurs relativement fortes de l'indice d'acide peuvent

être attribuées au fait que les huiles ont été conservées pendant plus de six mois au froid (ALMECK *et al.*, 2008).

Par contre l'huile de colza (qui est riche en acide gras poly-insaturés avec 33%, 60% d'acide oléique et 7% d'acides saturés), présente un indice d'acide qui est de 1,79 mg KOH/g.

Les corps gras élaborés, le beurre de vache nature, Smen et la margarine LABELLE, présentent des indices d'acide les plus faibles qui sont de 1,79 ; 1,12 ; 2,693 ; 2,693 mg KOH/g respectivement. Ces derniers sont riches en acides gras saturés et restent peut oxydés (PRIOR, 2003). Cependant, une meilleure matière grasse c'est la moins acide et celle qui contient moins d'acides gras saturés (par rapport à leurs effets indésirables sur la santé).

3. 1. 3. Indice d'iode

L'indice d'iode permet de renseigner sur le degré d'insaturation globale des huiles. La margarine LABELLE présente un indice d'iode le plus élevé qui est de 50,196 g d'I/100g. Cette margarine elle est produite à base de saturation (pour améliorer la stabilité face à l'oxydation) des acides gras insaturés des huiles végétales de soja et de tournesol par le processus d'hydrogénation. En effet, l'ajout des atomes d'hydrogène sur les doubles liaisons se fait plus ou moins rapidement sur les acides gras insaturés. Ainsi à la fin de l'étape d'hydrogénation, certains ne sont que partiellement hydrogénés. Ce sont les acides gras trans.

Smen aussi présente un indice d'iode qui est de 29,7 g d'I/100g. Cela peut être dû au processus décrit précédemment.

Le beurre de vache nature présente un indice d'iode égal à 3,29. Vu que les corps gras d'origine animale sont caractérisés par leur richesse en acide gras saturés.

La principale différence de l'huile de soja qui présente un indice d'iode qui est de 44,14 g d'I/100g par rapport aux autres huiles végétales, c'est qu'elle se situe au niveau de la forme d'insaturation et de la présence d'acide linoléique (C18 :3) en quantité appréciable. Cet acide gras étant très sensible à l'oxydation, il conviendrait d'éviter au maximum le contact de l'huile avec l'oxygène de l'air (PLATON, 1988). L'huile de colza avec un indice d'iode qui est de 37,50 g d'I/100g et enfin l'huile d'olive qui présente un indice d'iode relativement plus faible qui est de 2,67, cela peut être expliqué par la forte acidité de cette huile, et par l'hydrolyse des triglycérides.

L'indice d'iode de ces échantillons diminue au cours de la conservation. Cette diminution est probablement due à une oxydation (CRAPISTE *et al.*, 1999) ou à une décomposition progressive des acides gras insaturés.

Tableau VIII : Comparaison entre différentes matières grasses, d'origine animale et végétale.

corps gras / paramètre	Huile d'olive	Huile de soja	Huile de colza	Margarine labelle	Beurre De vache	Smen
Indice d'acide mg KOH/g corps gras	42,37	17,45	1,79	1,12	2,693	2.693
Indice d'iode g d'I/100g corps gras	2,67	44,14	37,50	50,196	3,29	29,7

3. 1. 4. Teneur en glucide

Le dinitrosalicylique, qui en milieu alcalin et à chaud réagit avec les sucres réducteurs pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique, avec un virage de couleur de jaune-orange au rouge (figure 29). Ensuite la teneur en sucre est déterminée après établissement de la courbe d'étalon (figure 30).

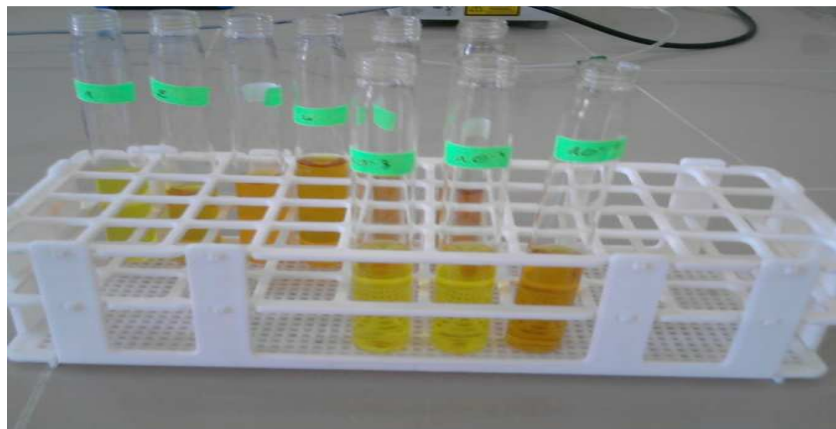


Figure 29: Dosage des sucres réducteurs par le dinitrosalicylique et coloration de la gamme.

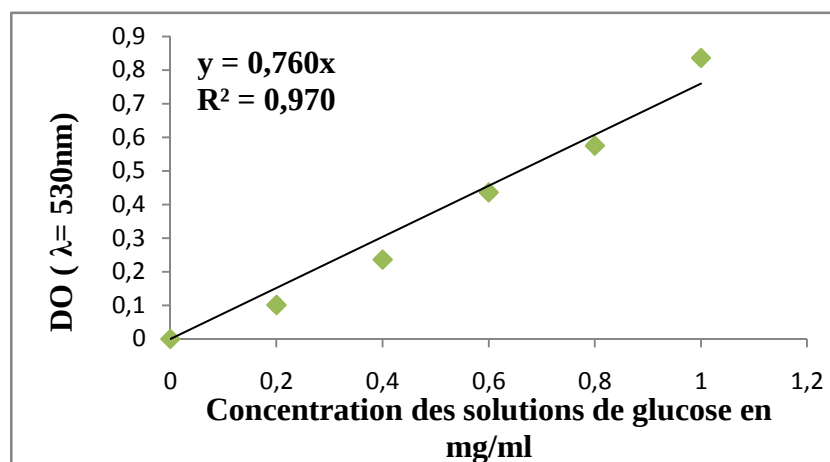


Figure 30: Courbe étalon pour le de dosage des glucides par la méthode utilisant l'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS), représentant les densités optiques en fonction des concentrations en glucide dans le jus Ramy.

La teneur en sucres réducteurs est représentée par le fructose et le glucose. Au regard de se tableau IX, nous constatons que les différents jus présentent des concentrations variables en sucres réducteurs. Le jus Ramy a révélé la concentration la plus élevée qui est de 14 g/l, cela signifie que ce jus contient de sucre ajouté. Par contre le jus Rouïba avec une quantité de 6,13 g/l.

Le jus d'orange est un jus fabriqué à partir d'un seul type de matière première, sans addition d'autre jus, de sucre et de conservateurs. Et pour cela a révélé la concentration la plus

faible qui est de 4,97 g/l. Le jus light est un jus qui doit être légèrement sucré pour des objectif diététique, il contient donc moins de calories que les autre jus. Mais le résultat obtenu a révélé comme même une certaines concentration de 9,13 g/l. C'est grâce aux édulcorants présents dans le jus (LAHTEENMAKI et TUORILA, 1997).

La qualité d'un jus de fruits dépend en premier lieu de la qualité de la matière première, car certaines variétés sont aptes a données de bons jus, donc la maturité doit être suffisante (CLAUDIAN, 1980 ; CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H, 1986). En effet lors de la maturité des fruits le taux de sucres augmentent (MOUFIDA et MARZOUK, 2003).

Les résultats obtenus ne répandent pas aux normes AFNOR (1986) indiquées pour la concentration des jus en sucres réducteurs, elles doivent être comprises dans l'intervalle 40-100 g/l.

Tableau IX : Concentration en glucides des différents jus (g/l)

type de jus	Jus d'orange	Ramy	Rouïba	Light
teneur en glucides (g/l)	nature 4,97	14	6,13	9,13

3. 1. 5. Teneur en protéines

La méthode de dosage spectrophotométrique de LOWRY *et al* (1951) à été utilisée pour estimer la teneur en protéines de différentes fractions isolées. C'est la méthode la plus adaptée au cas des protéines du lait (NAKAI et CHI, 1970 ; GEOFFREY et LUCAS, 1983), l'ajout du sel de cuivre en milieu alcalin et du réactif de Folin-Ciocalteu donne une coloration bleue foncée (figure 31).

Ainsi que La concentration des protéines est déterminée en se référant à une courbe étalon établie (figure 32) en employant de l'albumine sérique bovine (BSA) (GUILLOU *et al.*, 1986). Cette courbe montre une zone de linéarité sur l'intervalle de concentrations en protéines allant de 0 à 100 mg/L.



Figure 31 : Coloration de différentes solutions de la gamme étalon par le réactif Folin Ciocalteu.

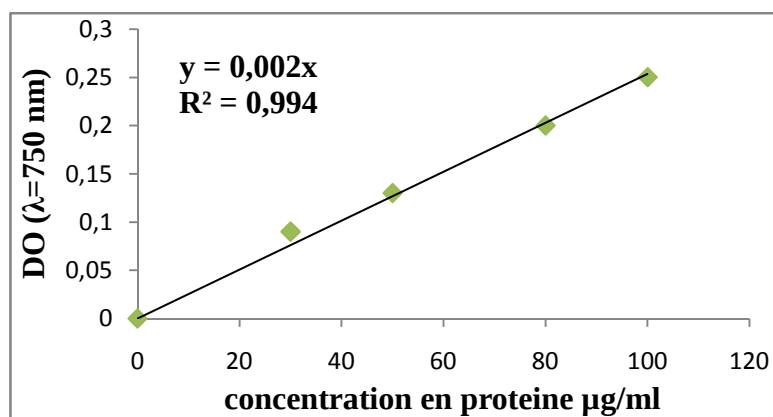


Figure 32: La courbe étalon représentant les densités optiques en fonction des teneurs en protéines dans lactosérum du lait de vache $DO=f([BSA])$.

Les protéines du lactosérum constituent la fraction soluble des protéines du lait. THAPON (2005) définit ces dernières comme protéines d'excellente valeur nutritionnelle car elles sont riches en lysine tryptophane et acides aminés soufrés (CHEFTEL et LORIENT, 1982).

La valeur obtenue concernant les protéines du lactosérum de vache est de l'ordre de 5 g/l (tableau X) ce qui est compatible avec ceux trouvé par ROLLERI *et al* (1956) qui varie entre 5,5 - 6,5 g/l, soit la même valeur obtenue par BELHADI (2010) qui est de 5.5 g/l. Comparant aux résultat obtenue par SENOSSI (2011) ; le lait de vache contient une faible concentration en protéines sérique par rapport au lait de chamelle qui varie entre 6,67-8,42 g/l. Ce taux important en protéines sériques du lait camelin et d'un grand intérêt du fait que c'est dans cette fraction qu'on retrouve des facteurs antibactériens particulièrement puissants (lysozyme, lactoferrine et les immunoglobulines) (ELAGAMY, 2000).

La concentration en protéines du lait de vache obtenue est de 35g/l, cette concentration est élevé par rapport a celle obtenue par BELHADI (2010) et par ALAIS *et al* (2008) qui est de 34 g/l, et cette dernière est proche de celle trouvé par ROUDJ *et al* (2005) 34,5 g/l. Selon REMEUF *et al* (1985) la quantité en protéines trouvée est de 32g/l.

Comparativement au lait de vache, le lait de chèvre est moins riche en protéines sa teneur est de 20,85 g/l d'après KARAM (1994). Mais présente une composition nutritionnelle comparable à celle du lait de vache (RENNER *et al.*, 1996). Les deux laits présentent la même aptitude de coagulation sous l'effet de la flore lactique endogène ou exogène (AFNOR, 1986).

La quantité en protéine du lait écrémé de vache est de 34,5g/l, elle est proche de celle obtenue pour le lait de vache (35g/l), la différence c'est d'environ 0,5 g/l, ces protéines sont transportées lors de l'écémage du lait dans la membrane des globules gras (MGG).

Par contre la teneur en protéine du lactosérum et du jus lacté est relativement très faible, 5 et 3,15 g/l respectivement

Tableau X : la concentration en protéines totales des échantillons par LOWRY.

Type d'échantillon	Lactosérum du lait de vache	Lait écrémé	Jus lacté	Lait de vache
Teneur en protéines (g/l)	5	34,5	3,15	35

3. 2 Séparation des sucres par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est une technique d'analyse physique de séparation, basée sur les différences de polarités des substances à analyser.

L'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque sucre se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile (tableau XI) et la distance parcouru par le solvant est de 14 cm (Figure 33).

Après la migration et la révélation par le réactif de Molisch qui présente un pouvoir réducteur des sucres, apparition d'une trainée pour le D(+) Cellobiose qui peut être du l'hydrolyse incomplète de certains polysaccharides, vu que ce sucre a révélé le même rapport frontale avec celui du glucose (0,48 cm), et apparition des taches rougeâtres violacées pour les standards (glucose, galactose et fructose). La migration des substances dépend de l'affinité du solvant (polaire, apolaire) avec la phase stationnaire et la phase mobile. Elle dépend également de la concentration de l'espèce.

Vu que le cellobiose est un produit de la dégradation de la cellulose. Il est très proche du maltose dont il diffère uniquement par la configuration du carbone anomérique du premier glucose en position β . Il est formé de 2 glucoses reliés par une liaison de type (β 1 $\rightarrow$ 4) (SEUNG *et al.*, 2013).

Tableau XI : Les distances parcourues par les différents monosaccharides par CCM.

Le sucre	fructose	glucose	galactose	D(+) Cellobiose
La longueur (cm)	7	6,8	6,4	6,8
Rapport frontale (cm)	0,5	0,48	0,45	0,48

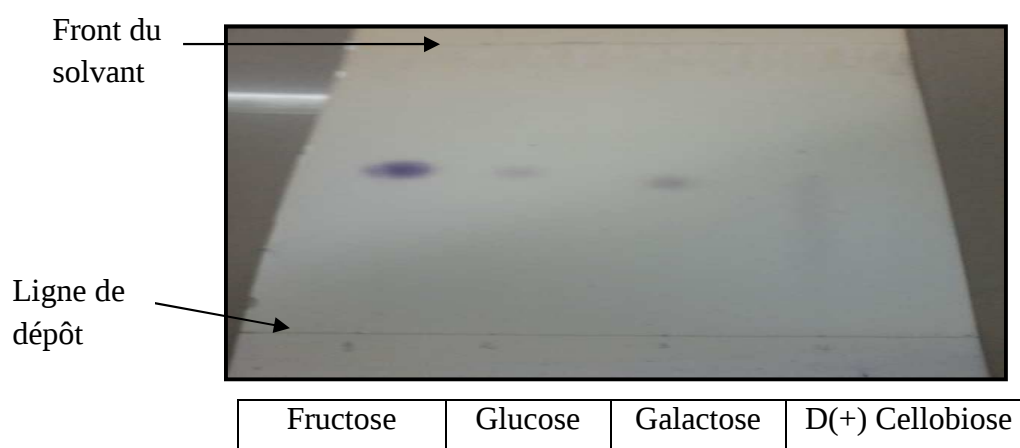


Figure 33 : Migration des sucres (fructose, glucose, galactose) et le de D(+) Cellobiose par chromatographie sur couche mince.

3. 3 Purification des protéines par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200

Les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et purification des protéines. Nous avons essayé de fractionner les protéines sériques du lait de vache et celles de brebis.

Le profile chromatographique obtenu pour le fractionnement des protéines sériques du lait de vache est donné par la (figure 34). Il se caractérise par l'apparition de quatre zones d'absorption, d'intensité et de volume différent, correspondants respectivement aux fractions éluées : F1, F2, F3, F4 (13, 19, 50, 52 ml).

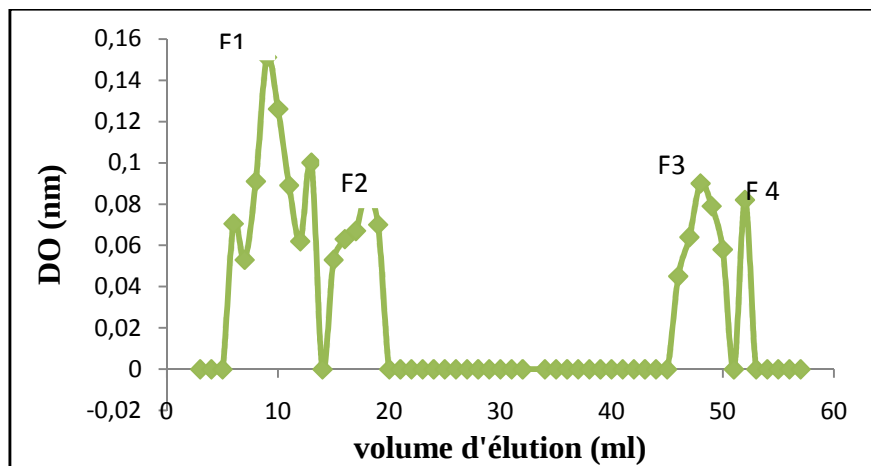


Figure 34 : Chromatogramme des PS du lait de vache sur séphacryle S200; F1,F2,F3,F4 : les fractions éluées respectivement à :13, 19, 50, 52 ml d'éluant.

Le profile chromatographique de fractionnement des protéines seriques lyophilisé du lait de brebis (figure 35), est caractérisé par l'apparition de quatre fractions dont F'1, F'2, F'3, F'4, corespnd aux volumes d'élution suivantes : 7, 35, 39, 47 ml.

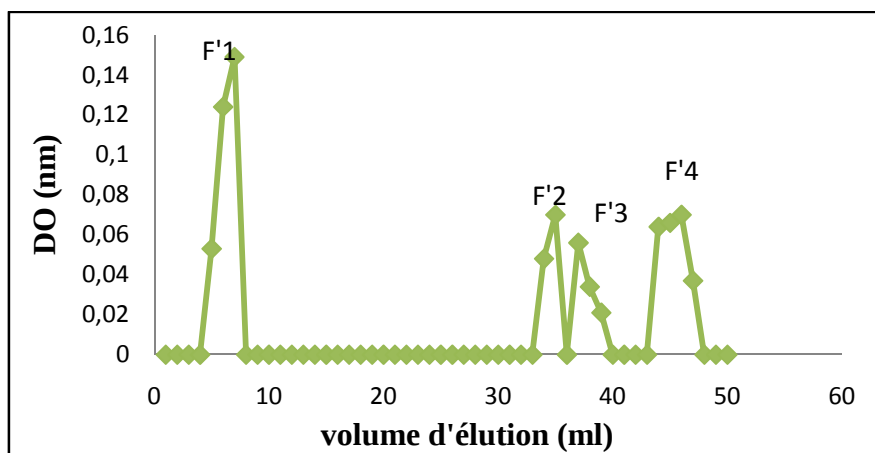


Figure 35: Chromatogramme des PS lyophilisés de brebis sur S200 ;F'1,F'2,F'3,F'4 :les fractions éluées respectivement à : 7, 35, 39, 47ml d'éluant.

3.4 Isolement et caractérisation électrophorétique des protéines sériques de vache et de brebis en 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.

Le profil électrophorétique motionner dans la figure 36 et 37, a révélé la migration de différentes fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur Séphacryl S200 à savoir : les protéines sériques bovines (F1, F2, F3, F4) et les protéines sérique lyophilisés du lait de brebis (F'1, F'2, F'3, F'4).

Les protéines sériques du lait bovin dans ces conditions, migrent en cinq bandes en fonction de leur mobilité électrophorétique aux immunoglobulines, le sérum albumine bovine, l'alpha-lactalbumine et en fin de migration la bêta-lactoglobuline (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 a 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 (bovins, ovins et caprins). 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).

Le lait contient également un certain nombre de protéines présentant des propriétés biologiques variées (enzymes, régulateurs de la prise alimentaire, molécules bio-actives...etc.) Cité par BOUDJNAH (2012).

La fraction F1 a révélé les mêmes bandes que les protéines standards, qui sont similaire à ceux obtenue par SI AHMED (2009), et bien le même résultat obtenue par SENOUSSE (2012). Concernant les protéines sériques du lait de vache. Les bandes obtenues sont plus intenses que celles obtenus par MEDJOUR (2014).

Par contre la F2 n'a révélé que la migration de trois bandes très fines et beaucoup moins intense la BSA, α -La et la β -Lg, pour ce qui concerne les fractions F3, F4 sont récupérées lors de l'élution mais le profile électrophorétique n'a donné aucune bande cela est due, peut être à la faible concentration en protéines ou bien on à récupérer des impuretés.

La fraction F'1 récupérer pour les protéines lyophilisées du lait de brebis a révélé la migration de trois bandes très fines et moins intense celle de l'Ig, BSA et enfin l' α -La, bien que la bande de la β -Lg n'est pas apparue. D'après le résultat trouvé par YABRIR (2014), les niveaux de migration de la BSA et l' α -La sont identiques. Par contre la bande de la β -Lg se trouve entre ces deux protéines. car cette protéine contient deux sous unités, la β -Lg A et β -Lg B (AMIGO *et al.*, 1992 ; MAYER, 2005 ; PESIC *et al.*, 2011).

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) ; OCHIRKHUYAG *et al* (1998).

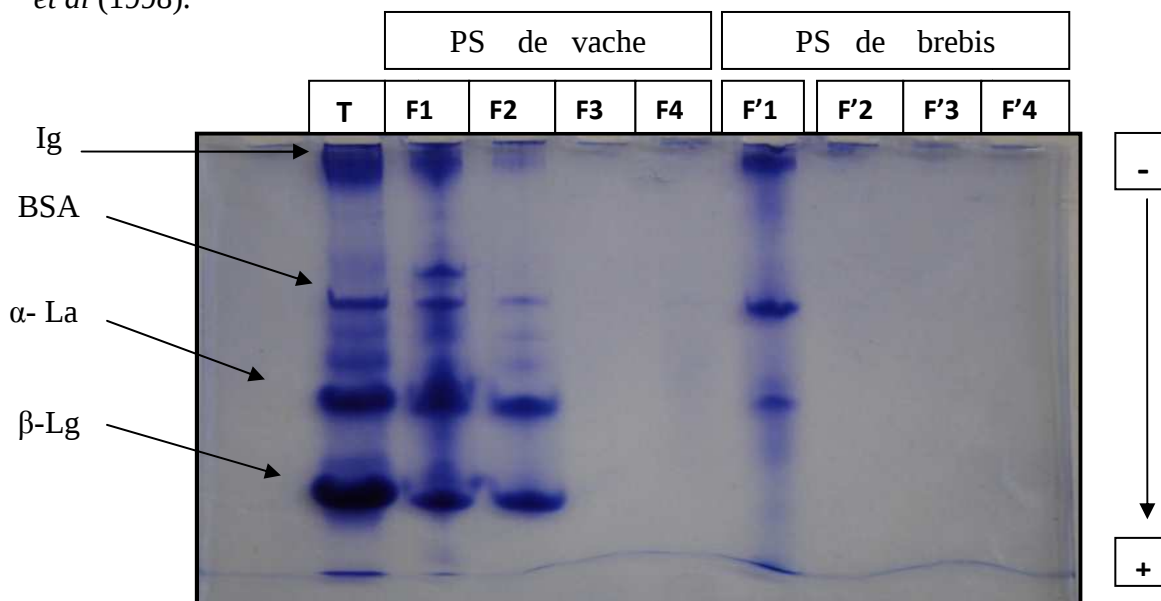


Figure 36 : Electrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native); gel à T= 12 %, C=2,7 %.

3.5 Isolement et caractérisation électrophorétique des caséines lyophilisées de vache en 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.

Pour le profil obtenu ci-dessous(figure 35) concernant la migration des fragments obtenue par l'hydrolyse enzymatique catalysé par la papaine, les hydrolysats H1, H2, H3, H4, H5 correspondants respectivement au t=0, t=15min, t=30min, t=60min, t=120min. donc normalement plus l'hydrolyse est avancé dans le temps, plus on va avoir des bandes plus fine qui présente des polypeptides et peptides ou bien des acides aminés.

D'après les résultats trouvés par ALIAS (1984) la migration des caséines du lait de vache est représentés par l'ordre suivant l' α S1, l' α S 2, la β et κ - caséine dont les masses moléculaires sont généralement de 23,60 ; 25,25 ; 24,00 et 19,00 kDa respectivement. Ce qui n'est pas identifiable dans ce cas, cela peut être expliqué par deux phénomènes. L'un étant la forte association des caséines ce qui leur confère ainsi un poids moléculaire plus élevé que leur poids moléculaire réel ceci se traduit par une faible migration en PAGE-SDS. L'autre, est la faible fixation du SDS aux caséines, cette caractéristique est aussi remarquée pour les caséines d'autre espèces (BOUMAHROU *et al.*, 2009).

On comparant les caséines du lait de chamelle à celles du lait de vache, ces dernières présentes une mobilité supérieur ce qui est du au degré de phosphorylation de ces protéines (MOHAMED et LARSSON, 1991).

Pour les travaux menés par YABRIR (2014) concernant la migration des caséines de brebis sur PAGE-SDS, migrent selon l'ordre suivant : κ -CN, β -CN, α S1-CN, α S2-CN. En se basant sur les résultats obtenus par VARIO *et al* (2008). Il à été difficile pour CALAVIA et BURGOS (1998) d'avoir une bonne séparation des caséines en PAGE-SDS plus particulièrement la CN- κ .

Pour le cas des caséines caprines PARK (2001) ; VAN HEKKEN *et al* (2004) ; TOMOTAKE *et al* (2006) décrivent comme suit l'ordre croissant d'apparition en PAGE-SDS : la caséine α S2, la caséine α S1, la bêta caséine et la caséine kappa.

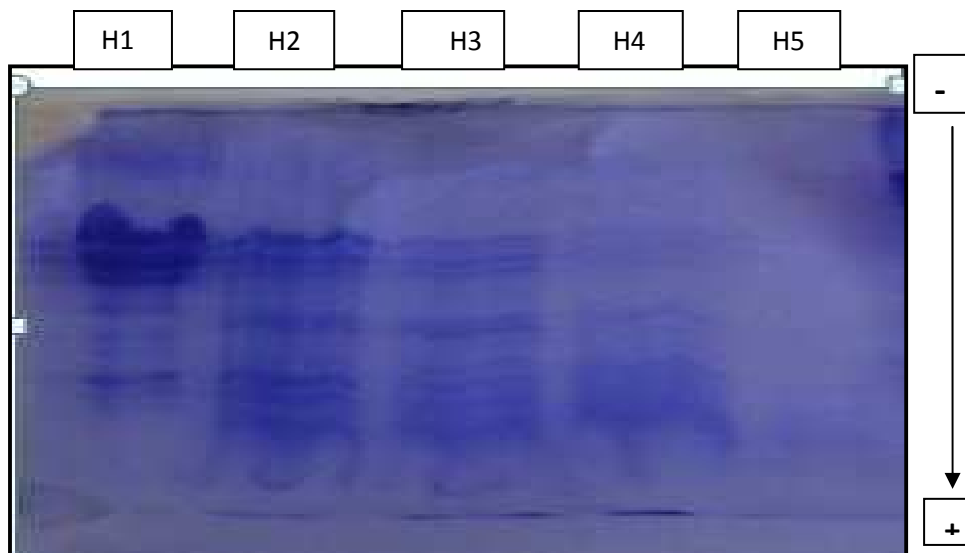


Figure 37 : Eléctrophorégramme des hydrolysats (caséines lyophilisées du lait de vache) en PAGE-SDS ; Gel de concentration (T=4% et C=2,7%), gel de séparation (T=17% et C=2,7%).

Conclusion

En continuité des travaux réalisés au LABAB sur la caractérisation et l'identification des entités protéiques. Nous avons élargi notre étude sur d'autres types d'échantillons.

D'après les résultats obtenus, les paramètres physico-chimiques des jus de fruits, varient d'un jus à un autre selon la composition chimique des fruits. L'analyse des résultats, montre que la teneur en vitamine C est plus abondante dans les échantillons des jus de citron et Vita-jus avec 860; 348 mg/l respectivement.

Plusieurs facteurs peuvent influencer la teneur en acide ascorbique tels que la variété du fruit, le stade de maturation, les conditions de culture, le temps, la température de stockage, la méthode d'extraction et de dosage.

L'acidité de l'huile d'olive (42,37 mg KOH/g) est très élevée par rapport aux autres huiles. Cette valeur élevée est peut être due à l'exposition de l'huile aux risques externes comme les intempéries, l'oxygène de l'air et les micro-organismes qui peuvent être responsables de la détérioration de la qualité de l'huile ainsi que la lumière qui subissent rapidement des réactions d'hydrolyse et d'oxydation. Par contre la margarine LABELLE se caractérise par une valeur élevée en indice d'iode (50,196 d'I/100 g de corps gras). Par rapport aux autres huiles qui présentent des valeurs extrêmement faibles.

D'après l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'indice d'acide des huiles est en fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l'huile, l'origine géographique, le climat, la culture, la méthode d'extraction et d'analyse, le raffinage et le stockage.

Le glucose et le fructose sont les principaux sucres réducteurs présents dans les jus. On retrouve aussi dans ce groupe chimique des polymères à haut poids moléculaire, comme les pectines et les complexes de cellulose et hemicellulose, qui constituent une partie de la pulpe et les fibres du jus (KLAVONS *et al.*, 1991; RANGANA, *et al.*, 1983). Les glucides sont importants car ils sont responsables de la saveur du jus et influent sur sa consistance et ses propriétés rhéologiques. De plus, ils ont une influence remarquable sur les constituants volatiles du jus (AHMED *et al.* 1978). La quantité la plus élevée en sucres réducteurs obtenue pour les différents jus est celle du jus Ramy avec 14 g/l.

Concernant la quantité en protéines déterminées par la méthode de LOWRY (1951) de différents échantillons analysés. Le lait de vache et le lait écrémé présentent les concentrations les plus élevées 35 ; 34, 5 g/l, respectivement.

La chromatographie sur couche mince est une méthode qui permet un contrôle aisé et rapide de la pureté des molécules, dans cette analyse le réactif utilisé pour la révélation est celui de Molisch qui présente un pouvoir réducteur des sucres.

Le fractionnement des protéines sériques du lait de vache et de brebis par la chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S200, a révélé l'isolement de 4 pics pour les deux lait de vache et de brebis et qui correspond aux fractions F1, F2, F3, F4 ; F'1, F'2, F'3, F'4 respectivement.

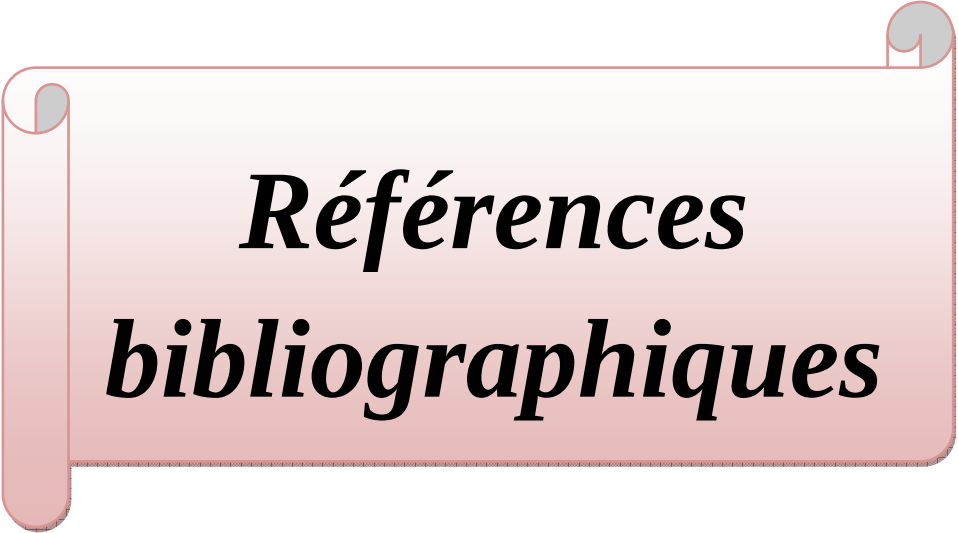
Le lait est constitué de deux fractions protéiques principales, une fraction soluble (protéines lactosériques) et la fraction colloïdale (les caséines), ces fractions représentant 20% et 80% des protéines du lait des ruminants, respectivement.

Les protéines du lactosérum se composent généralement de β -lactoglobuline, d' α -lactalbumine, d'immunoglobulines, de sérum albumine, lactoferrine et de lysozyme.

La fraction caséique correspond à environ 81% de la composition moyenne totale en protéines d'un litre du lait qui varie d'une espèce à une autre. Elle est composée principalement des caséines α S1, α S2, β et κ . Ces caséines forment dans le lait des agrégats très stables appelés micelles. Ce sont des particules d'un diamètre moyen de 100 nm et stabilisées par des ions Ca^{2+} . Ces petites particules donnent sa couleur blanche opaque au lait.

L'analyse de la fraction caséinique et sérique est faite dans plusieurs conditions de séparation électrophorétique en PAGE-native et page-SDS.

Pour la PAGE-native à révéler une migration des protéines sériques : l'Ig , BSA, α -La et la β -Lg, avec une grande similitude entre les deux lait, de vache et celui de brebis, toute fois les essais en page-SDS pour l'identification des caséines demeurent perfectible et des optimisations complémentaires sont à réaliser pour avoir des profils discriminant et assez résolutifs. Comme la séparation de ces dernières est encore à l'heure actuelle une question difficile et controversée et en pleine évolution. Ce dernier point marque les limites de l'application de la PAGE-SDS à la détermination du poids moléculaires des caséines. Pour cela nous suggérons le recours à d'autres méthodes telles la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse.



Références bibliographiques

-AFNOR. (1986). Contrôle de qualité des produits laitiers. 3^{ème} Ed.

-AHMED E. M., DENNISON R. A., DOUGHERTY R. H., SHAW, P. E. (1978). Effect of non Volatile Orange Juice Components, Acid, Sugar, and Pectin on the Flavor Threshold of d-limonène in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **26 (1)**, 192-194.

-ALAIS C. (1984). Les bactéries lactiques. Les levains. In : *Science du lait. Principe des techniques laits*. SEPAIC., Paris, 345 -388.

-ALAIS C., LINDEN G. et MICLO L. (2008). Biochimie alimentaire, Dunod, 6^{ème} Ed., 86-88, Paris.

-ALMECK K., ABOUBAKAR D., CLERGE T. et MICHEL P. (2008). Evolution de quelques paramètres de qualité physico-chimique de l'huile de la pulpe des fruits de *Canarium schweinfurthii* Engl. au cours du stockage, *Journal. Biological. Chemical. Science*. **2(3)**, 249-257.

-AMIGO L., RAMOS M., CALHAU L. and BARBOSA M. (1992). Comparison of electrophoresis, isoelectric focusing. And immunodiffusion in determinations of cow' and goats' milk in Serrada Estrela cheese. *Le Lait*, **72**, 95-101.

-AUDIGIE C. L., FIGARELLA J. and ZOWSTATIN F. (1978). Manipulation d'Analyses Biochimiques, Doin., Paris.

-AUTRAN J. C. (1991). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. 3^{ème} Ed. *Technique et Document*, Paris, 115-137.

-BAPTIST J. B. (2012). Diagnostic de gestation chez la vache dosage des protéines associées à la gestation dans le sang et lait par méthode ELISA ; Doctorat ; université CLAUDE –BERNARD ; campus vétérinaire ; LYON ; Paris.

-BAZEN C., VIEILLARD V., ASTER A. et PAUL M. (2010). Contrôle rapide et fiable des préparations de chimiothérapies à base d'anticorps monoclonaux à l'aide de l'automate Multispec. *Analyse Pharmaceutique Française*, **3 (68)**, 163-171.

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

-BELHADI N. (2010). Effet des facteurs d'élevage sur la production et la qualité du lait de vache en régions montagneuses, mémoire magister en agronomie, université mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

- **BIANCHI D. P. GOLINI R, ET BORTOLO. P. (1996).** Cesti Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports Enzymology. *Microbiology Technology*. **18**, 592–596.

-**BIETZ J. A. (1974).** Micro Kjeldahl analysis by an improved automated ammonia determination following manual digestion. *Analyse Chimique*, **46**, 1617-1618.

-**BLETZINGER B. et JENA A. G (2011).** Détermination rapide et fiable des protéines totales dans les produits pharmaceutiques, *La Gazette Du Laboratoire*, **166**, 16.

-**BONMATI M. B., CECCANTI P., NANNIPIERI J. et VALERO. (2009).** Characterization of humus–protease complexes extracted from soil. *Soil Biology Biochemistry*, **41**, 1199-1209.

-**BOSCOU D. (1996).** Olive Oil Composition. In Olive Oil: Chemistry and Technology.

-**BOSS J. O., BLANC B. et PLATTNER E. (1976).** Le dosage des protéines du lait et ces principaux dérivés : méthodes et appareillage titrés de la littérature parue entre 1964 et 1974. *Travaux Chimiques Alimentation et Hygiène*, **67**, 226-261.

-**BOUDJENAH-HAROUN S. (2012).** Aptitudes à la transformation du lait de chamelle en produits dérivés : effet des enzymes coagulantes extraites de caillettes de dromadaires. Thèse de doctorat en Sciences Biologiques Université Mouloud Mammeri De Tizi Ouzou.

-**BOUMAHROU N., ANDREI S., MIRANDA G., HENRY C., PANTHEIR J J., MARTIN P. and BELLIER S. (2009).** The major protein fraction of mouse milk revisited using proven proteomic tools. *Journal of Physiology and Pharmacology*. **60(3)**, 113-118.

-**BOURGEOIS C. (2003).** Les vitamines dans les industries agro-alimentaires. technique et documentation, Paris.

-**BRADFORD M. M (1976).** Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein dye binding. *Analytical Biochemical*, **72**, 248-254.

-**BRIERE M., JOUVE B. et PAULIN R. (1970).** Mesures en radioactivité. Paris, Herman.

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

-**BROWN P.B., CLARKR M., LABARRED J. et ROSS S.R. (1983).** A comparison of methods for protein analysis of human milk. *Fed Protein*, **42**, 13-30.

- CALAVIA M. C. and BURGOS J. (1998).** Ovine κ -casein in milk from Lacha Spanish sheep: Heterogeneity and total content. *International Dairy Journal*, **8**, 779-786
- CANTISANI A., NAPOLITANO L., GIUFFRIDA M. G. and CONTI A. (1990).** Direct identification and characterization of llama Whey proteins by microsequencing after western blotting. *Journal of Biochemical and Biophysical*, **21**, 227-236.
- CARBALLDO A., HASSOUD T. A. (1978).** La spectrophotometra ultravioleta en la determinacion de la proteinas en limentos. *Analyse Biologique*, **2(30)**, 187-193.
- CASTEX M. C., MONLUIS et M. P RONAND. (1968).** Spectrophotométrie d'absorption a deux faisceau pour l'ultra-violet lointain. *Laboratoire de Hautes Pressions*, **3**, 175.
- CHEFTEL J. C. et LORIENT D. (1982).** Aspect technologique : les propriétés fonctionnelles des protéines laitières et leur amélioration. *Lait*, **62**, 435-483.
- CESCO W. S., RENELLA G., LANDI L. et NANNIPIERI P. (2012).** Plant-borne flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. *Biological Fertilisation Soil*, **48**, 123-149.
- CHARLES A. et DEN G. (1997).** Abrégé de Biochimie alimentaire. 4^{ème} Ed., Masson, Paris, 225-232.
- CHEFTEL J. C. et CHEFTEL H. (1986).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et Documentation, Lavoisier, Paris II, 47 – 52.
- CHIMI H. (2006).** Technologie d'extraction de l'huile d'olive et gestion d'olive et gestion de sa qualité. *Transfert de Technologie en Agriculture*, **3**, 20-31.
- CLAUDIAN J. (1986).** Boisson. In Les aliments « Manuel d'alimentation humaines ». E.S.F, Paris II, 399 – 400.
- COCKS L. V. et VAN REDE D. (1966).** Laboratory handbook for oil and fat analyses. Academic Press. New-York.
- CRAPISTE G. H., BREVEDAN M., CARELLI A. A. (1999).** Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76(12)**, 1437 – 1443.
- DELATTRE C. (2005).** Stratégie d'obtention d'oligosaccharides anioniques par dégradation enzymatique de glucuronanes. Thèse de doctorat de l'université de Picardie jules verne, Valois Santerre, 5-10.
- DELOBETTE H., FRIRY A., PLEWNIK et EGLY J. M. (1991).** Le dosage des protéines. *Le Technoscope de Biofutur*, **41**, 3-11.

-DESCHREIDER A. et MEAUX R. (1973). Utilisation d'une électrode ionique pour le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl. *Analytical Methods*, **2**, 442-445.

-DEVEAUX M. F. (1989). Interprétation de spectres de réflexion dans l'infrarouge proche et moyen de produits agro-alimentaires par des méthodes d'analyse multidimensionnelle. Doctorat ; Nantes, France.

-DJOM J. H. (1993). Suivi de la palmisterie du processus de fabrication de l'huile de palme et contrôle de qualité des produits finis. Mémoire de fin d'étude. ENSIAAAC .Université de N'Gaoundéré, **52**.

-DUGO G., TURCO V. L., POMLLICINO D., MAVROGENI E. et PIPITONE F. (2004). Caractérisation d'huiles d'olive vierges sicillienne. *Olivae*, **101**, 44-52.

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

-ELAGAMY E. I. (2000). Effect of heat treatment on camel milk proteins with respect to antimicrobial factors: a comparison with cow's and buffalo milk proteins. *Food Chemistry*, **68**, 227-232.

-ENGVALL E. et PERLMAN P. (1971). ELISA « Enzyme-linked immunosorbent assay. Quantitative assay of immunoglobulin G». *Immunochemical*, **8**, 871-874.

-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. *Journal of Nutrition*, **22**, 1-8.

-FAO/OMS. (1973). Facteurs adoptés par l'organisation mondiale de la santé sur les besoins en protéines.

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

-FIGARELLA J. (1996). Manipulation d'analyses biochimiques. Biosciences et techniques, DOIN, Paris.

-GEOFFERY J. H. and LUCAS A. (1983). Nitrogen content of human milk: limitation of spectrophotometry for the determination of protein in milk. *Journal of Dairy Research*, **50**, 269-274.

-GILLESPIE W., FARRELL R. E., WALLEY A. R. S. et LEINWEBER P. (2011). Glomalin-related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biology Biochemistry*, **43**, 766–777.

-GLLESPIE W., FARRELL R.E., WALLEY F.L., ROSS A.R.S., LEINWEBER P., ECKHARDT K.U., REGIER T.Z., BLYTH R I. et GLOMALIN R. (2011). Related soil protein contains non-mycorrhizal-related heat-stable proteins, lipids and humic materials. *Soil Biology Biochemistry.*, **43**,766–777.

-GODEN B. et LOISEL W. (1994). Guide Pratiques d'analyse des industries des Céréales Technique et Documentation .2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

-GRAPPIN R. et JEUNET.R. (1976). Essais de l'appareil Milko Scan 300 utilisé pour le dosage en série de la matière grasse et des protéines du lait. *Lait*, **56**, 498-520

-GRIVILOVIE M. J., MAGINOT C., SCHAWARTZ G. et WALLACH J. (1996). Manipulations d'analyse biochimiques. Biosciences et techniques. 3^{ème} Ed., Doin Paris.

-GRYSON C., WALRAND S., GUILLET C., BOIRE Y. (2008). Protéines Fonctionnelles : la nouvelle « ELDORADO ». Des aliments santé, *.Médecine des Maladies Métaboliques*, **2(04)**, 355-362.

-GUILLOU H., PELISSIER J. P. et GRAPPIN R. (1984). Méthode de dosage des protéines du lait de vache. *Lait*, **66** ,143-175.

-GUILLOU H., PELISSIER J. P. et R. GRAPPIN R. (1976), Méthodes de' dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, **66**, 143-175.

-HATTCHOUEL J. M., DAUNIZEAU A. et GILLLLERY P. (2009). Annales de contrôle national des analyses médicales. *AFSSAPS*, **147**, 20-26.

-HENRY R. J. (1974). Clinical Chemistry: Principles and Technique, Harper and Row, Hagerstown. *Mrylnd*, **15**, 411-413.

-HERMAN B., WANG X. F., WODNICKI P., PERISAMY A., MAHAJAN N., BERRY G. et GORDON G. (1999). Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. Applied Fluorescence in Chemistry. *Biology and Medicinal*, **42**, 127-140.

-HILLIER R. M. (1976). The quantitative measurement of whey protéins using polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Dairy Rescherch*, **43**, 259-265.

-HIRSCHFELD T. (1979). Quantitative FT-IR: a detailed look at the problems involved. In: *Fourier transform infrared spectroscopy. Applications to chemical systems* (Ferraro JR, Basik L J, eds). *Academic Press, New York*, **61**,193-242.

-HUINDSON G. J. and LUCAS A. (1983). Nitrogen content of human milk: limitations of spectro-photometry for the determination of the determination of protein in milk. *Journal of Dairy Rescherch*, **50**, 269-274.

-HUMBERT G. and ALAIS C. (1979). The milk proteinase system. *Journal of Dairy Rescherch*, **46**, 559-571.

-IMAI N. (1986). Standardizing assays of total protein in urine. *Clinical Chemical*, **32**,19-95.

- KANAN A., KANE D. et LABUSA T. P. (1988). Times and temperature effect of stability of microccan prossed orange juice during stocage. *Journal Food Science*, **53(5)**,1470-1473.

-KARAM N. E. et KARAM H. (1994). Génétique et Santé de l'enfant. *Alimentation*, Paris, 257-264.

-KEMNITZ K., PFEIFER L. et AINBUND M. R. (1997). "Detector for multichannel spectroscopy and fluorescence lifetime imaging on the picosecond timescale". *Nuclear Istruments and Method in Physalis Rescherch*, **387**, 86-87.

-KICHEWASSAY S. (1968). L'étude des champs électromagnétiques singuliers dans des espaces et dans le tenseurs .*Journal Math Physique*, 266-503.

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

-KLAVONS J. A., BENNET R. D. and VANNIER S. H. (1991). Nature of the Protein Constituent of Commercial Orange Juice Cloud. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, **39(9)**, 1545-1548.

-KLIMICZAK I., MALICKA M., SZLACHTA M. and GLISZCZYNSKA-SWIGLO A. (2007). Effet of storage on the content of polyphénols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Compound and Analytical*, **20**, 313-322.

-KONDRATOWICZ E. P. et OSTASZ L. (2000). Quality changes in edible oils at high temperature kinetic analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 276 - 281.

-KOOLMAN J. et ROHM K. H. (1997). Atlas de poche de biochimie. Médecine sciences, 1^{ère} Ed., Flammarion, Paris.

-KRAMME D. G., GRIFFENR H., HARTFORDC G. et CORRADOJ A. (1973). Automated Kjeldahl Nitrogen determination.A comprehensive method for aqueous dispersible samples. *Analytic Chemical*, **45**, 405-408.

-KRESS M., MEIER T., STEINER R., DOLP F., ERDMANN R., ORTMANN U. et RUCK A. (2003). "Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes". *Journal Biomedical Optics*, **8**(1), 26-32.

-KUMAR D., SAVITRI., THAKUR N., VERMA R. et BHALLA T.C. (2008). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal Microbiology*, **3**(12), 661–672

-LAEMMLI U. K. et FAVER H. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4 I DNA packaging events. *Journal of Molecular Biology*, **78**, 575-599.

-LAGACHERIE M. et RICORDEAU O. (2005). Prédiction de la structure secondaire des protéines. *Pest Management Science*, **56**, 784-788.

-LAHTENMAKI L. et TUORILA H. (1997). Item –by-use appropriateness of drinks varying in sweetener and fat content. *Food Quality and Preference*, **8**(4), 85-90.

-LANG P., YEOW K., NICHOLS A. et SCHEER A. (2006). "Cellular imaging in drug discovery". *Biology Cellular*, **4**, 343-356.

-LATTORE J. L., PARISI J. M., TISEINTZKY S. G. et DEPETRIS A. (1984). Description générale des techniques biochimiques permettant d'identifier les virus des animaux et d'établir leurs caractéristiques. *Revue Science Epizoic*, **3**(2), 271-289.

-LEACH S. J. et SCHERAGA H. A. (1980). Effect of light scattering on ultraviolet difference spectra. *Journal of American Chemistry Society*, **82**, 4790–4792.

-LIN R. H. and RANDOLPH H. E. (1978). Determination of nitrogen in milk by microdiffusion of Kjeldahl digests. *Journal of Dairy Science*, **61**, 870-873.

-LINDEN G. (1986). Monograph on pasteurized milk. *Biochemical Aspect*, **200**, 17-21.

-LINDEN G. (1991). Technique dialyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Science & technique, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.

-LIUSOT P. (1983). Biochimie Générale et Médicale. Vitamines et coenzymes. Lipides et dérivés isopréniques. 2^{ème} Ed., Paris.

-LORINET D., CLOSS B. et COURTHAUDON J. L. (1991). Connaissances nouvelles sur les propriétés fonctionnelles des protéines du lait et les dérivés. *Lait*, **71**, 141-171.

-LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L and RANDALL R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, **193**, 265-275.

- MAKAMURA H. and PISANO J. J. (1976).** Sensitive fluorometric assay for proteins: use of fluorosamine and membrane filters. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, **172**, 102-105
- MAMBAP S. R. (1989).** Etude chimique et valorisation des graines de soja. Mémoire de fin d'études. ENS université de Yaoundé. *International Journal of Food Science and Technology*, **34**, 265–274.
- MATI A. (1992).** Les protéases a 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.
- MAYER H. K. (2005).** Milk species identification in cheese varieties using electrophoretic. Chromatographic and PCR techniques. *International Dairy Journal*. **15**, 595-604.
- MCSWEENEY P. L. H. and FOX P. F. (1997).** Chemical methods for characterization of proteolysis in chesses during ripening. *Lait* , **77**, 41-76.
- MEDJOUR A. (2014).** Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (Camelus dromedarius) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semi-intensif) ; mémoire de magister ; Université Mohamed khider de Biskra ; Algérie.
- MEDSI ., DOMON B. et AEBERSOLD R. (2006).** Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. **312**, 212-217.
- MEFTAH H., EL LOUALI M., LATRACHE H., HAMADI F. H., HANINE H. et ZAHIR H. (2014).** Comparaison des caractéristiques physicochimiques des huiles d'olives issus de différentes zones de la région Tadla Azilal (Maroc). *Journal of Materials and Environmental Science*, **5 (2)**, 641-646
- MENDHAM., DENNY., BARNES. et THOMAS. (2006).** Analyse chimique quantitative de vogel. De Boeck, 6^{ème} Ed., Paris.
- MOUFIDA S. et MERZOUK B. (2003).** Biochemical caracterisation of blood orange,sweet orange ,lemon, bergamot and bitter orange. *Phytology chimestry*, **62**, 1282-1283.
- MOHAMED M. A. and RAZNIKIEWICZ M. L. (1991).** Heat treatment of camel milk. Effects upon casein fraction. *Milchwissenschaft*, **46**, 562-565.

- MULTON J. L. (1991). Technique dialyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Science & technique, 4^{ème} Ed., Lavoisier, Paris.
- NAKAI S. and CHI A. L. (1970). Spectrophotometric determination of protein and fat in milk simultaneously. *Journal of Dairy Science*.
- NANNIPIERI P. ELDOR P. (2009). The chemical and functional characterization of soil N and its biotic components. *Soil Biology Biochemistry*, **41**, 2357–2369
- NDEYE A. K. (2001). Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales artisanales consommées aux SENEGAL. Thèse pour l'obtention du grade de docteur en pharmacie.
- OCHIRKHUYAG B., CHOBERT J. M., DALGALARRONDO M., CHOISET Y. and HAERTLE T. (1998). Characterization of whey proteins from Mongolian yak, khainak, and bacterian camel. *Journal Food Chemistry*, **22**, 105-124.
- OWEN T. (2000). Fondamentaux de la spectrophotométrie UV-visible, Coryright *aligen technologies, Allemagne*, (06) ,5980-1397.
- PARK W. Y. (2001). Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. *Journal of Dairy Science*, **84**, 84-92.
- PATERSON G. L. (1979). Quantification method of Lowry. *Analyse Biochimique*, **31**,100-200.
- PELMONT J. (1995). Enzymes: catalyseurs du monde vivant. *Presse Universitaire de Grenoble*. 621(7), 652–654.
- PESIC M. B., BARAC M. B., VRVIC M. M., RISTIC M. M., MACEJ O. D., STANOJEVIC S. P. and KOSTIC A. Z. (2011). The distributions of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/ bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal*, **21**, 831-838.
- PIERCE J. et SUELTER C. H. (1977). *Analyse Biochimique*, **81**, 478-480.
- PIERE J. (2003). Séparation et analyse des biomolécules. Technologie supérieure, 3^{ème} Ed., ellipses, Paris.
- PLATON J. F. (1988). Raffinage de l'huile de soja. *American Soybean Association*, **19**, 3-30.

-PRADYT P. (2004). Dean's Analytical Chemistry Handbook (mcgraw-Hill Handbooks). 2^{ème} Ed., 11-14, ISBN.

-PRIOR E. (2003). Usage des corps gras alimentaires dans les différents secteurs de la technologie alimentaire. In Lipides et corps gras alimentaires. Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Technique & Documentation, 470, Paris, France.

-RAMET J. P. (1990). Technologie comparée de l'affinage des différents types de fromages ; in « le fromage ». Technique et documentation, Lavoisier, Paris.

-RANGANA S., GOVINDARAJAN V. J., RAMANA K. V. R. (1983). Citrus Fruits – Varieties. Part II: Chemistry, Technology and Quality Evaluation. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, **18 (4)**, 313-386.

-RAO M. B., TANKSALE A. M., GHATGE M. S., DESHPANDE V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Molecular Biology Review*, **62**, 597–635.

-REMELEUF F. et LENOIR J. (1985). Caractéristiques physicochimiques du lait de chèvre. *Recherche Laitière Française*, **446**, 32-40.

-REMILE M. A., ARMENISE E., WHITE R. P. et HIRCH P. R. (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology And Biochemical*, **67**, 166-173.

-RENNER E., OMERGLU S. et LEBENSEM Z. (1972). *International Formation Church*, **69**, 149-338.

-RENNER E., SCHAUEN A. et DRATHEN M. (1996). Nutrition composition tables of milk and dairy products. *Giessen Germany*, 198-210.

-REXROARD P. R. and CATHY R. D. (1976). Pollution reduces Kjeldahl method for crud protein . *Journal of Analyses Chemistry*, **59**, 1213-1217.

-RIBADEAU D. B. et GRAPPIN R. (1989). Milk protien analysis, *Lait*, **69**, 357-416.

-ROITT I., BROSTOFF J. et MALE D. (1985). Immunologie fondamentale et appliquée. 2^{ème} Ed., Paris.

- RICHTERICH R. (1965). Clincher chemise (theory and praxis) Kargcr Vrlg. *Basel-New York*, 207-209

-ROLLERI G. D., LARSON B. L. et TOUCHBERRY R. W. (1956). Protein production in the bovine breed and individual variation in the specific protein constituents of milk. *Journal of Dairy Science*, **39**, 1683-1689.

-ROUESSAC A. et ROUESSAC F. (1992). Analyse chimique : méthode et techniques instrumentale moderne. Science sup, 6^{ème} Ed., Dunod, Paris.

-ROSSENEU M., VINAIMONT N. et BELPAIRE F. (1981). Standardization for the quantification of plasma apo B. *Protein Analyses Biochemical*, **34(116)**, 204-210.

-ROUDJ S. BESSADAT A. et KARAM N. E. (2005). Caractérisations physicochimiques et analyse électrophorétique des protéines de lait de chèvre et de lait de vache de l'Ouest algérien; Laboratoire de Biologie des Microorganismes et Biotechnologie, Université d'Oran-Sénia, *Ruminants*, **(12)** ; 400 ; Oran; Algérie

-SANOGO T. T. (1988). Etude de l'activité des protéases dans un milieu complexe : Application du modèle caséine-papaine en milieu saline; Thèse de Doctorat en Biochimie Appliquée de l'université de Nancy I ;France.

-SAPAN C. V., LINDBLAD R. L. et PIERCE N. C. (1999). Colorimetric protein assay techniques, *Biotechnical Application Biochemical*, **29** ,99-108.

-SCRIBAN R. (1993). Biotechnologie. Technique et Documentation. 4^{ème} Ed., Lavoisier. Paris, **42**, 351-356.

-SEIB P. A. et TOLBERG B. M. (1982). Ascorbic acids :chemistry, metabolism, and uses, adv. *In Chimistry*, **9**, 200.

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

- SEUNG G. L., CHOI J. I., WONSANG K. and SEUNG S. J. (2013). Adsorption of β -d-glucose and cellobiose on kaolinite surfaces: density functional theory (dft) approach. *Applied Clay Science*, **71**, 73-81.

-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.

-SKOOG W. et HOLLER. (1997). Chimie analytique, 7^{ème} Ed., de Boeck, Paris.

-STEVENS L. (1992). Buffers and the détermination of protein concentration.

-**SWAMINATHAN K. and SUD K. C. (1976).** Rapid determination of total nitrogen in biological materials with chromic acid. *Analyses Biochimique*, **74**, 260-262.

-**SWEENEY R. A. and REXROAD P. R. (1987).** Comparison of LECO F.P228, “Nitrogen determinator” with AOAC copper catalyst Kjeldahl method for crude protein. *Journal Analyses chemical*, **70**, 1028-1030.

-**THAPON J. L. (2005).** Agrocampus-Rennes. Science et technologie du lait. **14 (77)**, France.

-**TOMOTAKE H., RYOKO O., MITSUAKI K., MASARU F., MASSAYUKI Y. and FUSAO O. (2006).** Comparison between Holstein cows and Japanese-saanen goat's milk in fatty acid composition. Lipid digestibility and protein profile. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **70 (11)**, 2771-2774.

-**TREMOLIERES J., SERVILLE Y. et JACQUOT R. (1984).** Manuel de l'alimentation humaine. 2, ESF.

-**URBAN W. C. (1971).** Modification of the Kjeldahl nitrogen determination method. *Analyses Chemical*, **43**, 300-301.

-**VAN HEKKEN DIANE L., TUNICK MICHAEL H. and PARK YOUNG W. (2004).** Rheological and photolytic properties of Monterey jack goat's milk cheese during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemical*, **52**, 5372-5377.

-**VARIO CAVALLI S., SILVA S. V., CIMINO C., MALCATA F. X. and PRIOLO N. (2008).** Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chemical*, **106**, 997-1003.

-**VESSIERES A., SALMAIN.M., PHILOMIN., JAOUEN G. (1992).** Carbonyl metallo immunoassay (CMIA) : une nouvelle méthode d'immunodosages non isotopique, *Immuno-analyse Biologie Spécialisé*, **31**, 9-17, Paris.

-**VIERLING E. (2003).** Aliments et boissons Tome II. Filière et produits, Doen. Paris.

-**VILOTTE S. L. and SOULIER S. (1992).** Isolation and characterization of the mouse alphas₂ encoding gene: interspecies comparison, tissue-and stage-specific expression. *Genetics*, **119**, 287- 292.

- **WALKER J. (1994).** The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Molecular Biological*, **32**, 5-8

-**WILGENBURG V. (1981).** Criticism of the use of Coomassie Brilliant Blue G-250 for determination of proteins. *Journal Clinical Chemical* , **19**, 301-304.

-**WILGENBURG V. (1981).** Criticism of the use of Coomassie Brilliant Blue G-250 for determination of proteins. *Journal Clinical Chemical*, **19**, 301-304.

-**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.

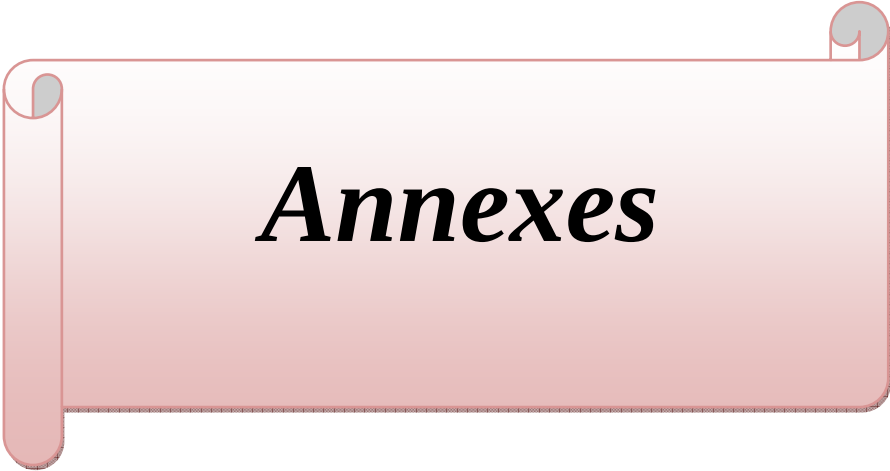
-**WOLFF J. P. (1968).** Manuel d'analyse des corps gras. Asonilay, Paris.

-**WOLFF J. P. (1991).** Analyse et dosage des lipides. In Techniques d'Analyse et de Contrôle dans les Industries Agro-alimentaires IV: Analyse des Constituants alimentaires, Technique et Documentation, 2^{ème} Ed., Lavoisier, Paris, France, 450.

-**YALOW R. S. et BERSON S. A. (1959).** Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods, *Nature*, **184**, 1648-1649.

-**YEBRIR B. (2014).** Etude de la qualité du lait de brebis collecté dans la région de Djelfa : effet des facteurs de production sur ces caractéristiques ; évolution au cours de l'entreposage réfrigéré ; aptitudes technologiques ; Thèse de Doctorat ; Tizi-Ouzou ; Algérie.

.



Annexes

Annexe 01 : Dosage de la vitamine C dans les jus

Protocole expérimental :

1/1 Préparation de la solution de 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) à 0,5g/l :

-dissoudre 0,5 g du 2,6 DCPIP, 0,2 g de bicarbonate de sodium dans 300 ml d'eau distillée chaude ;

-après refroidissement, compléter à 1 litre avec de l'eau distillé .Cette solution de couleur bleu servira pour le dosage de la vitamine C.

1/2 solution titrée d'acide ascorbique :

-dissoudre 20mg d'acide ascorbique pur dans 100ml d'eau distillée ;

-ajuster le volume à 1l, prendre 5ml de cette solution dans un bêcher (50ml) ;

-ajouter 1ml d'acide acétique glacial ;

-doser avec la solution colorante de DCPIP mis dans la burette jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante :

-prendre le volume V_1 du colorant nécessaire ayant réagit avec la solution d'acide ascorbique.

2/dosage de la vitamine C de jus nature de citron

- préparer une série de 4 tubes à essais 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ,

10^{-4} . Mettre 9 d'eau distillée ,1ml de jus frais ;

-titrage de la 4^{ème} dilution par le colorant jusqu'apparition d'une couleur rose pâle similaire à celle du témoin ;

-prendre le volume V_2

Etalonnage de la solution d'acide ascorbique :

L'étalonnage est réalisé à l'aide d'une solution étalon de concentration $C_1 = 0,2$ g/l, qui correspond au V_1

Expression des résultats

La teneur en vit C est mg/ml, est donnée par la relation suivante :

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

C_1 : concentration en acide ascorbique g/L de la solution étalon

C_2 : concentration en vitamine C.

V_1 : Volume de DCPIP lu sur la burette pour doser la solution d'acide ascorbique.

V_2 : Volume de DCPIP lu sur la burette pour doser le jus.

Annexe 02 : Détermination d'indice d'acidité

Solution à préparer : la potasse alcoolique KOH (la MM =56,11)

Pour 500ml d'eau distillée on pèse 2,80g de potasse (KOH)

Protocole expérimental

Peser 2,5g de matière grasse dans un erlenmeyer puis les dissoudre dans 5ml de l'éthanol (sert pour solubiliser les échantillons solides) titrage immédiatement avec la solution de potasse alcoolique (0,1N) (FIGARELLA , 1996) préparer précédemment ensuite ajouter 3 gouttes de phénolphthaléine jusqu'à apparition de la couleur rose pale persistante.

Expression des résultats

$I_a = m_1 / m_2$

$n \text{ KOH} = C_{\text{KOH}} \times V_{\text{KOH}}$

$m_2 =$ c'est la masse de potasse

m1 :c'est la masse de la matière grasse de beurre de vache.

Annexe 03 : Détermination d'indice d'iode.

Préparation de la solution : thiosulfate de sodium(0,02) ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la MM= 158g /mole.

Peser 3,16g de thiosulfate de sodium (0,02N) dissoudre dans 100ml d'ED.

Protocole expérimental

dans une burette, on introduit une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,02N)

-un tube témoin auquel on introduit 5ml de lugol et quelques gouttes d'empois d'amidon(le mélange est de couleur bleu) puis on titre avec le thiosulfate de sodium pour déterminer V1 ;

-un tube échantillon : on introduit un tube à essai 5ml du lugol, 0,5ml d'huile puis on chauffe pendant 5min suivi d'homogénéisation tout au long du chauffage. Après refroidissement on ajoute quelques gouttes d'empois d'amidon ensuite on titre avec la solution de thiosulfate goutte à goutte en agitant, jusqu'à décoloration on déterminant le volume V2.

Expression des résultats :

$N(\text{S}_2\text{O}_3^{2-}) = 2n(\text{I}_2)$, l'indice d'iode est calculé par l'équation suivante :

$I_i (\text{g}/100\text{g}) = (V_1 - V_2) \cdot C \cdot 12,69 / p$

V_0 : volume (ml) pour doser le témoin

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

C : c'est la concentration de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$

P : poids de la matière grasse.

Annexe 04 : Dosage des glucides

Protocole expérimental :

Solution à préparer :

1/ la solution de glucose à 1g /l.

1mg/1ml $\longrightarrow$ 0,1mg/ml de glucose.

Pesé 0,5g de glucose dissoudre dans 500ml d'ED.

2/la préparation des dilutions nécessaires pour notre jus Ramy, on a fait 3dilutions dans laquelle la première dilution on met 1ml du jus dans 9ml d'ED et à partir de ce tube on prélève 1ml dissoudre dans 9ml d'eau distillée et même pour le troisième tube.

Gamme étalon: Dosage des glucides dans le jus Ramy.

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

Méthode :

- mettre 1ml de la solution à doser ou des différentes dilutions dans un tube à essai ;
- ajouter 2ml du réactif (3,5DNS) ;
- traiter tous les tubes de la même façon (la gamme et les dilutions) ;
- chauffer au bain-marie bouillant pendant 5min ;

- refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- laisser reposer pendant 15min à température ambiante ;
- lecture à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda = 530\text{nm}$ contre le blanc.

Les densités optiques correspondantes aux différentes concentrations de glucose :

N° de tube	01	02	03	04	05	06
$[C]_{\text{glucose}}$ mg/ml	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
DO (nm)	0	0,101	0,236	0,436	0,575	0,836

Annexe 05: dosage des protéines par la méthode de Lowry

Protocol expérimental

Préparation des solutions :

La Solution A : Na_2CO_3 anhydre 2 % dans NaOH, 0,1M. Dont la MM= 40g, donc on pèse 2g de Na_2CO_3 dans 0,4g de NaOH dissoudre dans 100ml d'eau distillée.

La Solution B : 2ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5%+2ml de tartrate de Na et K ,1%.

On pèse 0,5g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,1g de Na et K dissoudre dans 100ml d'ED.

La Solution C : on met dans un bécher 50ml de la solution A +1ml de la solution B, bien agiter.

Préparation des dilutions (10^{-1} et 10^{-2}) :

La première dilution en dissoudre 1ml de lactosérum dans 9ml d'eau distillée et à partir de ce tube on prélève 1ml dissoudre dans 9ml d'eau distillée.

Gamme étalon : Dosage des protéines du lactosérum:

N° de tube	01	02	03	04	05
$[C]\mu\text{g/ml}$	0	30	50	80	100
BSA (μl)	0	150	250	400	500
Eau distillée (μl)	500	350	250	100	0

Méthode :

A 0, 5ml de la solution d'échantillon contenant entre 25 et $100\mu\text{g}$ de protéines :

- ajouter 2 ,5ml de la solution C et mélanger ;
- laisser 5à 10min à température ambiante ;
- ajouter 250 μl de réactif Folin-Ciocalteu ;
- homogénéiser rapidement et mettre les tubes 30min à l'obscurité ;
- après 30min, homogénéiser les solutions rapidement et lire la DO dans le spectrophotomètre à $\lambda = 750\text{nm}$ contre le blanc.

Expression des résultats :

Une courbe étalon $\text{DO} = f(C)$ est tracée. Puis la concentration des protéines est déterminée.

Variation des densités optiques en fonction de la concentration en protéine

N°de tube	01	02	03	04	05
$[C]$ en protéines ($\mu\text{g/ml}$)	0	30	50	80	100
DO nm	0	0,09	0,13	0,20	0,25

Annexe 06 : Chromatographie sur couche mince (CCM)

Protocole expérimental

1. Préparation de la cuve

Préparer le mélange de solvants qui constituera l'éluant et migrent par capillarité sur la plaque, puis le verser dans la cuve à chromatographie afin d'obtenir une hauteur de liquide d'environ 1 cm. fermer la cuve afin d'éviter l'évaporation des solvants.

2. Préparation de la plaque

Le gel utilisé est celui de silice, il est très fragile. Éviter de la toucher avec les doigts. Tracer à environ 2 cm du bord inférieur de la plaque, un trait qui constitue la ligne de dépôt.

3. Préparation et dépôt des standards, échantillon :

*Les standards : prépare 3 tubes à essais, peser 10mg (0,01g) de [D(+)] glucose anhydride pur, (D-) fructose, galactose], dissoudre dans 10 ml d'ED.

*l'échantillon : préparé déjà précédemment (hydrolyse acide des sucres)

À l'aide d'une pointe fine, déposer les échantillons sur leurs marques respectives. La tache de dépôt ne doit pas dépasser 3 mm.(figure)

4. Éluion

Introduire la plaque verticalement dans la cuve : la ligne de dépôt doit être au-dessus du niveau de solvant .Le solvant contenu dans la cuve monte le long de la plaque : c'est l'étape d'éluion. Attendre que l'éluant arrive à environ 1 cm du haut de la plaque, puis retirer la plaque et repérer par un trait la hauteur maximale atteinte par l'éluant (c'est la ligne de front). Sécher la plaque.

5. Révélation du chromatogramme

On utilise pour cela le réactif de Molisch :

Pour 100ml :

0,25g d'alpha-Néptoli ,dissoudre dans 50ml d'éthanol,50ml d'acide sulfurique à 200%.Après migration et séchage de la plaque pulvérisée le réactif de Molisch et sécher et mettre dans l'étuve à 100°C Pendant 10min.

Pour le rappot frontale est calculé comme suit :

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

Annexe 07: Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

Protocole expérimental

-Préparation du Tampon Tris –HCL 0,02M, pH 8,4 : dont la masse molaire du Tris MM=121,14 mole, pour 0,02M peser 2,42g

-ajuster le volume à 1litre dans une fiole jaugée.

-Préparation de la colonne

La colonne à été préparé avec un grand soin pour assurer un compactage homogène du gel .environ 5g du gel de séphacryl S200 mis en contact du tampon Tris HCL 0,02M, pH8.4 puis coulé dans la colonne ;

-le remplissage s'effectue de façon régulière ,après équilibrage de cette dernière et stabilisation du débit 28ml/h.

-le volume mort $V_0=16.8\text{ml}$ est estimé par chromatographie du bleu dextrane à la concentration de 1mg/ml qui à une masse moléculaire élevée (10^5Da) de ce fait il n'est pas retenue dans le gel ;

-le volume nécessaire pour l'élution de cette molécule correspond au volume du liquide qui se trouve entre les interstices .Pour le premier échantillon qui est le lactosérum du lait de vache injecter tel quel 4ml contenant 29,2mg de protéines sériques ;

-par contre le deuxième échantillon est composé de protéines sériques de lait de brebis qui sont dissous à raison de 100mg/5ml de tampon de chromatographie les protéines sont éluées par passage du tampon dans la colonne avec un débit constant 28ml/h.

L'absorbance de l'éluant est contrôlée à 280nm,

-les fractions de 1 ml sont collectées et les DO correspondantes ont été enregistrées pour être contrôlée par électrophorèse ultérieurement.

Les densités optiques des fractions éluées par la chromatographie de perméation (protéines sériques de vache).

V En ml DO	0	7	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	46	47	48	49	50	51	52	53
	↓															↓							↓	
	5															45							92	
	0	0,053	0,0705	0,091	0,151	0,126	0,0891	0,062	0,100	0,00	0,053	0,063	0,067	0,087	0,070	0	0,046	0,064	0,090	0,079	0,058	0	0,082	0

Les densités optiques des fractions éluées par la chromatographie de perméation (protéines sériques lyophilisées de lait de chèvre)

v	0	5	6	7	8	34	35	36	37	38	39	40	44	45	47	48
en	↓				↓							↓				↓
m	4				33							43				67
DO	0	0,053	0,124	0,149	0	0,048	0,07	0	0,056	0,034	0,021	0	0,064	0,066	0,037	0

Annexe 08: Hydrolyse enzymatique des protéines du lait (caséines lyophilisées de vache) par la papaïne

Préparation des solutions

-solution : Tampon Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,4 : dont la MM=121,14.

-pour 50 ml d'eau distillée : peser 3,02g/l dissoudre dans 50ml d'ED, contrôler le pH 6, 4, ensuite ajuster dans une fiole jaugée de 25 ml.

-tampon d'échantillon :

Solution (C).....1ml

ED.....500µl

SDS (10%).....500µl

2-mercaptoéthanol50µl

Annexe 09: Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

Préparation des solutions

- Solution d'acrylamide

Acrylamide9g
Bisacrylamide0,25g
ED.....25ml

- Tampon de gel (B)

Tris.....2,285g
ED.....25ml
Ajuster à pH 8,9 avec de HCL 4N

- Tampon d'électrode

Tris0,12g
Glycine.....0,58g
ED.....200ml

- Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B).....100µl
ED.....700µl
Glycérol 50%.....200µl
Bleu de bromophénol.....une tête d'aiguille
Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 1ml de ce tampon.

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

Solution(A).....3,25ml
Solution (B).....5ml
ED.....1,68ml
Dégazer le mélange (max 2min)

TEMED.....10µl
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75µl
Couler et mettre le peigne immédiatement.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA ,25V

Annexe 10 : Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes, en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Solution d'acrylamide : comme celle préparer précédemment

- Tampon de gel de séparation

Tris4,625g
ED.....25ml
Ajuster à pH 8,8 avec de HCL 4N, ensuite jaugée dans une fiole de 25ml.

- ✓ Tampon de gel de concentration (solution C)

Tris1,5g
ED.....25ml
Ajuster à pH 6,8 avec de HCL 4N, ensuite jaugée dans une fiole de 25ml.

✓ Tampon d'électrode

Tris3g
Glycine.....14,4g
SDS.....0,5g
ED.....500ml

✓ Tampon d'échantillon (les hydrolysats récupérer par l'hydrolyse enzymatique des caséines du lait de vache par la papaïne)

Solution(C)1ml
ED.....500µl
SDS 10%.....500µl
2-mercaptoéthanol50µl

-dissoudre 1à2mg de protéine lyophilisées dans 800µl de ce tampon ;

-chauffage à 100°C pendant 4à5min puis refroidir dans un bain d'eau froide ;

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

✓ Solution persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium.....0,1g
ED (qsp)1ml

✓ Conduite de l'électrophorèse

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

Solution (A).....4.60ml
Solution(S).....2,51ml
ED.....2,73ml

dégazer pendant 2min max

SDS 10%.....100µl
TEMED.....13µl
Persulfate d'ammonium 10%.....75µl

Couler à environ 1,5 cm du sommet de la plaque de moindre hauteur.(figure)

2/préparation du gel de concentration : T=4,8% et C=2,7% :

Solution(A).....1,3ml
Solution(C).....2,5ml
ED5,8ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS à 10%.....100µl
TEMED.....25µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....40µl

-couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne.

-un échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5mn en présence d'un détergent anionique SDS (10% p/v) et un agent réducteur chargé de rompre les ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol (4% v/v). La plupart des polypeptides sont dans ce cas dissociés, ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques, les polypeptides seront chargés négativement donc ils seront séparés selon leur taille.

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl ;

Mise sous tension : 20mA, 25V.

Annexe 11: Révélation des bandes de migration électrophorétique : (SDS et native)

Solution de fixation

TCA.....12g
ED.....100ml

Solution de coloration

Bleu de commassie 0,2%(P/V).....0, 5g
Dissous dans une solution constituée du mélange
ED (1V).....100ml
Méthanol (1V).....100ml
TCA 2 % (P/V).....4g

Solution de décoloration

Acide acétique37,5ml
ED..... 321,5ml
Méthanol150ml