

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BAHLOULI Fadhila

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Production et Transformation Laitière

THÈME

**Extraction et caractérisation
électrophorétique des caéines du lait de
vache collecté durant les saisons d'été et
automne**

Soutenue publiquement le 18/09/2018

DEVANT LE JURY

Président	Mr. Nemmiche	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	Mme. Rechidi-sidhoum	MAA	U. Mostaganem
Examineurs	Mme. Henni	MAA	U. Mostaganem
Co-Encadreur:	Mr. Sassi	Dr	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales

Remerciement

Tout d'abord, je remercie Dieu, notre créateur de nos avoir donné la force, la Volonté

Et le courage afin d'accomplir ce modeste travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toutes ma reconnaissance et remerciements à

*Mon encadreur de mémoire **Mme, Rechidi Sidhoum**, qui a fait preuve d'une grande Patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Ses conseils, ses Orientations ainsi que son soutien moral et scientifique nous ont permis de mener à*

Terme ce travail. Son encadrement était des plus exemplaires.

*Je tiens également à remercier messieurs les membres de jury pour avoir accepté **Mr.***

***Nemniche** pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette mémoire.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude à **Mme, Henni** et à pour avoir faire de lecteur mon*

Mémoire, allé l'examiner et elle peuvent évaluer cette mémoire. Je mon remercie pour L'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour vos précieux conseils et Remarques.

*Je suis reconnaissante à ma Co-promoteur **Mr, Sassi** et je lui offre un grand respect*

Et l'appréciation, pour ses conseils, ces aides et ses dirigés du début à la fin de ce travail.

J'exprime aussi mon vif remerciement aux enseignants du département d'agronomie et

Biologie de L'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour leurs aides et Conseils scientifiques. C'est aussi un grand plaisir d'exprimer mes remerciements

Au Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales.

Enfin toutes mes reconnaissances sont adressées à tous ceux et celles qui m'ont aidé

Dans la réalisation de ce travail et soutenu dans les moments difficiles.

Que chacun(e) se retrouve à travers ces quelques lignes.

Fadhila

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A

Ma très chère mère

Qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager durant les années de mes études, elle a été toujours présente à mes cotés pour me consoler quand il fallait, T. FATMA, la source de tendresse et de la bonté par excellence, elle représente pour moi le symbole du dévouement qui n'a pas cessé de prier pour moi.

Maman, ta prière et ta bénédiction m'ont été un grand secours pour mener à bien mes études.

Que dieu vous protège

Mon très cher père

LAID pour ces conseils, son soutien, sa patience et son respect que j'ai toujours eu

Que dieu vous protège

Ma chère sœur Rabiaa

La lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur

Mon cher frère djaafar

Qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour lui.

Mes chères copines

Farida, Aicha, Alia, Asma, Nesrine

Résumé

L'objectif de l'étude est de cerner les aspects qualitatifs du lait de vache produit dans la région Ouest de l'Algérie. Les analyses effectuées sur le lait de mélange durant les saisons de l'été et d'automne présentent des taux de matières grasses différents entre les deux saisons ($34.07 \text{ g/l} \pm 0.74$ vs $32.88 \text{ g/l} \pm 0.84$) en dessous des valeurs rapportées par la littérature. Par contre ces laits ont des teneurs en protéines plus ou moins élevées par rapport aux laits produits en Algérie surtout en automne ($33.14 \text{ g/l} \pm 0.81$ vs $32.7 \text{ g/l} \pm 0.89$). Dans cette fraction les caséines présentent 80.6% des protéines totales en été et 78.93% en automne. L'analyse de la fraction caséinique dans des conditions de séparation électrophorétique a donné des profils ayant une grande similitude et une homogénéité de mobilité électrophorétique entre les différents échantillons des laits des deux saisons. Toutefois les analyses de PAGE urée ont démontré que le contenu en caséines principales varie dans les proportions suivantes : β caséine de 33.44% à 43.31% en été et de 37.45% à 43.65% en automne, α_1 caséine de 38.71% à 44.20% en été et de 39.14% à 43.74% en automne, α_2 caséine de 5.9% à 21.60% en été contre 5.18% à 13.86% en automne, enfin Kappa caséine de 7.58% à 9.65% en été contre seulement 5.22% à 11.42% en automne. Le rapport α caséine/ β caséine était meilleur en automne de l'ordre de 1.24 contre 1.14 en période estivale.

Mots clés : lait cru, caséines, analyse électrophorétique, Ouest Algérie, saison.

Abstract

The objective of the study is to identify the qualitative aspects of cow's milk produced in the western region of Algeria. Mixed milk analyzes during the summer and fall seasons show different fat levels between the two seasons ($34.07 \text{ g / l} \pm 0.74$ vs $32.88 \text{ g / l} \pm 0.84$) below the reported values. By literature. On the other hand, these milks have higher or lower protein contents compared to milks produced in Algeria, especially in autumn ($33.14 \text{ g / l} \pm 0.81$ vs $32.7 \text{ g / l} \pm 0.89$). In this fraction caseins present 80.6% of total proteins in summer and 78.93% in autumn. The analysis of the casein fraction under electrophoretic separation conditions gave profiles with a high similarity and homogeneity of electrophoretic mobility between the different samples of the milks of the two seasons. However PAGE urea analyzes demonstrated that the content of main caseins vary in the following proportions: β casein from 33.44% to 43.31% in summer and from 37.45% to 43.65% in autumn, α_1 casein from 38.71% to 44.20% in summer and from 39.14% to 43.74% in autumn, α_2 casein from 5.9% to 21.60% in summer against 5.18% to 13.86% in autumn, finally Kappa casein from 7.58% to 9.65% in summer versus only 5.22% to 11.42% in autumn. The ratio α casein / β casein was better in the autumn of the order of 1.24 against 1.14 in the summer period.

Key words: raw milk, casein, electrophoretic analysis, West Algeria, season.

تلخيص

الهدف من الدراسة هو تحديد الجوانب النوعية لحليب البقر المنتج في المنطقة الغربية من الجزائر. تظهر تحاليل الحليب المختلطة خلال فصلي الصيف والخريف مستويات مختلفة من الدهون بين الموسمين (34.07 غ/لتر \pm 0.74 مقابل 32.88 غ/لتر \pm 0.84) تحت القيم المسجلة من الأدب. من ناحية أخرى ، تحتوي هذه الأحماض على محتويات بروتينية أعلى أو أقل مقارنة بالألبان المنتجة في الجزائر ، خاصة في الخريف (33.14 غ/لتر \pm 0.81 مقابل 32.7 غ/لتر \pm 0.89). في هذه الكسور الكسولة تمثل 80.6 ٪ من مجموع البروتينات في الصيف و 78.93 ٪ في الخريف. أعطى تحليل جزء الكازين تحت ظروف الفصل الكهربائي منحنيات ذات تشابه كبير وتجانس للتنقل الكهربائي بين عينات مختلفة من الحليب في الموسمين. ومع ذلك ، أظهرت تحليلات PAGE urea أن محتوى الكازين الرئيسي يختلف في النسب التالية: β كازين من 33.44 ٪ إلى 43.31 ٪ في الصيف ومن 37.45 ٪ إلى 43.65 ٪ في الخريف ، α_1 كازين من 38.71 ٪ إلى 44.20 ٪ في الصيف. ومن 39.14 ٪ إلى 43.74 ٪ في الخريف ، كازين α_2 من 5.9 ٪ إلى 21.60 ٪ في فصل الصيف مقابل 5.18 ٪ إلى 13.86 ٪ في الخريف ، وأخيراً كازين الكابا من 7.58 ٪ إلى 9.65 ٪ في الصيف مقابل 5.22 ٪ إلى 11.42 ٪ في الخريف. كانت نسبة الكازين α_s / β أفضل في خريف الترتيب البالغ 1.24 مقابل 1.14 في فترة الصيف.

الكلمات المفتاحية: الحليب الخام ، الكازين ، التحليل الكهربائي ، غرب الجزائر ، الموسم.

Liste des figures

N°	Le titre	Page
01	Modèle schématique supposé d'une section de micelle de caséines	34
02	Structure primaire de la caséine κ -CN B-1P	38
03	Appareillage d'électrophorèse	54
04	Les étapes suivies pour la réalisation sur l'électrophorèse	58
05	composition moyenne de la teneur de différentes fractions de caséines durant deux saisons A (été) et B (automne)	64
06	Electrophorégramme des caséines du lait cru en PAGE urée	65

—

Liste des tableaux

N°	Le titre	page
01	Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physicochimiques, (g/100 g de matière grasse), source FAO, 1998	20
02	Distribution des principaux acides gras de la graisse du lait de vache (%) (FAO, 1998)	21
03	Composition moyenne et distribution des protéines du lait (FAO, 1998)	25
04	Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/L) (FAO, 1998)	28
05	Teneurs en oligo-éléments du lait de vache ($\mu\text{g/L}$) (FAO, 1998)	29
06	Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L) (FAO, 1998)	30
07	Composition moyenne d'une micelle de caséine	34
08	Matériels utilisé lors des analyses	53
09	Composition chimique moyenne des analyses durant les saisons d'été et d'automne	61
10	composition moyenne de la teneur de différentes fractions de caséines	63

Liste des abréviations

- °C : degré celsius
- µm : micromètre
- AA : acide aminé
- ADN : acide désoxyribonucléique
- ANC : Apports Nutritionnels conseillés
- ARN : acide ribonucléique
- C : Carbone
- Ca : calcium
- cm : centimètre
- CMP caséinomacropéptide
- EDTA : acide éthylène-diamine-tétra-acétique
- FAO : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the united nations)
- g : force de gravité
- g : gramme
- kg : kilogramme
- L : litre
- mEq : Milliéquivalent (exprimer les quantités d'électrolytes)
- mg : milligramme
- ml : millilitre
- ng : nano gramme
- NPN : la matière azotée non protéique
- pH : potentiel hydrogène
- TB : taux butyreux
- TP : taux protéique
- UHT : Upérisation à haute température
- UV : les ultraviolets

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....01

Partie bibliographique

Chapitre 01 : composition du lait

1. Définition du lait.....	18
2. Composition du lait.....	18
2.1.Les lipides.....	18
2.2.Variation de la teneur en matière grasse (variation du TB).....	22
2.2. Les glucides.....	22
2.3.Les matières azotées totales (MAT).....	23
2.3.1. Composition chimique et origine des matières azotées totales du lait.....	24
2.3.1.1. Caséines.....	25
2.3.1.2. Protéines solubles ou protéines du lactosérum.....	25
2.3.1.3. Azote non protéique.....	26
2.3.2. Variation de la teneur en matière protéique (TP).....	26
2.3.3. Intérêt nutritionnel.....	27
2.4. Les minéraux.....	28
2.5. Les oligo-éléments.....	28

2.6. Les vitamines.....	29
-------------------------	----

Chapitre 02 : les caséines

1. Les caséines.....	32
2. Description et composition physico-chimique de la micelle.....	33
2.1.Aspects et propriétés.....	33
2.1.1. La micelle.....	33
2.1.2. Propriétés des caséines.....	35
2.1.2.1.pHi et charge électrique.....	35
2.1.2.2.Propriétés associatives des caséines.....	35
2.2.Les caséines As.....	35
2.2.1. La caséine α S1.....	35
2.2.2. La caséine α S2.....	36
2.3.Les caséines β et γ	36
2.3.1. La caséine β	36
2.3.2. La caséine γ	36
2.4.La caséine k.....	36

Chapitre 03 : les méthodes de séparation

1. La centrifugation.....	40
1.1.Introduction.....	40
1.2.Définition.....	40
1.3.Principe.....	40
1.4.Matériel de centrifugation.....	41
1.5.Type de centrifugeuses.....	41
1.6.Types de centrifugation.....	42
1.6.1. La centrifugation différentielle.....	42
1.6.2. La centrifugation en gradient de densité.....	42
2. La chromatographie.....	43

2.1.Historique.....	43
2.2.Définition.....	43
2.3.Principe.....	43
2.4.Chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC).....	44
3. L'électrophorèse.....	44
3.1.Historique.....	44
3.2.Définition.....	45
3.3.Principe.....	45
3.4.Appareillage d'électrophorèse.....	46
3.5.Facteurs influençant la mobilité électrophorétique.....	46
3.5.1. Nature de la molécule.....	46
3.5.2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse.....	46
3.5.3. Support.....	47
3.5.4. Champ électrique.....	47
3.6.Types d'électrophorèse.....	47
3.6.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes.....	48
3.6.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes.....	48
3.6.3. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre).....	48
3.6.4. Electrophorèse de zones.....	48
3.6.4.1.Électrophorèse sur papier.....	49
3.6.4.2.Électrophorèse sur acétate de cellulose.....	49
3.6.4.3.Électrophorèse sur gel d'amidon.....	49
3.6.4.4.Électrophorèse sur gel d'agarose.....	50
3.6.4.5.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	50
3.6.5. Electrophorèse capillaire.....	50

Partie expérimentale

Chapitre 01 : matériel et méthodes

1. Région d'étude.....	53
2. Matériel.....	53
2.1.Appareillage.....	53
2.2.Autres matériel et produits.....	55
3. Méthodes.....	55

3.1. Provenance des échantillons.....	55
3.2. Analyses biochimiques.....	55
3.3. Analyses biochimique spécifiques.....	56
3.3.1. Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl.....	56
3.3.1.1. Principe.....	56
3.3.2. Dosage et détermination des différentes fractions azotées.....	56
3.3.3. Détermination de la teneur protéique.....	56
3.3.4. Isolement et extraction des caséines.....	56
3.3.4.1. Ecrémage du lait.....	56
3.3.4.2. Extraction des caséines du lait.....	56
3.3.5. Comportement électrophorétique.....	57
3.3.5.1. Conditions opératoires.....	59
3.3.5.2. Révélation des caséines par bleu de Coomassie.....	59
3.3.5.3. Quantification des bandes de caséines.....	59

Chapitre 02 : résultats et discussion

1. Evaluation de la qualité biochimique.....	61
1.1. Taux butyreux.....	61
1.2. Taux protéique.....	62
1.3. Taux de caséine.....	62
2. Isolement et comportement électrophorétiques des caséines du lait.....	63
2.1. Analyse d'urée PAGE.....	63
2.2. Quantification des fractions de caséines.....	66
Conclusion général.....	69

Référence

Annexe

Introduction

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec près de à 120 L/an/habitant (Kacimi El Hassani, 2013). Cet aliment occupe une place prépondérante dans la ration alimentaire des algériens et apporte la plus grande part de protéines d'origine animale (Senoussi, 2008). Le lait, de par sa composition, est un aliment très riche. Sa place dans les us et coutumes algériens est très forte puisqu'il constitue l'un des plus forts symboles de la pureté. Il est également proposé avec les dattes pour montrer l'hospitalité. Sur le plan alimentaire, il est à la base de nombreuses préparations culinaires traditionnelles très ancrées dans l'histoire (jben, klila, d'hen, l'ben, raïb,...).

Le lait est un produit indispensable à l'équilibre de l'alimentation humaine. Il contient de nombreux nutriments qui fortifient notre organisme : protéines, glucides, lipides, sels minéraux, vitamines et oligo-éléments. Le lait fut de tous temps, un symbole de fertilité, de richesse et d'abondance. Il représente un milieu biologique fortement altérable par voie microbienne en raison de sa forte teneur en eau, de son pH voisin de la neutralité et de sa richesse en composants biodégradables (lactose, protéines et lipides) (Huyghebaert, 2006).

Les protéines du lait se divisent en 2 grandes catégories, d'une part les caséines précipitables à pH 4,6 formant la trame protéique du fromage et d'autre part, les protéines sériques solubles que l'on retrouve dans le lactosérum.

Le rendement de transformation du lait en fromage dépend du taux protéique et de la part des caséines dans la fraction protéique du lait. Le taux protéique varie selon trois grandes catégories de facteurs : génétique, physiologique et alimentaire.

En Algérie le rendement fromager n'est pas stable et change d'une époque à une autre et, même d'une région à une autre. Pour cela, l'objectif de notre travail est double, d'une part, l'extraction des caséines à partir de lait de vache de la région Ouest de l'Algérien et d'autre part, la caractérisation électrophorétique des caséines dans le but de comparer le profil de ces caséines durant les saisons de l'été et de l'automne.

1. Définition du lait :

C'est en 1909 que le congrès international de la répression des fraudes a défini ainsi le lait : « le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum » (Larpent *et al.* 1997).

Le lait sans indication de l'espèce animale de provenance correspond au lait de vache (Larpent *et al.*, 1997).

Le lait apparaît comme un liquide opaque, blanc mat, plus au moins jaunâtre selon sa teneur en B-carotènes et en matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable (Cniel, 2006).

2. Composition du lait :

Lait est un mélange complexe constitué à 90% d'eau et qui comprend :

- une solution vraie contenant les sucres, les protéines solubles, les minéraux et les vitamines hydrosolubles
- une solution colloïdale contenant les protéines, en particulier les caséines
- une émulsion de matières grasses dans l'eau

La densité du lait est de 1,030 à 1,034 g/ml.

Le pH du lait est proche de la neutralité : 6,6 à 6,8. (Courtet, 2010)

2.1. Les lipides :

Les matières grasses sont présentes dans le lait sous forme d'une émulsion de globules gras. La teneur en matières grasses du lait est appelée taux butyreux (TB).

Les termes «matières grasses» et «lipides» ne sont pas synonymes. En effet, la matière grasse obtenue par des moyens mécaniques (produit de l'écémage obtenu par centrifugation) représente le contenu du globule gras. De ce fait, elle ne contient pas les lipides polaires ou complexes (phospholipides, etc.), mais contient par contre des composés liposolubles qui ne sont pas des lipides au sens strict et que l'on nomme «substance lipoïde». Il s'agit essentiellement d'« hydrocarbures » (dont le carotène), d'alcools (dont le cholestérol et la vitamine E) et de vitamines liposolubles (A, D, K). Cette fraction encore appelée

insaponifiable regroupe donc des composés variés et nombreux qui, en raison de leur importance et de leur rôle, seront étudiés séparément, même s'ils représentent moins de 1% de la matière grasse totale du lait. (FAO, 1998)

Les lipides (fraction saponifiable) constituent donc l'essentiel de la matière grasse (>98%). (Le tableau N° 1) ci-contre détaille à la fois la teneur (par 100 g de matière grasse) et la (ou les) localisation(s) principale(s) des lipides du lait. (Fredot, 2006)

De tous les composants du lait de vache, les lipides sont ceux qui, quantitativement et qualitativement, varient le plus. Les taux moyens précisés dans la littérature (35 g/litre) peuvent être retenus en pratique industrielle lorsque le lait est un mélange provenant de plusieurs animaux. (Mittaine, 1980)

L'origine des acides gras du lait est double :

- les acides gras dont la chaîne carbonée contient de 4 à 12 atomes de carbone sont synthétisés par la mamelle à partir de précurseurs sanguins : l'acétate et le butyrate d'origine ruminale. Ces acides gras sont nettement plus abondants dans le lait des ruminants que dans le lait des monogastriques
- les acides gras dont la chaîne carbonée contient 18 (et plus) atomes de carbone sont directement prélevés dans le plasma sanguin. Ils proviennent de l'alimentation, des réserves adipeuses ou d'une synthèse dans d'autres tissus que la mamelle.
- les acides gras à 14 et 16 atomes de carbone proviennent soit d'une synthèse de novo par la mamelle soit d'un prélèvement dans le flux sanguin. (FAO, 1998)

Tableau 1 : Constituants lipidiques du lait de vache et localisation dans les fractions physicochimiques, (g/100 g de matière grasse), source FAO, 1998

Constituants lipidiques	Proportions	Localisation
Triglycérides	96-98	Globule gras
Diglycérides	0,3-1,6	Globule gras
Monoglycérides	0,0-0,1	Globule gras
Phospholipides	0,2-1,0	Membrane du globule gras et lactosérum
Cérébrosides	0,0-0,08	Membrane du globule gras
Stéroïdes	0,2-0,4	Globule gras
Acides gras libres	0,1-0,4	Membrane du globule gras et lactosérum
Esters du cholestérol	Traces	Membrane du globule gras
Vitamines	0,1-0,2	Globule gras

Hormis quelques rares phospholipides, stérols et acides gras présents dans le lactosérum, les graisses sont dispersées dans le lait sous forme de globules gras. Ces globules sont limités par une membrane formée de polypeptides (à raison de 40 %), de triglycérides (à raison de 35%) et de lipides complexes (phospholipides, stérols, cérébrosides, à raison de 15% environ). La membrane lipoprotéique confère au globule gras sa stabilité. De fait, elle est fragile et sa rupture (agitation, réfrigérations répétées, acidification) déstabilise l'émulsion avec libération de matière grasse. Celle-ci peut alors subir une lipolyse due à l'action des lipases membranaires ou microbiennes. (Pougheon et Goursaud, 2001)

Lors de l'homogénéisation du lait, le nombre de globules gras augmente et leur diamètre diminue très sensiblement (moins de 1 micron). De ce fait, la surface de contact augmente de 20 fois environ. Cette modification prévient la remontée de la matière grasse (dans les laits de longue conservation) et favorise sa digestion.

La composition lipidique du lait comprend deux grands groupes :

- les lipides simples (les glycérides)
- les lipides complexes (les phospholipides). (Courtet, 2010)

Tableau 2 : Distribution des principaux acides gras de la graisse du lait de vache (%)
(FAO, 1998)

Acides gras	Nomenclature	Moyennes
Saturés		
Butyrique	C4 :0	3,6
Caproïque	C6 :0	2,3
Caprylique	C8 :0	1,3
Caprique	C10 :0	2,7
Laurique	C12 :0	3,3
Myristique	C14 :0	10,7
Pentadécanoïque	C15 :0	1,2
Palmitique	C16 :0	27,6
Stéarique	C18 :0	10,1
Arachidique	C20 :0	0,2
Monoinsaturés		
Myristoléique	C14 :1	1,4
Palmitoléique	C16 :1	2,6
Oléique	C18 :1	26,0
Polyinsaturés		
Non conjugués:		
Linoléique	C18 :2	2,5
Linoléinique	C18 :3	1,4
Arachidonique	C20 :4	0,3
Conjugués:		
Diène	C18 :2	0,8

2.2. Variation de la teneur en matière grasse (variation du TB) :

Pour le lait de vache, le taux butyreux se situe en moyenne, entre 35 à 45 g/L.

Le TB varie :

- en fonction de la race et de la génétique de la vache. Par exemple, le lait des vaches Normandes est plus riche que le lait des Prim'Holstein. Le lait des vaches de race Jersiaise est très riche en matières grasses.
- en fonction du stade de lactation. Au cours d'une lactation, le taux butyreux varie en sens inverse de la quantité journalière de lait produit, et c'est au pic de lactation que le taux butyreux est le plus faible.
- au cours de la traite, c'est pourquoi la définition légale du lait précise que le lait est le produit de la traite intégrale.
- en fonction de la photopériode. Le taux butyreux est plus faible en été lors des jours les plus longs.
- Et enfin en fonction de l'alimentation :
 - tous les facteurs alimentaires qui peuvent conduire à une acidose ruminale (excès d'amidon, déficit en cellulose brute (<17%), défaut de fibrosité, défaut de transition alimentaire) peuvent provoquer une chute du taux butyreux.
 - les aliments riches en sucres simples (betteraves, mélasse, lactosérum, et dans une moindre mesure l'ensilage de maïs), s'ils ne sont pas distribués en excès (ce qui provoquerait une acidose) augmentent la production ruminale de butyrate, ce qui est très favorable à de bons TB.
 - les suppléments lipidiques de la ration des vaches laitières ont un effet variable dont nous parlerons en troisième partie. (Coulon, 1994)

2.2. Les glucides :

Le lactose, disaccharide composé de glucose et de galactose, est le seul glucide libre du lait présent en quantités importantes, sa teneur est très stable entre 48 et 50 g/L. Cette teneur présente de faibles variations à la différence du taux butyreux.

Il est synthétisé par la glande mammaire à partir du glucose prélevé dans le sang. Sa faible contribution à l'apport énergétique du lait (30%), ne fait pas de ce dernier un aliment équilibré en termes de répartition calorique (les recommandations théoriques prônent un apport de 50 à 60% de calories glucidiques). (Mathieu, 1999)

Le lactose joue un rôle nutritionnel particulier et intervient également comme élément de fermentescibilité. Il peut être hydrolysé par les acides forts, mais surtout par la lactase.

La saveur sucrée du lactose est faible; lorsqu'on impute au saccharose une valeur arbitraire de 100%, celle du lactose atteint environ le tiers (de 27 à 39%).

Le lactose est le seul sucre qui puisse être utilisé correctement par le jeune animal car son tube digestif possède une lactase mais ne possède ni saccharase, ni maltase, ni amylase. Les capacités lactasiques diminuent avec l'âge et certaines personnes peuvent présenter des difficultés à digérer le lactose par défaut d'activité enzymatique, c'est l'intolérance au lactose, que nous détaillerons plus tard. (Hoden et Coulon, 1991)

Le lait contient en quantités souvent négligeables (0,1g/L) d'oligosaccharides notamment du glucose et du galactose issus de la dégradation du lactose. Certains industriels ont récemment mis sur le marché un lait allégé en lactose qui contient 90% de lactose en moins qu'un lait classique, ce qui permet à ces patients de continuer à boire du lait de vache sans subir les désagréments de cette intolérance. (Lactel, 2008)

2.3. Les matières azotées totales (MAT) :

La dénomination « matières azotées totales » regroupe les protéines (Taux Protéique), ainsi que l'azote non protéique (dont l'urée). Le TP est une caractéristique importante du lait. Comme le taux butyreux, le TP conditionne la valeur marchande du lait, plus le TP sera élevé par rapport à une référence et plus le lait sera payé cher au producteur (paiement du point de TP). En effet plus le taux protéique (TP) est élevé et plus le rendement de transformation fromagère sera bon. La teneur totale avoisine 34 à 35 g/L. (Fredot, 2006)

2.3.1. Composition chimique et origine des matières azotées totales du lait :

Les protéines du lait représentent 95% des matières azotées totales.

Les 5% restants sont constitués :

- d'acides aminés libres et de petits peptides
- d'azote non protéique, essentiellement de l'urée (0,3 à 0,4 g/L) mais aussi de la créatinine, de l'acide urique,...

Les protéines sont constituées soit d'acides aminés seulement (β -lactoglobuline, α -lactalbumine), soit d'acides aminés et d'acide phosphorique (caséines α et β) avec parfois encore une partie glucidique (caséine k). Une vingtaine d'acides aminés interviennent dans la composition de ces protéines, leur séquence conférant à chaque protéine des propriétés propres. C'est sur la base de la précipitation à pH 4,6 (à 20°C) ou sous l'action de la présure qu'on sépare deux constituants : la ou plutôt les caséines (α , β , γ et k) et les protéines solubles ou protéines du lactosérum (composition protéique : tableau N° 3).

Les protéines du lait forment un ensemble assez complexe constitué de :

- 80% de caséines,
- 20% de protéines solubles : lactalbumines, lactoglobulines, sérum albumines,

Immunoglobulines...

Ces protéines ont des origines différentes :

- 90% des protéines du lait sont synthétisées par la mamelle (et sont spécifiques du lait), les caséines sont entièrement synthétisées par la mamelle, les lactoglobulines sont des protéines sanguines modifiées par la mamelle.
- 10% des protéines du lait (sérum albumines, immunoglobulines) proviennent directement du sang. (Courtet, 2010)

Tableau 3 : Composition moyenne et distribution des protéines du lait (FAO, 1998)

	Moyennes absolues (g/L)	Moyennes relatives (%)
Matières azotées totales	34	100
Protéines	32	94
Protéines non solubles ou caséine entière	26	82
Protéines solubles 6 18	6	18
a –lactoglobuline	2,7	45
b –lactalbumine	1,5	25
Sérum-albumine	0,3	5
Globulines immunes	0,7	12
Protéoses peptones	0,8	13
Substances azotées non protéiques	2	6

2.3.1.1. Caséines :

Les caséines sont des polypeptides phosphorés associés à des constituants minéraux, en particulier le calcium, mais aussi le phosphore, le magnésium et le citrate, de manière à former des micelles de phosphocaseinate de calcium. En présence de calcium, elles forment des unités qui agrègent plusieurs milliers de molécules, constituant les micelles de caséine dispersés dans la phase hydrique du lait (diamètre variant de 100 à 250 µm). Cette configuration spatiale permet aux enzymes hydrolytiques (carboxypeptidases) une digestion plus aisée. (Jean et Dijon, 1993)

2.3.1.2. Protéines solubles ou protéines du lactosérum :

Les protéines solubles représentent environ 20% des protéines totales du lait de vache. Elles flocculent difficilement en présence d'acide ou de présure. Par contre, à l'exception des protéoses peptones, elles sont dénaturées par la chaleur et sont entraînées lors de la

coagulation de la caséine sous l'action de la présure. Un chauffage à 80°C pendant une minute en dénature environ 20%, mais, lors de la pasteurisation UHT (72°C pendant 15 à 20 secondes), la dénaturation est négligeable.

Son constituant essentiel (50-55%) est la β -lactoglobuline bovine, totalement absente du lait humain. Son rôle n'est pas connu. La deuxième protéine soluble (20-25%) du lait bovin est, par ordre d'importance, l' α -lactalbumine. Elle est présente dans le lait de tous les mammifères qui sécrètent du lactose puisque cette protéine est partie intégrante de l'enzyme de synthèse du lactose. (Debry, 2001)

Parmi les protéines solubles restantes certaines, comme la sérum-albumine, ont une faible valeur nutritionnelle. D'autres comme les immunoglobulines et la lactoferrine n'en ont pas du tout.

Le taux de lactoferrine est très bas dans le lait de vache (0,2 g/litre). La lactoferrine bovine est nettement plus saturée en fer que la lactoferrine humaine (environ 30% contre 5%) et ce fer lié est peu biodisponible pour l'absorption digestive tant chez l'enfant que chez l'adulte. (Thapon, 2005)

Les protéines du lactosérum ont une valeur nutritive majeure en nutrition humaine, car elles sont riches en acides aminés essentiels. Les protéines des laits de vache et de femme ont un profil en acides aminés différent. En conséquence, lorsqu'une formule lactée adaptée au lait maternel (laits infantiles dits «à prédominance ou enrichis en lactalbumines») est choisie pour alimenter un enfant, les protéines du lactosérum induisent dans le plasma du nourrisson un profil en acides aminés tout différent de celui obtenu par l'administration d'un lait de vache non modifié. (Vignola, 2002)

2.3.1.3. Azote non protéique :

Le taux d'urée du lait de vache est bas et ceux de taurine et de carnitine sont faibles.

2.3.2. Variation de la teneur en matière protéique (TP) :

Le taux protéique (TP) varie essentiellement :

- en fonction de la race. Par exemple, le lait des vaches Normandes est plus riche que le lait des Prim'Holstein.
- en fonction de la génétique,

- en fonction de la photopériode, le TP est plus faible en été lors des jours longs.
- en fonction de l'alimentation :
 - le principal facteur alimentaire est l'apport d'énergie. Si les besoins énergétiques de l'animal ne sont pas couverts, il y a une diminution du taux protéique. Une sous alimentation totale ou protéique provoque une chute du taux protéique (TP) en plus d'une chute de la production laitière dans toutes les espèces.
 - chez la vache laitière, si la ration est riche en énergie, la synthèse protéique est stimulée. Par contre, un excès de protéines alimentaires n'augmente pas le taux protéique (TP) mais augmente le taux d'azote non protéique en particulier le taux d'urée. Le taux d'urée du lait est identique à celui du sang de la vache et peut être utilisé comme un indicateur d'une surnutrition ou sous-nutrition protéique.
 - chez les vaches laitières très hautes productrices, l'apport d'acides aminés limitant (lysine, méthionine le plus souvent) protégés des dégradations ruminales (tourteaux tannés, acides aminés de synthèse protégés) peut permettre une augmentation modérée du taux protéique (environ 1 g/kg). (Courtet, 2010)

2.3.3. Intérêt nutritionnel :

Qualitativement, les protéines de lait ont une efficacité nutritionnelle élevée, elles ont:

- une bonne valeur biologique c'est-à-dire un bon équilibre en acides aminés indispensables.
- une digestibilité très élevée (90 à 96% pour leur coefficient de digestibilité apparente).

Les protéines du lait sont particulièrement bien adaptées à la croissance rapide, ce qui est le cas des très jeunes animaux. Les caséines sont pauvres en acides aminés soufrés, ce qui est compensé par la richesse en ces acides aminés de la lactoglobuline et de la lactalbumine. Malheureusement ces deux dernières protéines constituent la « peau » du lait que l'on chauffe et sont éliminées quand on filtre le lait. Les acides aminés soufrés deviennent donc le facteur limitant. Comme tous les autres aliments d'origine animale, le lait de vache est riche en lysine. Celle ci est en revanche rapidement dénaturée par la chaleur et particulièrement lors de l'ébullition. (Vignola, 2002)

2.4. Les minéraux :

Les minéraux (ou matières salines) sont présents dans le lait à hauteur de 7g/litre environ (tableau N° 4). Les plus représentés en quantité sont le calcium, le phosphore, le potassium et le chlore. On retrouve ces matières salines soit en solution dans la fraction soluble, soit sous forme liée dans la fraction insoluble (ou colloïdale). Certains minéraux se trouvent exclusivement à l'état dissous sous forme d'ions (sodium, potassium et chlore) et sont particulièrement biodisponibles. Les autres (calcium, phosphore, magnésium et soufre) existent dans les deux fractions. (Gaucheron, 2004)

Dans la fraction soluble, ils existent en partie sous forme libre (calcium et magnésium ionisés), en partie sous forme saline (phosphates et citrates) non dissociée (calcium et magnésium), ou encore sous forme complexe (esters phosphoriques et phospholipides). Dans la fraction colloïdale, les minéraux (calcium, phosphore, soufre et magnésium) sont associés ou liés à la caséine au sein des micelles. (Jeantet *et al*, 2007)

Tableau 4 : Constituants majeurs des matières salines du lait de vache (g/L) (FAO, 1998)

Minéraux : totaux (g/L)	7
calcium (g)	1,25
phosphore (g)	1,00
magnésium (g)	0,12
sodium (g)	0,50
potassium (g)	1,25
chlore (g)	1,00
autres (soufre, citrate...)	1,8

2.5. Les oligo-éléments :

Leurs teneurs en oligo-éléments dans le lait varient fortement mais, au-delà de certaines limites, elles sont l'indice d'une contamination du lait et présentent un caractère toxique pour la santé et/ou nuisible en technologie laitière. Les teneurs en oligo-éléments du lait données dans la littérature (tableau N° 5) sont seulement indicatives, dans la mesure où elles subissent

l'influence de divers facteurs (alimentation, stade de lactation, etc.) et dépendent aussi des méthodes utilisées. (Amiot *et al*, 2002)

D'une manière générale, le lait constitue pour l'homme une mauvaise source d'oligoéléments. Ils s'y trouvent le plus souvent à des taux relativement modestes, et lorsque les taux semblent plus proches des besoins, ils sont présents sous forme inorganique (de moindre biodisponibilité). C'est le cas notamment du cuivre et du manganèse, très liés aux groupements phosphates de la caséine. Dans une certaine mesure le zinc (et le fer) font exception à cette règle. (Jeantet *et al*, 2007)

Tableau 5 : Teneurs en oligo-éléments du lait de vache ($\mu\text{g/L}$) (FAO, 1998)

Oligo-éléments	Teneurs
Brome	150
Cobalt	0,5
Cuivre	20-40
Fer	200-500
Fluor	70-200
Iode	10-300
Manganèse	10-30
Sélénium	10 -30
Zinc	3000-6000

2.6. Les vitamines :

Toutes les vitamines connues sont présentes dans le lait de vache. Les techniques de traitement du lait peuvent modifier sensiblement les taux, surtout pour la vitamine C (tableau N° 6). (Vignola, 2002)

Tableau 6 : Concentrations en vitamines du lait de vache (mg/L) (FAO, 1998)

Teneurs en vitamines	
Vitamines hydrosolubles	
- B1 (thiamine)	0,42
- B2 (riboflavine)	1,72
- B6 (pyridoxine)	0,48
- B12 (cobalamine)	0,0045
- Acide nicotinique (niacine)	0,92
- Acide folique	0,053
- Acide pantothénique	3,6
- Biotine	0,036
- C (acide ascorbique)	8
Vitamines liposolubles	
- A	0,37
- β -carotène	0,21
- D (cholécalférol)	0,0008
- E (tocophérol)	1,1
- K	0,03

Les protéines sont des éléments essentiels au bon fonctionnement des cellules vivantes et elles constituent une part importante du lait et des produits laitiers, l'analyse du lait par minéralisation, permet d'évaluer que 95% de la quantité totale d'azote est présente dans les protéines dont la concentration moyenne est de 3.2%. Les composés azotés non protéiques sont principalement des protéases, des peptones et de l'urée. (Brule et Lenoir, 1987)

La matière azotée du lait est divisée en deux parties : la matière azotée protéique (correspond à 95 % de l'azote total) et la matière azotée non protéique (NPN). En fonction de leur solubilité à pH 4,6, les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories : les caséines (insolubles à ce pH) et les protéines du lactosérum (solubles à pH 4,6). (Alais, 1984)

La teneur du lait en protéines est une caractéristique essentielle de sa valeur marchande car plus le taux protéique est élevé, meilleur sera le rendement de la transformation technologique.

La matière protéique et les caséines en particulier prennent, ainsi, de plus en plus d'importance. (Pougheon et Goursaud, 2001)

1. Les caséines :

Qui sont en suspension colloïdale, qui se regroupent sous forme de micelles et qui précipitent sous l'action de la présure ou lors de l'acidification à un pH d'environ 4.6. (Vignola, 2002)

Les caséines sont très bien adaptées à la nourriture des nouveaux nés. Leurs structures moléculaires ne leur confèrent pas d'activité enzymatique. Elles constituent aussi la matière première des fromages. (Soledad, 2009)

Environ 95% des caséines dans le lait. En base sèche, les micelles de caséines contiennent 94% de protéines, et 6% d'espèces de faible poids moléculaire, et qui consistent en calcium, magnésium, phosphate et citrate. Les micelles sont hautement hydratées, elles contiennent environ 2,0 g d'H₂O par g de protéine. (Soledad, 2009)

On distingue principalement 4 catégories de caséines:

- Les caséines α (α S1 et α S2) (36% et 10% respectivement) ; Les caséines β (34%) ; Les caséines κ (13%) ; Les caséines γ (7%). (Jouan, 2002)

2. Description et composition physico-chimique de la micelle :

2.1. Aspects et propriétés :

La caséine est un complexe protéique phosphoré à caractère acide qui précipite dans le lait à pH 4,6. Il s'agit d'une substance hétérogène même si elle a été longtemps considérée comme une protéine pure et homogène en raison de la constance de sa composition élémentaire. (Cayot et Lorient, 1998)

2.1.1. la micelle :

Les caséines se présentent dans le lait sous forme d'un complexe organique et minéral (figure1)

Particule sphérique d'environ 180 nm constituée de submicelles de 8 à 20 nm (64), elle est très hydratée (2 à 4 g d'eau par g de protéine) et 7% environ de son extrait sec (tableau 7) est composé de sels (phosphate, calcium, magnésium, citrate dans l'espace inter submicellaire).

Les submicelles pourraient être constituées d'environ 10 molécules des 4 caséines en proportion variable avec une répartition de caséine k (hydrophile) en surface ; les submicelles les plus riches en caséine k sont situées en surface de la micelle, ce qui la stabilise. Les portions C-terminales de la caséine k hérissent la micelle et l'enveloppent d'une chevelure périphérique particulièrement hydrophile. (Cayot et Lorient, 1998)

Cependant, l'organisation exacte intramicellaire (très petites submicelles ou structure interne de caséines individuelles) n'est pas aujourd'hui précisément connue. (Mc Mahon et Mc Manus, 1998)

La coagulation du lait après addition de présure résulte, entre autres phénomènes, d'une action primaire sur la caséine k (protéolyses entre les acides aminés 105 (Phénylalanine) et 106 (Méthionine) situés à l'extérieur de la micelle) laissant des plages hydrophobes de paracaséine k (les acides aminés 1 à 105 restant fixés à la micelle). Sous l'influence de calcium ionique Ca^{++} dissous, il y a agglomération des micelles dépourvues de caséino glycopeptide (cas k 106-169 qui se solubilise) en un réseau : le caillé. (Lenoir, 1985, Brule et Lenoir, 1987)

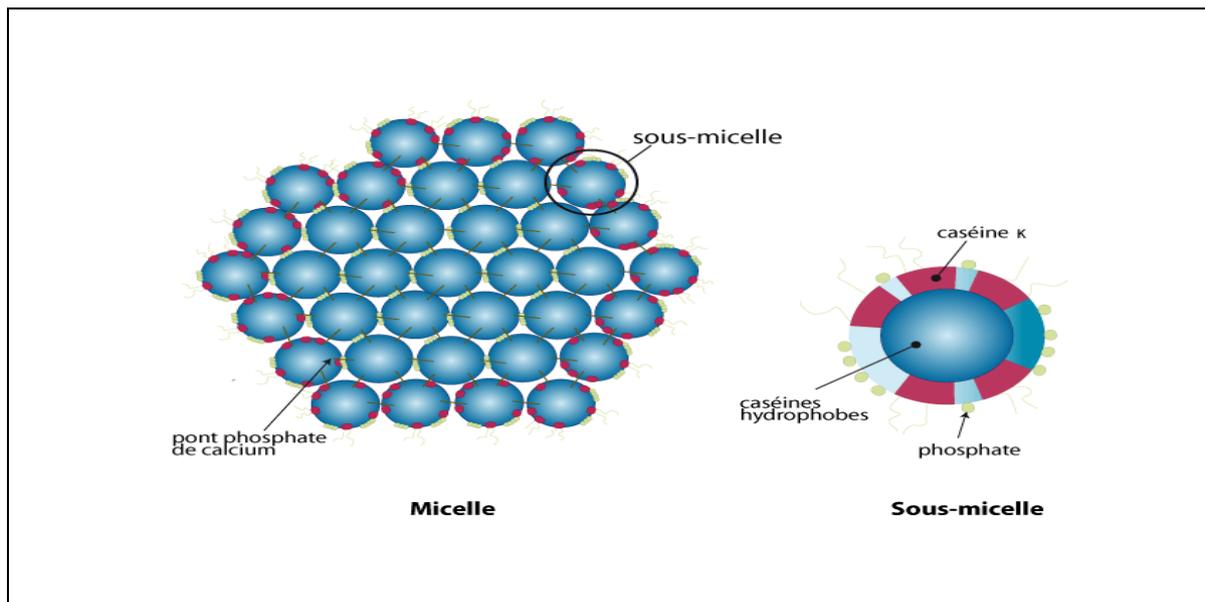


Figure 1 : Modèle schématique supposé d'une section de micelle de caséines

Tableau 7 : Composition moyenne d'une micelle de caséine

	En g pour 100 g de caséine*	En g/l de lait**
CASEINES :	93,3	29,5 (donnée surévaluée)
α S1	35,6	11,9
α S2	9,9	3,1
β	33,6	9,8
κ	11,9	3,5
γ	2,3	1,2
CONSTITUANTS SALINS :	6,7	1,84 (estimation)
Phosphate		
Ca	2,9	0,89
Citrate	2,9	0,79
Mg	0,4	0,12
Autres (minéraux,	0,1	0,04
sucres)	0,4	

Teneur en eau = 63% ; matières sèches : 37%

D'après Mc Mahon et Brown, (1984)* et Swaisgood, (1995) **

2.1.2. Propriétés des caséines :

2.1.2.1 pHi et charge électrique :

Les groupements acides libres des résidus glutamyle, aspartyle et phosphoryle en nombre supérieur aux groupements basiques libres $-NH_2$ des lysines et autres acides aminés diamminés, confèrent à la caséine entière un pHi de 4.65, une charge négative et des propriétés acides (réaction avec les métaux alcalino-terreux). (Hammarsten et Physiol, 1885)

2.1.2.2. Propriétés associatives des caséines :

A pH = 7, lorsqu'on élève la température, les caséines b et k donnent des polymères d'une vingtaine à une trentaine d'unités, les différentes molécules étant unies par des liaisons hydrophobes. De plus, les polymères k + aS2 résultent de liaisons disulfures S-S intermoléculaires.

Le Ca^{2+} complexe les molécules $\alpha S1$, $\alpha S2$, β et diminue ainsi leur charge, leur hydrophilie et les insolubilise. (Ratray *et al*, 1997)

2.2. Les caséines αS :

2.2.1. La caséine $\alpha S1$:

C'est la protéine la plus importante en masse, elle possède 199 AA pour 23 614 g/mol.

Cette caséine est très sensible au calcium au pH normal du lait (=6,7) : quelle que soit la température et en présence de calcium, on constate une formation de flocons.

Dans la micelle, la caséine $\alpha S1$ est peu accessible à la plasmine ; il est donc probable qu'elle se situe au cœur de la micelle masquée par d'autres caséines. (Grippon, 1960)

2.2.2. La caséine $\alpha S2$:

Elle représente 8 à 11% de la micelle de caséine, possède 207 AA et 13 à 10 phosphates (il s'agit de $\alpha S2$ ou $\alpha S3$ ou $\alpha S4$ ou $\alpha S6$ selon le nombre de phosphates) et son poids moléculaire estimé varie de 25150 à 25390 g/mol.

Grâce à la présence des 2 résidus cystéine, les molécules peuvent s'associer en dimères qui s'agrègent entre eux par interactions électrostatiques pour former des polymères ($\alpha S5$ dimère de $\alpha S3$ et $\alpha S4$).

Par sa richesse en phosphate, elle est très sensible au calcium, et comme pour $\alpha S1$, la caséine $\alpha S2$ semble ne pas être en surface de la micelle. (Grippeon, 1960)

2.3. Les caséines β et γ :

2.3.1. La caséine β :

Représentant 25 à 35% de la micelle, avec ses 209 acides aminés et ses 5 groupements phosphates, elle possède beaucoup d'analogie avec la caséine $\alpha S1$.

Elle est sensible au calcium à température ambiante mais après déphosphorylation (expérience de laboratoire), la molécule perd cette sensibilité et devient capable d'empêcher la précipitation de la caséine $\alpha S1$ par le calcium.

Elle est sensible au froid et très hydrophobe (ces zones hydrophobes sont à l'origine de l'association des caséines β entre elles pour former des «néomicelles»). (Grippeon, 1960)

2.3.2. La caséine γ :

Il s'agit des fragments C-terminaux résultant de la protéolyse de la caséine β par la plasmine (protéase alcaline du lait). (Grippeon, 1960)

2.4. La caséine k :

Une grande majorité de cette caséine se trouve à la surface de la micelle, accessible à la présure. (Grippeon, 1960)

Il s'agit d'une protéine de 169 acides aminés, phosphorylée (Serine 149) comportant 2 variantes génétiques A et B. Elle comporte un constituant majeur non glycosylé (figure 2) et des constituants mineurs glycosylés dont la structure précise est élucidée. (Eigel *et al*, 1984)

Cette caséine est insensible au calcium et stabilise les autres caséines phosphorylées vis à vis de ce cation. La coagulation du lait se fait suite à la protéolyse de cette caséine par la présure (ou chymosine : enzyme naturelle de la caillette du jeune bovin pré-ruminant) qui scinde la molécule en deux parties : la partie N-terminale ou paracaséine κ (1-105) et le fragment C-terminal ou caséinomacropéptide (CMP : 106-169) aux propriétés très contrastées:

Dans le caillé, seules sont récupérées les caséines α S1, α S2, β et paracaséine κ tandis que le CMP se retrouve dans le lactosérum.

Il est à noter que le CMP contient tous les glucides, quand ils existent, sur les Thréonine 131, 133, 135 et 136 (variant A uniquement). (Sandra *et al*, 2001)

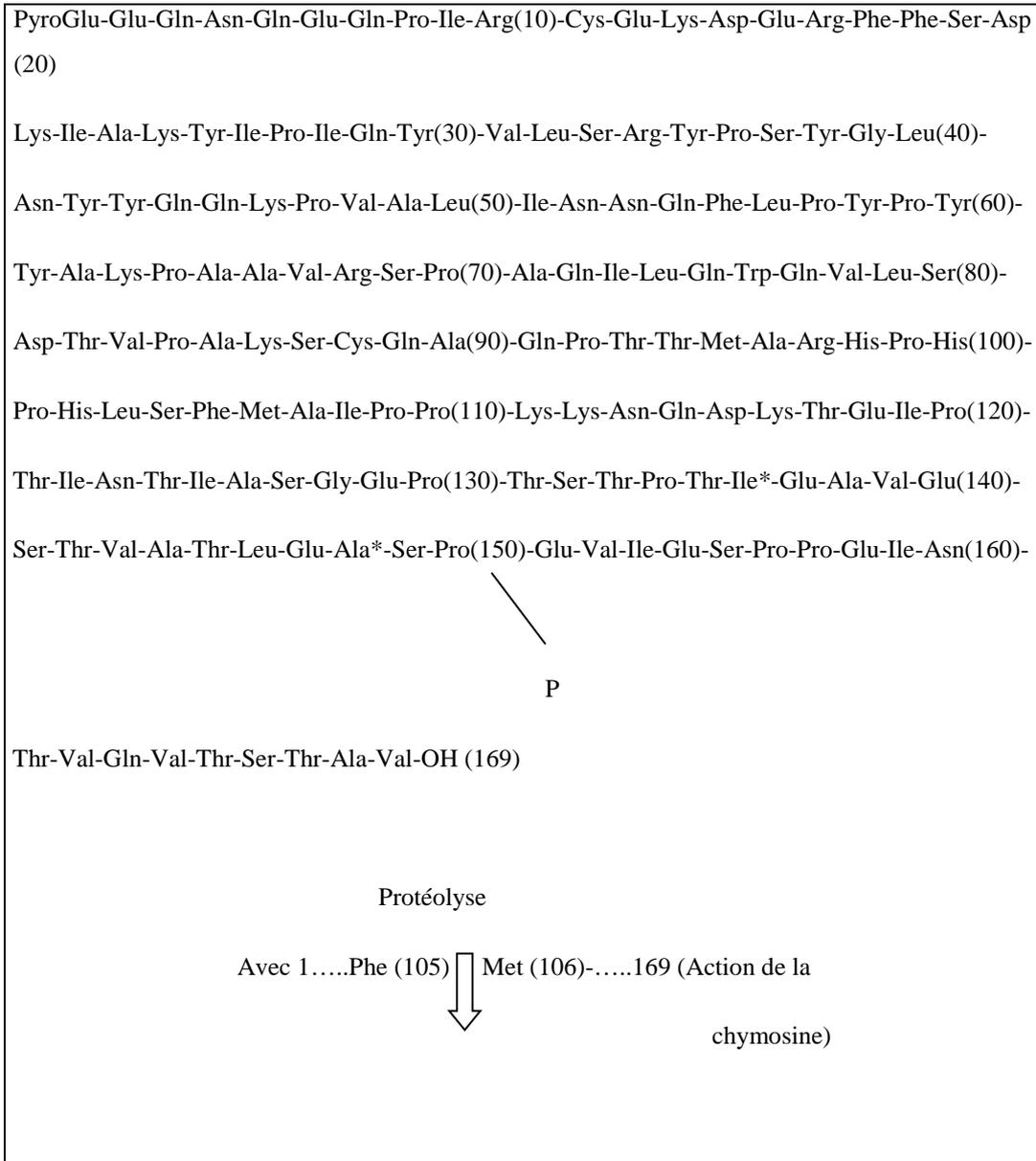


Figure 2 : Structure primaire de la caséine κ -CN B-1P (Eigel et al, 1984) (Masse moléculaire : 19 007 Da).

1. La centrifugation :

1.1. Introduction :

La sédimentation est une technique d'analyse permettant de séparer une dispersion d'un solide au sein d'un liquide ou une dispersion d'un liquide au sein d'un autre liquide non miscible et de densité différente. Cette séparation peut se faire d'elle-même sous l'action de la pesanteur lorsque la dispersion est formée d'une substance plus dense que le liquide (décantation). La centrifugation permet de remplacer l'accélération de la pesanteur (g) par une accélération centrifuge développée par un rotor tournant à grande vitesse (6 à 10000 tours par minute). (Benabdallah, 2016)

1.2. Définition :

La centrifugation est une technique qui permet la séparation des composés d'un mélange en fonction de leur densité sous l'action d'une force centrifuge. Elle permet de récupérer un précipité (culot) et un surnageant. Le mélange à séparer peut être constitué de deux phases liquides ou de particules solides en suspension dans un liquide.

L'ultracentrifugation utilise des vitesses de rotation encore plus grandes (allant jusqu'à 75000 tours par minute) et permet la sédimentation de particules ultramicroscopiques. (Audigié, 1995)

1.3. Principe :

La centrifugation permet de séparer des constituants de taille et de masse très différentes contenus dans un liquide. Les constituants contenus dans un échantillon sont soumis à deux forces:

- La gravité: C'est la force qui s'exerce du haut vers le bas.
- La poussée d'Archimède: C'est la force qui s'exerce du bas vers le haut.

Pour une vitesse de rotation donnée, chaque rotor a une force relative de centrifugation en x.g (force de gravité relative ou accélération) qui peut être exprimée en vitesse de rotation en rotations par minute selon la formule mathématique de conversion. Celle-ci est:

$$g = 1.119 \cdot 10^{-5} \cdot r \cdot N^2$$

Où g est la force relative de centrifugation, r est le rayon de rotation du rotor (en cm) et N (rotations par minute: rpm) exprime la vitesse de rotation. (Mahuzier *et al*, 1999)

1.4. Matériel de centrifugation :

La centrifugeuse est l'appareil utilisé pour la centrifugation. La centrifugeuse est constituée d'un axe de rotation enfermé dans une chambre de centrifugation. A l'exception des centrifugeuses de paillasse dont la vitesse de rotation et le temps d'utilisation sont relativement limités, il est nécessaire d'empêcher l'échauffement des échantillons. Pour cela, la chambre de la centrifugeuse doit être réfrigérée.

Les échantillons à centrifuger doivent être équilibrés deux à deux. Chaque couple doit être placé symétriquement par rapport à l'axe de rotation.

1.5. Type de centrifugeuses :

La force du moteur qui le fait tourner constitue la principale limite qui détermine la vitesse de rotation du rotor. Plus le rotor est lourd et volumineux, plus l'effort que doit fournir le moteur est grand. Selon les besoins expérimentaux (accélérations, volume du matériel à centrifuger, la température de travail), plusieurs types de centrifugeuse ont été développés.

- **Centrifugeuses de table (ou cliniques):** Constituent les modèles les plus simples et sont caractérisées par de faibles accélérations (1000 à 3000 g). Elles peuvent être réfrigérées.
- **Centrifugeuses au sol:** Ces appareils sont un peu plus complexes et caractérisés par des accélérations de l'ordre de 20000 g. Ces centrifugeuses permettent de centrifuger des volumes relativement gros. Certains rotors peuvent même contenir quatre ou six bouteilles de 250 ml. Tous les modèles sont réfrigérés.
- **Ultracentrifugeuses:** Comme leur nom indique, ce sont des appareils qui permettent d'atteindre des accélérations très élevées (jusqu'à 300000 g). Tous les modèles sont réfrigérés. Les rotors ne peuvent contenir qu'une dizaine de tubes de 40 ml.
- **Micro-centrifugeuses:** Ce sont des centrifugeuses spécialement conçues pour les microvolumes. Elles peuvent être réfrigérées et atteindre des accélérations de l'ordre de 12 à 15000 g.
- **Ultracentrifugeuses analytiques:** Elles servent surtout à analyser la taille et la masse des particules et des protéines. Elles sont moins utilisées.

Selon l'axe de rotation, il existe trois catégories de machines à centrifuger:

- ❖ Les centrifugeuses horizontales: Sont ainsi nommées car les pots sont horizontaux en rotation. Des tubes à centrifuger à fond conique sont utilisés pour clarifier un liquide

(pour récupérer le liquide surnageant et rejeter le culot). Alors que les tubes à fond rond sont utilisés pour récupérer le culot. Ce type de centrifugeuse présente quelques inconvénients: mauvais aérodynamisme du rotor et, de plus, les particules qui sédimentent doivent traverser une grande épaisseur de liquide

- ❖ Les centrifugeuses verticales: Sont des centrifugeuses avec un bol à assiettes ou à chambre qui tourne sur un axe vertical.
- ❖ Les centrifugeuses obliques: Dans ce type de centrifugeuses, les tubes sont logés dans un rotor circulaire appelé couronne dans lequel ils sont inclinés à 45°. A l'inverse de centrifugeuses horizontales, ce type de centrifugeuses présente un bon aérodynamisme permettant d'atteindre des vitesses élevées. De plus, les particules n'effectuent qu'un court parcours au sein d'un liquide, elles migrent horizontalement, atteignent la paroi et glissent le long de celle-ci. Ceci favorise la sédimentation. (Dhaliwal, 2013)

1.6. Types de centrifugation :

Il existe deux principaux types de centrifugation.

1.6.1. La centrifugation différentielle :

Elle se base sur les différences de vitesse de sédimentation entre particules qui diffèrent par densité et dimensions. Le principe de ce type de centrifugation est de séparer les différents constituants à l'aide de plusieurs cycles de centrifugation à accélération croissante. Dans une centrifugation à faible accélération, les éléments les plus massifs vont sédimenter et former un culot au fond du tube. Les éléments dont l'accélération est trop faible pour contrebalancer les effets de l'agitation moléculaire, ou le temps de centrifugation est trop court vont rester dans le surnageant. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour récupérer les éléments (les cellules) du sang qui sédimentent pour des accélérations très faibles. (Marshak, 1996)

1.6.2. La centrifugation en gradient de densité :

Dans cette méthode, les particules sédimentent au sein d'un gradient de densité. A l'équilibre, elles se stabilisent dans la zone du gradient où la densité est égale à la sienne. La différence entre la densité de la particule et celle du solvant constitue l'un des facteurs qui influence la vitesse de sédimentation. Cette dernière peut être modulée en faisant varier cette différence de densité par la création d'un gradient de densité.

- ❖ Si la densité de la particule est plus grande que celle du milieu, elle sédimentera. Plus la différence de densité est grande plus la sédimentation est rapide.

- ❖ S'il n'y a aucune différence de densité, il n'y aura aucune sédimentation, quelle que soit l'accélération.
- ❖ Si la particule est moins dense que le milieu, celle-ci s'élèvera dans le tube jusqu'à atteindre un niveau de densité égal à la sienne ou, le cas échéant, jusqu'à flotter à la surface. (Marshak, 1996)

2. La chromatographie :

2.1. Historique :

La chromatographie (du grec chroma: couleur et graphein: écrire) a été inventée par le botaniste Mikhail Tswett dans les années 1900. La première chromatographie a été réalisée par ce botaniste en 1905. Il a réalisé la séparation de pigments végétaux de la chlorophylle sur une colonne remplie de carbonate de calcium avec de l'éther de pétrole. Des bandes colorées qui se déplacent le long de la colonne à des vitesses propres sont obtenues.

Le prix Nobel de chimie est attribué en 1952 aux biochimistes Martin et Synge pour leur contribution au développement de la chromatographie moderne. (Benabdallah, 2016)

2.2. Définition :

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour purifier, identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles, l'une dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. (Burgot, 2006)

2.3. Principe :

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un (des) composé(s) à l'égard de deux phases (stationnaire et mobile). Le principe de cette technique est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans un échantillon analysé. L'échantillon est entraîné par la phase mobile au travers de la phase stationnaire qui a tendance à retenir plus ou moins les composés de l'échantillon à l'aide d'interactions comme les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogène. Une fois la

phase stationnaire traversée, les composés sont élués. Les différents composants de l'échantillon ont généralement une affinité différente pour l'une et l'autre des deux phases. Il en résulte une différence de vitesse de progression des produits et donc d'éluion. Ceci permet de les séparer les uns des autres voire de les identifier. Cette vitesse de séparation est fortement indépendante de la nature des phases mobile et stationnaire. (Rouessac *et al*, 2004)

2.4. Chromatographie liquide rapide d'échange d'ions (FPLC) :

Le système chromatographique FPLC (Pharmacia, Uppsala, Suède) est composé d'un système de contrôle LCC-500, de 2 pompes P500, d'un détecteur UV muni d'un filtre pour la mesure à 280 nm et d'un passeur d'échantillon MV8. La colonne échangeuse d'anions Mono Q HR 5/5 (Pharmacia, Uppsala, Suède) était thermostatée à l'aide d'un bain-marie. Les tampons étaient préparés avec de l'eau désionisée traitée sur un système de filtration Milli Q 23004 (Millipore, Bedford MA, USA). Les solutions d'urée étaient filtrées sur une résine mixte AG 501-X8D (Mixed Bed Resin, Bio Rad, Richmond CA, USA). Les tampons étaient dégazés sous courant d'Hélium.

3. L'électrophorèse :

3.1. Historique :

Dès le début du XVIII^e siècle, les travaux de Charles de Coulomb (1736-1806), Alessandro VOLTA (1745-1827) et André-Marie Ampere (1775-1836) avaient permis l'émergence des premières lois de l'électrostatistique et de l'électricité.

Un siècle plus tard, en 1859, L'Allemand Georg Hermann Quincke découvre qu'il était possible de déplacer des particules colloïdales (sous forme de colle gélatineuse) sous l'action d'un champ électrique : ce phénomène est appelé cataphorèse.

Par la suite, Hermann Von Helmholtz développe l'électro-osmose : sous un champ électrique, il observe que des particules chargées se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge.

En 1892, Linder S.E et Picton. H exploitent cette observation pour la séparation de particules chargées.

En 1937, le Suédois Arne Wilhelm Kaurin Tiselius applique cette technique à la séparation des protéines du sérum et du lait, ce qui lui vaudra le prix Nobel en 1948. Sa méthode de fractionnement en phase liquide est alors trop onéreuse en matériel et en personnel pour la pratique courante, mais il la perfectionne et en 1950 il met au point l'électrophorèse sur papier, plus simple et permettant une utilisation plus large.

Depuis 1957, l'électrophorèse sur acétate de cellulose autorise une meilleure individualisation des fractions et ainsi l'établissement de tracés plus expressifs.

Les années suivantes, l'utilisation de gel de polyacrylamide permet l'obtention d'un fractionnement plus important, mais reste d'interprétation plus difficile et hors d'usage de la pratique courante.

Aujourd'hui cette technique, qui ne cesse de s'améliorer par la diversité des supports et des techniques de réalisation, est devenue un outil indispensable dans de nombreux laboratoires, tant au niveau de la recherche et de l'industrie que des sciences médicales au sens large.

Parallèlement, des automates d'électrophorèse sont apparus, permettant une meilleure standardisation des différentes étapes de la technique et notamment le mode de dépôt des échantillons et le contrôle des paramètres de la migration (voltage, température, durée de migration) (Borel *et al*, 1985, Foulon *et al*, 1996)

3.2. Définition :

C'est une des nombreuses techniques de séparation et d'analyse de particules chargées par migration différentielles sous l'action d'un champ électrique.

Des particules chargées sont donc placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge à une vitesse proportionnelle à cette charge. Si on dépose une espèce anionique (chargée négativement), elle migrera vers l'anode (+) et une espèce cationique (chargée positivement) du côté de la cathode (-). (Benabdallah, 2016)

3.3. Principe :

L'électrophorèse consiste à faire migrer et à fractionner grâce à un champ électrique, et dans un tampon de pH déterminé, les constituants séparés en fonction de leur charge électrique. Ce principe d'électrophorèse s'applique aux protéines et pour qu'ils puissent migrer, elles doivent

être ionisées. C'est ce qui se produit lorsque le milieu est au pH alcalin supérieur au pH isoélectrique (pHi) de différentes protéines (Trumel *et al*, 1996, Batamuzi *et al*, 1996)

3.4. Appareillage d'électrophorèse :

L'appareillage usuel est constitué de :

- Un générateur du courant continu stabilisé relié aux électrodes de la cuve. Ce courant crée un champ électrique qui va permettre de faire migrer les molécules.
- Une cuve d'électrophorèse fermée (horizontale ou verticale) et éventuellement thermostatée comportant deux compartiments. Chaque compartiment est rempli du tampon de migration.
- Des accessoires comme le support d'électrophorèse, les plaques de verre pour couler le gel et les peignes pour creuser des puits dans le gel, dans lesquels les composés à analyser seront déposés. (Delarras, 2007)

3.5. Facteurs influençant la mobilité électrophorétique :

Plusieurs facteurs peuvent influencer la mobilité électrophorétique.

3.5.1. Nature de la molécule :

La taille et la charge de la molécule influencent le processus électrophorétique. En effet, les petites molécules migrent facilement mais leur mobilité dépend des autres substances dissoutes susceptibles de les solvater et de diminuer leur vitesse. De même, la charge des molécules influence directement leur mobilité. La charge est fonction du pH pour les molécules ionisables, de la force ionique et de la formation éventuelle de complexes. Le signe de la charge détermine le sens de migration et sa vitesse. (Bach-Nga PHAM, 2003)

3.5.2. Composition ionique du tampon d'électrophorèse :

La présence d'ions étant nécessaire au passage du courant, un compromis est obtenu avec une force ionique comprise entre 0.05 et 1 mol/l. Le pH influe sur l'ionisation des acides faibles et bases faibles, pour lesquels il s'avère nécessaire de travailler dans un milieu tamponné. (Caron, 1988)

A pH et force ionique identiques, deux tampons de nature différente ne produisent pas toujours des mobilités électrophorétiques identiques. Certaines substances ajoutées au tampon de migration modifient aussi les comportements électrophorétiques. Ainsi:

- La présence d'EDTA ou d'acide citrique favorise par complexation la séparation de certains ions minéraux.
- Les ions boratés forment avec les sucres des complexes chargés rendant ainsi possible leur séparation.
- L'addition d'urée modifie le comportement électrophorétique des macromolécules par rupture de liaisons hydrogène. (Schawartz et contor, 1984)

3.5.3. Support :

Certains supports possèdent des propriétés adsorbantes et peuvent fixer les molécules de solvants ou de solutés. Il en résulte un ralentissement de la migration entraînant un élargissement des zones sur l'électrophorégramme. Ces propriétés adsorbantes sont liées à la présence de certains groupements fonctionnels comme les hydroxyles. (Smith *et al*, 1987)

3.5.4 Champ électrique :

Il représente la chute de potentiel par unité de longueur entre deux électrodes séparées par une distance. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu. Le support de ce champ est constitué par un tampon de pH dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide: on parle alors d'électrophorèse en veine liquide. Dans une large majorité des cas, on utilise un support poreux stabilisant la phase liquide: on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support poreux imprégné de tampon. Ce support peut être du papier, un dérivé de cellulose, de l'amidon, de l'agarose, du polyacrylamide, etc. Le support doit être homogène et inerte. (Batamuzi *et al*, 1996)

Les particules à séparer peuvent être de nature et de tailles très différentes: des composés organiques ou minéraux, de la taille d'une cellule ou de celle d'un ion. Cette méthode est souvent utilisée pour séparer des acides nucléiques, des petits peptides ou des protéines (Lievens *et al*, 1996)

3.6. Types d'électrophorèse :

L'électrophorèse peut être en des conditions non dénaturantes ou en des conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

3.6.1. Electrophorèse en des conditions non dénaturantes :

Les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. La vitesse de migration dépend de la charge native de la molécule et de sa structure tridimensionnelle. (Trumel *et al*, 1996)

3.6.2. Electrophorèse en des conditions dénaturantes :

Les molécules sont soumises à un traitement dénaturant avant la séparation électrophorétique, détruisant la structure tridimensionnelle native. La séparation est donc en fonction de la masse moléculaire. Les agents de dénaturation sont le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) et le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures des protéines. Le SDS est un dénaturant doux et un surfactant, il agit sur les protéines de plusieurs façons:

- Si la protéine est oligomérique, ses sous unités sont séparées les unes des autres.
- Il se fixe sur les protéines, les tapissant de charge négative. Les protéines transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse moléculaire. (Trumel *et al*, 1996)

3.6.3. Electrophorèse en veine liquide (électrophorèse libre) :

Il s'agit de la première méthode électrophorétique décrite. La solution échantillon est placée dans un tube en U et recouverte d'une solution tampon de densité plus faible que celle de l'échantillon pour éviter les courants de convection. Les électrodes sont placées dans le tube où l'on applique le champ électrique. La migration dans ce cas s'effectue au sein d'un liquide constitué par une solution tampon de pH et de concentration convenable dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce type de d'électrophorèse présente de multiples inconvénients (Appareillage coûteux, mise en œuvre longue et délicate, séparation incomplète des particules). (Batamuzi *et al*, 1996)

3.6.4. Electrophorèse de zones :

Les principales applications utilisent un support poreux stabilisant la phase liquide : on parle alors d'électrophorèse sur support ou d'électrophorèse de zones. Le mélange à séparer est déposé sur un support convenable, poreux et imprégné de tampon (papier, dérivés de cellulose, polyoside « agarose », polyacrylamide...). Le support doit être homogène, poreux et

inerte. Cependant, la condition d'inertie n'est jamais respectée et le support joue un rôle plus ou moins important dans la séparation. (Magniez, 2008)

Les différents types d'électrophorèses de zones sont souvent nommés en fonction du type de support :

3.6.4.1. Électrophorèse sur papier :

Assez peu résolutive, cette technique d'électrophorèse est surtout destinée à séparer des molécules de petite taille, dont les acides aminés. Des phénomènes d'interférence liés à la charge des acides aminés et de la cellulose du papier interviennent de façon notable. Une goutte de solution contenant l'échantillon à analyser est déposée sur une bande de papier, puis séchée. La bande de papier est humidifiée avec un tampon convenablement choisi, puis les deux extrémités de la bande sont plongées dans deux réservoirs contenant le tampon. Chaque réservoir est connecté à une électrode. Un champ électrique continu est appliqué, et les acides aminés se déplacent en fonction de leur charge nette. En fin d'électrophorèse, la bande de papier est séchée puis les acides aminés sont révélés par une réaction colorimétrique telle que celle à la ninhydrine. (Séger et Lcotte, 1981)

3.6.4.2 Électrophorèse sur acétate de cellulose :

L'électrophorèse se fait dans des conditions proches de celles de l'électrophorèse sur papier. Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques. (Pasteur, 1987)

3.6.4.3. Électrophorèse sur gel d'amidon :

L'électrophorèse sur gel d'amidon est particulièrement utile l'analyse et la séparation des isoenzymes. Le principe de la technique repose sur une séparation électrophorétiques des protéines sur une matrice poreuse composée d'un gel d'amidon, de pH précis. Les enzymes présentes sont détectées en incubant le gel dans une solution contenant un substrat spécifique de l'enzyme donnant lieu à un produit coloré. Les profils obtenus sont désignés sous le nom de zymogrammes. (Séger et Lcotte, 1981)

3.6.4.4. Électrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode utilisée en biochimie et en biologie moléculaire pour séparer les protéines, l'ADN, l'ARN en fonction de leurs poids moléculaires.

Les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures. (Valiguié, 1993)

3.6.4.5 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

Les gels, formés entre deux plaques de verre, sont obtenus par polymérisation d'un mélange d'acrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) et de bisacrylamide ($\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH} = \text{CH}_2$), ce qui aboutit à la formation d'un réseau réticulé. Les concentrations en acrylamide et le ratio acrylamide/bisacrylamide déterminent la taille des pores et donc les capacités résolutive du gel. Ces techniques peuvent être utilisées pour séparer des protéines ou bien des acides nucléiques (de courte séquence en général) en condition native ou dénaturante.

L'électrophorèse est réalisée à l'aide d'un montage vertical, les échantillons étant déposés dans des puits localisés au sommet du gel. (Magniez, 2010)

3.6.5. Electrophorèse capillaire :

C'est une technique récente qui commence à se développer et qui offre essentiellement les avantages de la rapidité, de la très grande résolution et, partant, de la très grande sensibilité de la détection. L'électrophorèse utilise un capillaire de silice de diamètre d'environ 50 μm et de longueur 1 m (rempli de tampon ou de gel), et des voltages élevés (15 à 30 kV). Ceci aboutit à des vitesses de migration très rapides des composés dans les capillaires et ceux-ci sont détectés par absorption U.V., fluorimétrie ou conductimétrie directement sur le capillaire, donc dans un volume très faible. Ceci fournit donc une sensibilité particulièrement élevée (on injecte seulement quelques nanolitres de l'échantillon). Les domaines d'application sont a priori nombreux : analyse de peptides, d'acides aminés, d'oligonucléotides ... Le nombre de plateaux est de l'ordre de 500 000 par mètre, ce qui fournit une résolution remarquable (on peut séparer des peptides différant d'un acide aminé, des mélanges complexes d'oligonucléotides, des fragments tryptiques de peptides ; la méthode est utilisée pour tester la pureté de peptides ou d'oligonucléotides de synthèse...). La technique peut également s'appliquer à des molécules non ionisées en présence de micelles de détergents appropriés. (Boyer, 1993)

Matériel et méthodes :**1. Région d'étude :**

Dans l'Ouest Algérien exactement trois wilaya (Relizane-Sidi Bel Abbes-Mascara) le climat est aride et semi-aride avec une saison sèche qui dure de 05 à 06 mois, l'été est chaud et sec (Benssaoud 2002). Les pluies sont concentrées sur la saison fraîche de l'hiver à jours courts avec des basses températures (Benabadji 2000). La pluviométrie varie selon les sites de 200 à 450 mm. Le printemps et l'automne sont courts avec des températures modérées. L'élevage bovin laitier occupe une place importante dans l'activité agricole. Les systèmes d'alimentations utilisés durant les saisons étaient comme suit ; utilisation du foin, concentré, d'ensilage d'herbe et de la paille durant l'hiver, utilisation du foin et du concentré durant le printemps avec une période importante de pâturage, utilisation du sorgho en vert, concentré et du chaume en été, et enfin utilisation du foin, du concentré et de l'ensilage de maïs et de sorgho en automne.

2. Matériel :

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire des Sciences et Techniques de Production Animales, de l'Université Abdelhamid Ben badis de Mostaganem. Il est situé dans la commune de Hassi Mamèche. Le tableau N°8 résume le matériel utilisé dans cette étude.

2.1 Appareillage :

Tableau N°8 : matériel utilisé lors des analyses.

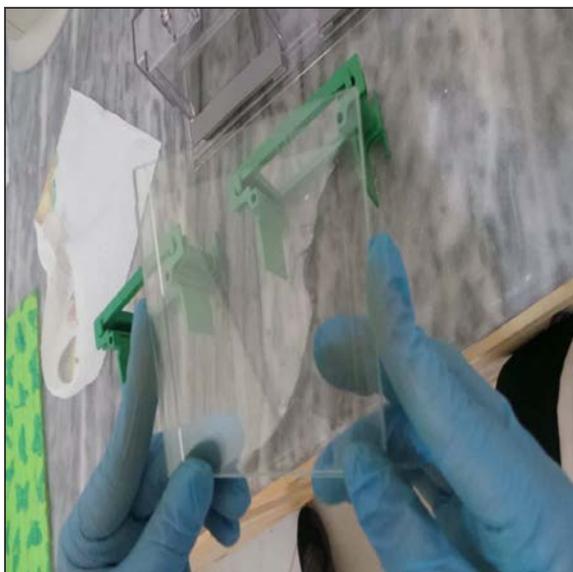
Nature	Désignation
Appareillage	Unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales comprenant : (Figure 4) <ul style="list-style-type: none"> - Une cuve verticale - Générateur de courant - Plaques de verre
	Centrifugeuse type Sigma (Figure 3)
	Utilisation d'un appareil type MilkoScan FT 120
	Une hotte biochimique PSM
	Bain marie
Logiciel informatique	Imagej logiciel pour le traitement des images.



Support



Cuve



Plaques de verre



Peigne

Figure 3 : Appareillage d'électrophorèse.

2.2 Autres matériel et produits :

Les analyses réalisées ont nécessité l'utilisation d'autres matériel complémentaire dont :

- Equipement scientifique (pH-mètre, balance de précision, dessiccateur, agitateur) ;
- Verrerie et consommable de laboratoire ;
- Réactifs spécifiques (réactifs pour électrophorèse, solution étalon, acides organiques, solution alcalines) ;
- Produits biologiques (caséines de référence).

3. Méthodes :

3.1 Provenance des échantillons :

Des vaches de races Holstein ont été conduites dans les mêmes conditions de logement et d'alimentation. Des échantillons du lait de mélange (la traite du matin + la traite du soir) ont été collectés durant deux saisons l'été et l'automne. Ces échantillons ont été collectés après l'opération de la traite dans des flacons de verre opaques stériles et ont été acheminés dans une glacière et conservés à -18°C. Jusqu'à l'analyse.

Le nombre d'échantillons prélevés et analysés était de 27 échantillons par saison, l'objectif de cet échantillonnage était d'avoir un nombre d'échantillon représentatif et métrisable.

3.2 Analyses biochimiques :

Certaines analyses biochimiques ont été préalablement réalisées, à savoir le taux butyreux et le taux de protéines.

- Utilisation de la méthode de référence Jerber pour la détermination du taux butyreux
- Utilisation de la méthode de Kjeldahl pour la détermination du taux de protéine.

3.3 Analyses biochimique spécifiques :

3.3.1 Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl :

3.3.1.1 Principe :

La méthode consiste à transformer l'azote organique ($R-NH_2$) en azote minéral ($(NH_4)_2SO_4$) sous l'action oxydative de l'acide sulfurique concentré et, à chaud, en présence de catalyseur ($CuSO_4, 5H_2O + K_2SO_4$). L'ammoniac est ensuite déplacé par distillation en présence d'hydroxyde de sodium à 32% (piège dans une solution d'acide borique à 4%) et neutralisé enfin par une solution d'acide chlorhydrique 0.1N.

3.3.2 Dosage et détermination des différentes fractions azotées :

- Le dosage de l'azote total est effectué sur le lait cru entier, sans aucun traitement préalable.
- Le dosage de l'azote non caséinique est effectué sur le filtrat après acidification par l'acide acétique à 10%, à pH 4.6 (Yabrir 2014).
- Le dosage de l'azote caséinique est obtenu selon le calcul suivant :
Azote caséinique = azote total – azote non caséinique.

3.3.3 Détermination de la teneur protéique :

Les teneurs azotées de différentes fractions analysées sont converties en teneurs protéiques en utilisant un facteur de conversion égal à 6.38 comme préconisé par CERBULIS et FARELL (1975).

3.3.4 Isolement et extraction des caséines :

3.3.4.1 Ecrémage du lait :

Le lait est chauffé et agité légèrement au bain marie à 60°C afin de permettre la remontée de la matière grasse en surface puis écrémé par centrifugation à 10000 g pendant 10 min.

3.3.4.2 Extraction des caséines du lait :

Le lait écrémé a été pesé puis acidifié à pH 4.6 à l'aide d'une solution d'acide acétique 1N. Les caséines sont séparées des protéines sériques par centrifugation à 10000 g pendant 10

min. Le culot humide a été rincé par l'eau distillée, pesé et réparti dans des tubes eppendorf et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

3.3.5 Comportement électrophorétique :

Les particules chargées soumises à un champ électrique se déplacent en fonction de leur charge, de leur taille et leur géométrie ainsi que, des conditions du milieu. Cette disposition est mise à profit pour la séparation des entités protéiques contenues dans un mélange.

La séparation des protéines des laits collectés a été réalisée en procédant à un type d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide (PAGE) en présence d'urée.

Le gel est formé par copolymérisation d'acrylamide (monomère) et de N-méthylène-bisacrylamide en présence de catalyseurs : le persulfate d'ammonium et le Tétraméthylènediamine (TEMED).

La porosité du gel qui détermine le déplacement des molécules protéiques est contrôlée par la concentration en acrylamide et son monomère. La structure du gel est définie par les indices T (taille des pores) et C (concentration du gel).

En appliquant des protocoles mis au point sur le lait bovin, nous avons réalisé au préalable des essais d'optimisation en faisant migrer des caséines du lait de vache et en procédant à la modification de certains paramètres électrophorétiques (porosité du gel, temps de migration, voltage, conditions de coloration et décoloration...).

Les électrophorèses ont été conduites sur un système de mini-cuves verticales en voltage et ampérage constants. Après la migration, les protéines sont fixés avec l'acide trichloroacétique, colorées avec le bleu de Coomssie et décolorées en utilisant un mélange (eau/ éthanol/ acide acétique). Les étapes de réalisation des séparations sont récapitulées sur la figure N°04.

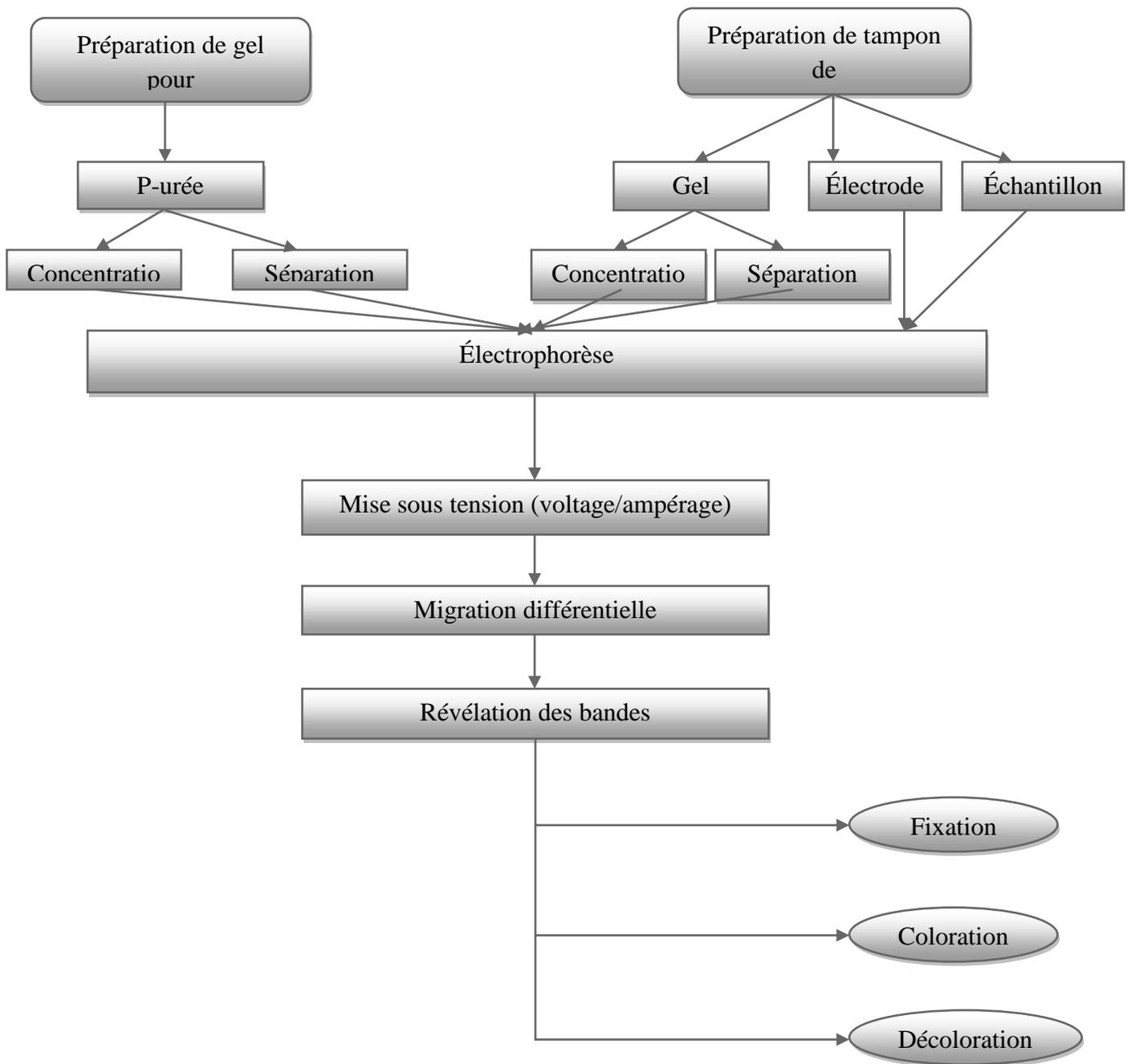


Figure 04 : Les étapes suivies pour la réalisation sur l'électrophorèse

3.3.5.1 Conditions opératoires :

Nous avons utilisé la méthode décrite par LAEMMLI et FAVRE (1973). En condition native, du fait de leur structure micellaire, les protéines sont difficiles à séparer. Dans ce cas, on a recours à l'utilisation d'agent dissociant comme l'urée et d'un agent de réduction des ponts S-S (le β -mercapto-éthanol).

Nous avons utilisé un gel de concentration (T 4.8% ; C 2.7%) contenant de l'urée à 5.7 mol/l et un gel de séparation (T 15%, C 4.15%) contenant la même concentration en urée.

Le tampon gel est composé de TRIS/HCL (pH 8.9). Le tampon d'électrode contient du TRIS 5 mM, glycine 77 mM (pH8.3). Les échantillons protéiques (2mg/ml) sont solubilisés dans une solution contenant le tampon de gel et de l'eau distillée auxquels est ajouté du glycérol (50%), 5% (v/v) de 2-mercapto-éthanol et 0.01% (m/v) de bleu de bromophénol.

Les échantillons subissent alors un traitement thermique à 100°C pendant 5 min. Des dépôts de 20 μ L de caséines + tampon échantillon sont effectués dans les puits du gel. La migration électrophorétique est effectuée sous conditions électriques de 60V pendant 30 min et 100V pendant 02h30min.

3.3.5.2 Révélation des caséines par bleu de Coomassie :

Après migration électrophorétique, les caséines sont fixées dans le gel par l'acide trichloracétique (TCA) à 12% pendant 30 min, puis révélées pendant 30 min par une suspension de bleu de Coomassie R250 à 0.1% (m/v) dans un mélange d'éthanol à 50% (v/v) et de TCA à 5% (m/v).

La décoloration est effectuée par plusieurs lavages dans une solution d'éthanol à 30% (v/v) et d'acide acétique à 7.5% (v/v). Le gel est ensuite séché entre deux feuilles de Cellophane.

3.3.5.3 Quantification des bandes de caséines :

Pour la quantification des bandes de caséines nous avons utilisé le logiciel IMAGEJ qui est un logiciel multiplate-forme et open source de traitement et d'analyse d'images développé par National Institutes of Health.

Résultats et discussion :**1. Evaluation de la qualité biochimique :**

Les analyses de la composition chimique des échantillons du lait de mélange ont été préalablement réalisées, les résultats sont mentionnés dans le tableau N°09. Dans cette étude nous avons étudié seulement l'effet de la saison.

Tableau N°09 : composition chimique moyenne des analysés durant les saisons d'été et d'automne

paramètres		MG (g/l)	MP (g/l)	Caséines (%)
Saisons				
Eté	Juin	33.4	33.25	79.67
	Juillet	32.83	32.72	80
	Août	32.42	32.13	80.52
	Moyenne	32.88±0.84	32.7±0.89	80.6±0.80
Automne	Septembre	34.15	33.12	79.33
	Octobre	34.28	33.16	78.93
	Novembre	33.80	33.15	78.55
	Moyenne	34.07±0.74	33.14±0.81	78.93±1.27
norme		35-40	35-40	/

1.1 Taux butyreux :

Le tableau N°=09 rapporte les moyennes obtenu de la composition chimiques des échantillons du lait collectés durant les saisons de l'été et d'automne.

Les vaches utilisées dans cette étude sont de race Holstein. Selon (Martin *et al*, 2000), cette espèce produit un lait plus riche en matière grasse 37g/l.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le TB varie entre les deux saisons et d'un mois à l'autre, il varie entre 32,42g/l pour le mois d'août et 34,28g/l pour le mois d'octobre, la moyenne la plus élevée est obtenue en automne 34,07g/l et celle d'été et de 32,88g/l. Selon (Vignola, 2002) le taux butyreux du lait de vache se situe entre 35 et 40g/l. Nous remarquons alors que le taux butyreux de nos échantillons est inférieur à la norme. (Bousselmi *et al*, 2010) rapporte une moyenne de 34,5g/l, cette variation est peut-être due aux facteurs alimentaires (Coulon et Remond, 1991).

Dans notre étude le TB a passé de 32,8g/l durant l'été jusqu'à 34,07g/l durant l'automne, cette augmentation peut être expliquée par la nature de la ration distribuée dans les troupeaux étudiés durant cette période et dont l'apport énergétique est important avec l'accroissement de la part d'ensilage de maïs qui conduit à une augmentation du TB.

1.2 Taux protéique :

Pour le taux protéique, les valeurs moyennes sont entre 32,13g/l pour le mois d'août et 33,12g/l pour le mois de septembre avec une augmentation de la moyenne saisonnière (32,7g/l durant l'été à 33,14g/l durant l'automne). Nous remarquons que le taux protéique suit la même allure que le taux butyreux ce qui a été observé par plusieurs auteurs (Agabriel *et al*, 1993). Par contre, nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par (Benaïcha et Sahi, 2009) (28,9g/l et 30,65g/l, respectivement pour le mois d'août et le mois de septembre).

L'augmentation du taux protéique entre les saisons d'été et d'automne et peut être due à l'avancement du stade physiologique et l'accroissement de l'apport énergétique (Colan *et al*, 1991).

1.3 Taux de caséine :

Selon (Grappin et Jeunet, 1979), Le taux de caséine est la différence entre la fraction protéique totale et celle soluble.

Le rapport caséine/protéine a varié entre les deux saisons (78,55% en novembre et 80,52% en août) la moyenne saisonnière est passée de 80,60% durant l'été jusqu'à 78,98% durant l'automne. Cette variation est difficile à expliquer, elle est peut-être due à la nature des aliments distribués au cours des saisons. D'après les résultats obtenus pour le TP et le taux de caséine entre l'été et l'automne peut-être il semble que l'augmentation du taux protéique entre ces deux saisons concerne la fraction des protéines solubles et non la fraction des caséines.

Cette différence du rapport caséine/protéine entre l'été et l'automne peut être aussi expliquée par les vêlages cumulés (Coulon *et al*, 1998), ce rapport diminue d'une façon accélérée du vêlage, car la teneur en caséine s'accroît moins vite que la teneur en protéines solubles (Remond *et al*, 1997).

Nickerson, 1960 a montré qu'en Californie où les vêlages sont répartis sur toute l'année et l'alimentation variant peu, la concentration de la caséine varie peu au cours de l'année.

2. Isolement et comportement électrophorétiques des caséines du lait :

2.1 Analyse d'urée PAGE :

Le tableau N° 10 rapporte les résultats des différents pourcentages de caséines obtenus durant les deux saisons.

Tableau N°10 : composition moyenne de la teneur de différentes fractions de caséines.

Caséines (%)	Eté			Automne		
	Min	Max	Moy	Min	Max	Moy
β caséine	33.44	43.12	43.31	37.45	43.65	41.33
α_2 caséine	05.90	21.60	09.95	05.18	13.86	09.15
α_1 caséine	38.71	44.20	39.80	39.14	43.74	42.18
Kappa caséine	07.58	09.65	6.92	05.22	11.42	07.30
α caséine/ β caséine	1.33	1.52	1.14	1.18	1.31	1.24

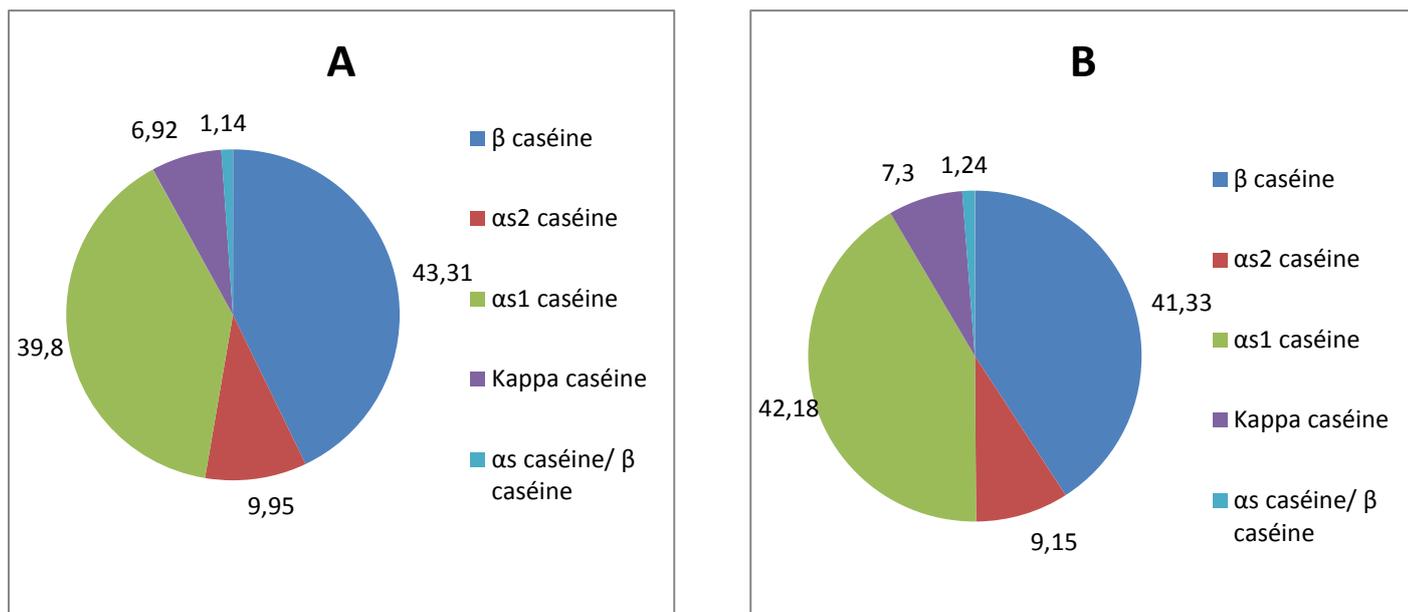


Figure 05 : composition moyenne de la teneur de différentes fractions de caséines durant deux saisons A (été) et B (automne)

Il est bien connu que seuls quatre génotypes de caséines existent, l'hétérogénéité apparente en électrophorèse est due au traitement post préparatoire ou polymorphisme génétique (Varia Cavalli *et al*, 2008). Un électrophorégramme d'urée page de caséinate de lait de vache et sa migration est illustré dans la figure N° 06.

Le groupe de bande avec la mobilité électrophorétique la plus basse est représenté par la Beta caséine, inversement le groupe de bande avec la mobilité électrophorétique la plus élevée est associé à la α s caséines (Silva et Malcata, 2000)

En présence d'urée comme agent dissociant et de 2 mercaptoéthanol comme agent réducteur, il a été possible de séparer les caséines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ces deux agents agissent en dénaturant les molécules protéiques par destruction de leurs structures tridimensionnelles native en rompant les liaisons hydrogènes et les ponts disulfure donc de réduire les interactions entre les différents composants.

Dans le lait bovin, on distingue quatre bande caséiniques bien séparées et qui correspondent à kappa-caséine, Beta-caséine, α 2-caséine et α 1-caséine, en se basant sur la mobilité électrophorétique issue de la littérature (Pesic, 2011).

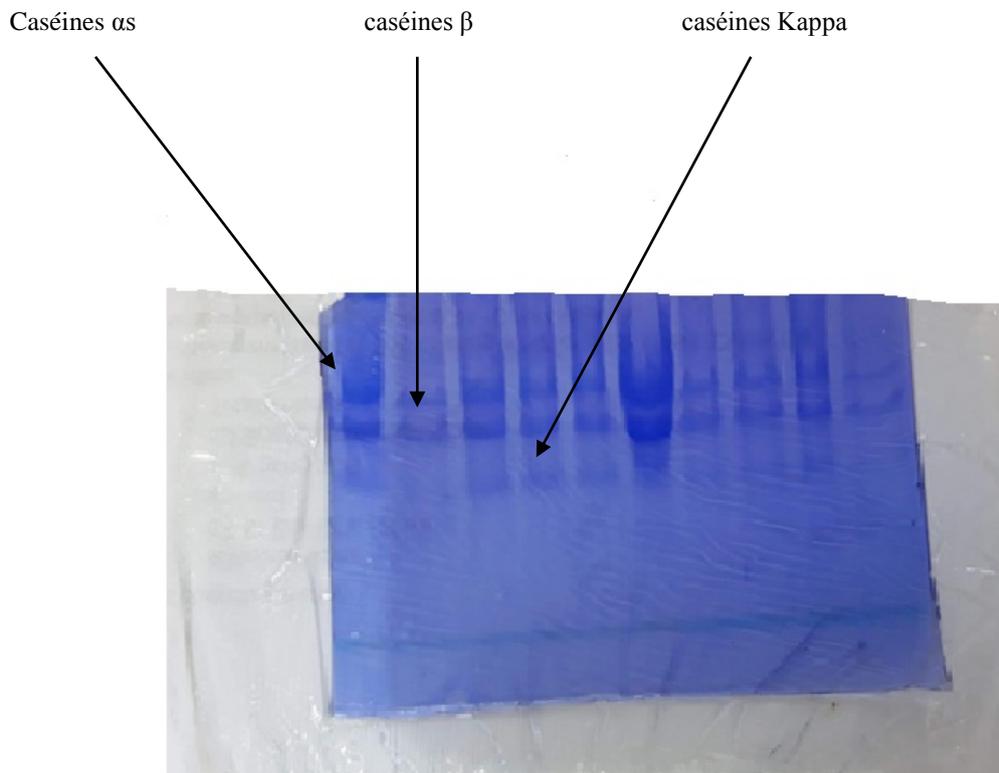


Figure 06 : Electrophorégramme des caséines du lait cru en PAGE urée.

Les caséines bovines ont migrés en quatre bandes dans la plupart des échantillons analysés durant les deux saisons avec une intensité apparente, les deux premières bandes se caractérisent par une mobilité électrophorétique plus élevée et correspondant à la caséine α_1 et α_2 ce même comportement a été observé par (Jc collin *et al*, 1991). De plus ces bandes se distribuent de manière homogène pour tous les échantillons. (Pesic *et al*, 2011) signalent que Kappa caséine et β caséine ont la même mobilité électrophorétique dans le lait des trois espèces ovine, caprine et bovine mais avec une intensité plus importante, ce comportement n'est pas observé dans la présente étude du fait que la Kappa caséine et la Beta caséine n'ont pas la même mobilité électrophorétique. Dans notre étude l'ordre de mobilité des caséines est le suivant : kappa, β , α_1 et α_2 durant les deux saisons avec parfois l'absence de certains bandes dans certains échantillons : le cas par exemple de la bande kappa caséine qui parfois

était difficile à détecter. Cela est probablement dû à des problèmes techniques. (Clement *et al*, 2006) évoquent l'ordre de migration des caséines ovines suivant : α_1 et α_2 , K, β .

Selon (Mayer, 2005) l' α_1 bovine peut être utilisée comme marqueur permettant de mettre en relief la présence du lait bovin dans celui ovin ou caprin d'une part et que d'autre part la PAGE urée peut être aussi considérée comme méthode fiable de détection d'adultération du lait ovin ou caprin par du lait bovin.

2.2 Quantification des fractions de caséines :

Les résultats de quantification de l'urée PAGE exprimés en pourcentages relatifs des caséines α , β et K sont représentés dans le tableau N°11. Regardant les résultats des analyses PAGE, les caséines α_1 et α_2 sont estimées comme le groupe des α caséines parce qu'elles co-migrent (Golfo *et al*, 2004). L'estimation des bandes de K caséine est négligeable puisque son contenu est beaucoup plus faible en comparaison avec celle d' α caséine et β caséine.

La mise en évidence de γ caséine est incertaine, il semble qu'elles étaient affectées par le traitement des échantillons du lait pour cela elles ont été exclues des résultats de quantification du tableau N°11.

Les résultats des pourcentages relatifs de différentes fractions de caséines obtenues dans notre étude sont plus ou moins différents de ceux obtenus dans d'autres études.

Le pourcentage de l' α_2 caséine des échantillons du lait de la saison d'été est entre 5% et 21% avec une moyenne de 09% contre ceux de l'automne qui sont entre 5% et 13% avec une moyenne de 09%, ces résultats sont inférieurs à ceux mentionnés par (Celavia et Burgos, 1998). Dans un lait bovin produit durant la période de forte lactation. (Perisi *et al*, 1996) ont rapportés que le pourcentage d' α_2 varie entre 11.9% et 13.9% en fonction du génotype α_1 du lait bovin.

Le pourcentage d' α_1 est aussi variable entre les saisons avec une moyenne de 39.80% durant l'été et 42.18% durant l'automne, la plus basse valeur de 38.71% est enregistrée en été et la plus élevée aussi en été de 44.2%. Le pourcentage totale d' α caséine est variable avec des moyennes de 49.75% en été et 51.33% en automne, ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus par (Adeo *et al*, 1992) qui ont estimé la valeur d' α caséine entre 43% et 45%. Cette augmentation d' α caséine est due à la quantité d' α_1 qui est plus ou moins élevée par rapport à d'autres études. Cependant Perisi *et al* (1996) rapportent des pourcentages relatifs d' α caséine

entre 45.3% à 50.2% selon les génotypes $\alpha 1$ caséine. Ces valeurs sont proches des valeurs de la présente étude. Il y a un lien entre le variant génétique $\alpha 1$ caséine et la composition du lait qui affecte le rendement du fromage (Chiarese 1997, Pirisi 1996).

Les valeurs de β caséine varient entre 33.44% à 43.12% en été et entre 37.45% à 43% en automne. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Golfo *et al*, 2004). (Law *et al*, 1992) et (Papoff *et al*, 1993) ont trouvé que la β caséine du lait de brebis est estimé d'environ 50% mais (Pirisi *et al*, 1996) rapporte un pourcentage de 40% à 43%. Les valeurs des résultats de notre étude sont plus basses dans certains échantillons, ceci est probablement dû aux performances des vaches laitières utilisées dans cette étude.

Pour la Kappa caséine les valeurs sont très variables et parfois inexplicables du fait de leurs teneurs plus faibles car il s'agit d'un lait cru de mélange et non transformé.

Selon les conclusions (d'Amigo *et al*, 2000) le variant $\alpha 1$ caséine entraîne une baisse teneur en caséine et des propriétés technologiques plus pauvres chez les ovins. Selon les résultats de la présente étude, il est évident qu'un rapport α caséine/ β caséine plus élevé dans le lait bovin est lié à la teneur en protéine du lait et à une grande taille micellaire engendrant un temps de coagulation plus court et un taux de raffermissement approprié.

Pour le rapport α caséine/ β caséine il est apparu que le rapport le plus faible est obtenu dans le lait produit durant la saison de l'automne 1.18, et le plus élevé est obtenu durant la saison de l'été 1.52, d'après ces résultats il semble que le lait le plus adapté pour la transformation fromagère est celui de l'été en se basant sur les travaux de (Golfo *et al*, 2004). Cette différence entre les deux saisons est difficile à expliquer car nous avons travaillé sur les mêmes troupeaux et de la même race, mais on peut dire que la quantité de protéine produite et le taux de caséine obtenu durant les deux saisons sont à la base de cette différenciation au moment où nous avons enregistré une chute notable de la fraction de caséine en automne malgré le taux élevé de protéine en comparaison avec l'été. Cette augmentation du taux de protéine et la diminution du taux de caséine a influencé négativement la qualité de caséine produite durant la saison d'automne en défaveur du rapport α caséine/ β caséine alors qu'en été le taux élevé en caséine n'a pas modifié les fractions de caséine.

Conclusion général

CONCLUSION :

Le lait de vache est un produit alimentaire important pour la population, étant donné l'intérêt que suscite ce produit, il nous a semblé nécessaire d'approfondir les connaissances concernant les composés protéiques de ce lait notamment les caséines qui sont la source de peptides d'intérêt nutritionnel et biofonctionnel.

La présente étude a montré que la composition biochimique des échantillons du lait prélevés et analysés varie entre les deux saisons, et présentent des taux de matières grasses plus élevé en automne qu'en été (34.07 ± 0.74 , 32.88 ± 0.84) respectivement, ces valeurs sont loin des valeurs rapportés dans la littérature, par contre ces laits ont des teneurs appréciables en protéines en comparaison avec ceux d'autres région de l'Algérie surtout en automne (33.14 ± 0.81). La teneur en fraction caséinique était importante en été qu'en automne avec une moyenne de 80.6% contre 78.93%.

L'analyse de la fraction caséinique en conditions de séparation électrophorétiques (PAGE-urée), a donné des profils ayant une grande similitude pour la mobilité électrophorétique entre les différents échantillons des deux saisons et une homogénéité de pourcentage entre les différentes entités de caséines révélés. Toutefois les essais en PAGE-urée demeurent perfectibles et des optimisations complémentaire son à réaliser pour avoir des profils discriminants et assez résolutifs.

Ces résultats mettent l'accent, d'une part sur la richesse des laits analysés en matières protéiques notamment en période d'automne, et leurs richesse en caséine en été, et d'autre part sur les efforts à mener par les éleveurs afin d'homogénéisé la qualité du lait produit durant toute l'année sous l'appui technique des transformateurs fromager.

Références bibliographiques

- **Addeo, F., Mauriello, R., Moio, L., Laezza, P., Chianese, L., Di Luccia, A., 1992.** Ovine casein variant identification using electrophoretic, immunochemical and chromatographic techniques, *Milchwissenschaft* 47 283–287.
- **Agabriel, C., Coulon, J B., Marty, G., Bonaiti, B., 1993.** Facteurs de variations de la composition du lait dans des exploitations à haut niveau de production. *INRA Production Animales.*, 6 (1), 53-60.
- **ALAIS, C., 1984.** Science du lait, principes et techniques laitières. 4e édition, Sepale, Paris.
- **Amigo, L., Recio, I., Ramos, M., 2000.** Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk – a review, *Int. Dairy J.* 10 135– 149.
- **AMIOT, J., FOURNER, S., LEBEUF, Y., PAQUIN, P., SIMPSON, R., et TURGEON, H., 2002.** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In VIGNOLA, C.L*, Science et technologie du lait-Transformation du lait, École polytechnique de Montréal, ISBN:3-25-29 (600 pages)
- **Audigié, CI., Dupont, G., Zonzain, F., 1995.** Principes des méthodes d'analyse biochimique. Tome I. Chap. 2: Méthodes de fractionnement: filtration, sédimentation (centrifugation et ultracentrifugation), électrophorèse, chromatographie. Doin Editeurs, Paris, 7-84.
- **Bach-Nga, PHAM., 2003.** Cahier de formation: Immunoglobulines monoclonales. Biologie médicale. Chap. : Electrophorèse des protéines du sérum. A. Daunizeau. 28: 26-46.
- **Batamuzi, E.K., Kristensen, F., Jensen, A.L., 1996.** Serum protein electrophoresis: Potential test for use in geriatric companion animal health programmes. *J. Vet. Med.*, :501-508.
- **BENABDALLA, H., 2015/2016.** Techniques d'extraction, de purification et de conservation. Mémoire de Master Analyses biochimiques, Université Ferhat Abbas de Sétif.
- **Benaicha, L., Sahi, T., 2009.** Effet de la race sur la composition, la qualité du lait et son aptitude à la coagulation par un succédané de la présure. *Mém. Ing., ENSA –Ex.* INA, El-Harrach, 122 p.

Références bibliographiques

- **Borel, J., Caron, J., Chanard, J., Gougeon, J., Leutenegger, M., Maquart, FX et al., 1985.** Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie. 2^e ed. Paris, Maloine S.A. Éditeur.
- **Bousselmi, K., Djemali, M., Bedhiaf, S., et Hamrouni, A., 2010.** Facteurs de variation des taux de matière grasse et protéique du lait de vache de race Holstein en Tunisie. The factors affecting milk fat and protein of dairy cattle in Tunisia. *Rencontres Recherches Ruminants* 17:399.
- **BOYER, R, F., 1993.** Modern experimental biochemistry reading: Addison-Wesley publishing Company, 114-45
- **BRULE, G., LENOIR, J., 1987.** La coagulation du lait. In: Eck A, Le fromage. Lavoisier, Paris, 1-21.
- **Burgot, G., Burgot, J-L., 2006.** Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications: Méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales. Partie I: Méthodes de séparation chromatographiques et électrophorétiques. Editions Médicales internationales. 2^eème édition, TEC & DOC, 3-194.
- **Calavia, M.C., Burgos, J., 1998.** Ovine κ -casein in milk from Lacha Spanish sheep: heterogeneity and total content, *Int. Dairy J.* 8 779–786.
- **Caron, F., 1988.** Electrophorèse de l'ADN en champ pulsé. *MINI-SYNTHESE. Médecine/Sciences*, 1(4): 46-49.
- **CAYOT, P., LORIENT, D., 1998.** Structures et technofonctions des protéines du lait. Arilait Recherche, Lavoisier, Paris.
- **Chianese, L., Mauriello, R., Ferranti, P., Tripaldi, C., Taibi, L., Dell'Aquila, S., 1997.** Relationship between α s1-casein variants and clotting capability of ovine milk, in: "Milk and milk protein polymorphism", Special Issue 9702, *Int. Dairy Fed.*, Brussels, Belgium pp. 316–323.
- **Clement, P., Agboola, S. O., and Bencini, R., (2006).** A study of polymorphism in milk proteins from local imported dairy sheep in Australia by capillary electrophoresis. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 63-69.
- **Coulon, J., B and Remond, B., 1991.** Variations in milk output and milk protein content in response to the level of energy supply in the dairy cow. *Livestock Production Science*. 29:31-47.
- **COULON, J.B., 1994.** Facteurs de variation du taux protéique du lait de vache en exploitation. *INRA Prod. Anim.*, 4 (4) : 303-309 In **POUGHEON S.**, Contribution a

Références bibliographiques

l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire ,Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France: 59 (102 pages).

- **COURTET LEYAMARIOS, F., 2010.** qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Thèse pour le doctorat vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort, 122p.
- **DEBRY, G., 2001.** Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 21 (566 pages).
- **Delarras, C., 2007.** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Chap. 2: Matériel principal du laboratoire de microbiologie. Edition: TEC & DOC, 23-45.
- **Dhaliwal, A., 2013.** Extraction et purification de l'ADN. Rutgers University, New Jersey, United States.
- **EIGEL, WN., BUTLER, JE., ERNSTROM et al. 1984.** Nomenclature of proteins of cow's Milk: fifth revision. J dairy Sci, **67**: 1599-1631.
- **Foulon, T., Groulade, P., Gros Lambert, M., Gros Lambert, P., Cadore, J., 1996.** Hyperbétoglobulinémies et sous-classes d'igG chez le chien. Étude sur 50 cas. Bulletin de l'académie vétérinaire de France **69** : 87-94
- **FREDOT, E., 2006.** Connaissance des aliments-Bases alimentaires et nutritionnelles de la diététique, Tec et Doc,Lavoisier: 25 (397 pages).
- **GAUCHERON, F., 2004.** Minéraux et produits laitiers, Tec et Doc, Lavoisier:783 (922 pages).
- **Glofo, M., Maria, S., Alexandra, K., Emmanuel, A., 2004.** Casein fraction of ovine milk from indigenous Greek breeds. Le lait, INRA Editions, **84** (3), pp. 285-296. 10.1051/lait:2004006. Hal-00895540.
- **Grappin, R., Jeunet, R., 1979.** Méthodes de routine pour le dosage de la matière grasse et des protéines du lait de chèvre. Le Lait, INRA Editions, 1979, **59** (587), pp.345-360.
- **GRIPPON. JC, 1960.** La protéolyse, le lait matière première de l'industrie laitière, volume3, 3ème édition, p34.
- **HAMMARSTEN, Z., Physiol, Chem., 1883.** 7, 227 et 1885, 9, 273.
- **Hoden, A., Coulon, J.B., 1991.** Maîtrise de la composition du lait : influence des facteurs nutritionnels sur la quantité et les taux de matières grasses et protéiques. INRA Prod, Anim., **4**(5), 361-367.

Références bibliographiques

- <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>
- **JEAN, C., et DIJON, C., 1993.** Au fil du lait, ISBN 2-86621-172-3.
- **JEANTET, R., CROGUENNEC, T., SCHUCK, P, BRULE, G., (2007).** Science des aliments-technologie des produits alimentaires tec et doc, Lavoisier : 17 (456 pages).
- **JOUAN, P., 2002.** Lactoprotéines et lactopeptides: Propriétés biologiques. Ed INRA. Paris.77p.
- **Law, A.J.R., Papoff, C.M., Dalgleish , D.G., Campus, R.L., 1992.** Quantitative fractionation of ovine casein by cation exchange FPLC, *Milchwissenschaft* 47 279–282.
- **LENOIR, J., 1985.** Les caséines du lait. *Rev lait franç*, 440 : 17-23.
- **Lievens, M., Bienvenu, J., Buitrago, JMG., et al, 1996.** Evaluation of four new Tina-quant assays for determination of α -1-acid glycoprotein, α -1-antitrypsin, haptoglobin and prealbumin. *Clin Lab*, 42: 515-520.
- **MAGNIEZ, F., 2008.** L'électrophorèse . Disponible sur : <http://biotechnologie.overblog.com/article-21737522.html> . Publié dans : biotechnologies le Mercredi 2 juillet 2008 (consulté le 01-05-2010)
- **Mahuzier, G., Hamon, M., Ferrie,r D., Prognon, P., 1999.** Chimie analytique. Méthodes de séparation. Tome 2. 3ème édition. Masson, Paris, 1-312.
- **Marshak, D-R., 1996.** Strategies for protein purification and characterization: a laboratory course manual. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **MATHIEU, J., 1999.** Initiation à la physicochimie du lait, Tec et Doc, Lavoisier, Paris: 3 -190 (220 pages).
- **Mayer, B., A. Zolnai, L. V. Frenyo, V. Jancsik, Z. Szentirmay, L. Hammarstroöm, and I. Kacskovics. 2002.** Redistribution of the sheep neonatal Fc receptor in the mammary gland around the time of parturition in ewes and its localization in the small intestine of neonatal lambs. *Immunology* 107:288–296.
- **MC MAHON, DJ., MC MANUS, WR., 1998.** Rethinking casein micelle structure using Electron microscopy. *J. dairy Sci.*, **81**: 2985-2993.
- **MITTAINE, J., 1980.** Les laits autres que le lait de vache, [http://whqlibdoc.who.int/monograph/ who mono](http://whqlibdoc.who.int/monograph/who_mono).
- **Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), 1988.** *Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine*, Collection FAO: Alimentation et nutrition, n° 28, ISBN 92-5-20534-6

Références bibliographiques

- **Papoff, C.M., Law, A.J.R., Dalgleish, D.G., Campus, R.L., 1993.** Determination of the composition of ovine casein by anion-exchange FPLC, *Sci. Tec. Latt. Casearia* 44 273–291.
- **Pasteur, N., 1987.** Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines Paris: Lavoisier.
- **Pesic, M.B., Barac, M.B., Vrvic, M.M., Ristic, M.M., Macej, O.D., Stanojejevic, S.P. and Kostic, A.Z. (2011).** The distribution of major whey proteins in acid wheys obtained from caprine/bovine and ovine/bovine milk mixtures. *International Dairy Journal*, 21, 831-838.
- **POUGHEON, S., GOURSAUD, J., 2001.** Le lait caractéristiques physicochimiques *In DEBRY G., Lait, nutrition et santé, Tec et Doc, Paris : 6(566 pages).*
- **RATTRAY, W., GALLMAN, P., JELEN, P., 1997.** Nutritional, sensory and physicochemical Characterization of protein standardized UHT milk. *Le Lait*, 77: 279-296.
- **Rémond, B., Bonnefoy, J C., 1997.** Performance of a herd of Holstein cows managed without the dry period. *Annales de Zootechnie.* 46, 3-12.
<https://doi.org/10.1051/animres:19970101>
- **Rouessac, A., Rouessac, F. Cruché, D., Duverger-Arfulso, C., Martel, A., 2004.** Analyse Chimique: Méthodes et technique instrumentales modernes. Cours et exercices corrigés. Partie 1: Méthodes séparatives. Chap. 1: Chromatographie, aspects généraux; Chap. 2: Chromatographie liquide haute performance; Chap. 7: Chromatographie d'exclusion stérique. 7e édition. Dunod, Paris, 7-35; 35-60; 115-122.
- **Sandra, Isabelle, Andrée, Simone, POUGHEON., 2001.** Contribution a L'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse Pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, l'Université Paul-Sabatier de Toulouse, 102p.
- **Schwartz, D-C., Cantor, C-R., 1984.** Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* 37: 67-75.
- **Séger, J., Lcotte, G., 1981.** La pratique de l'électrophorèse appliquée à la détection des polymorphismes humains. In : *Technique de laboratoire.* Paris New York Barcelone Milan Mexico Rio de Janeiro , 23-35.

Références bibliographiques

- **Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2000).** Comparative catalytic activity of two plant proteinases upon caprine caseins in solution. *Food Chemistry*, 71, 207–214.
- **Site de Lactel [en ligne], 2008.** <http://www.lactel.fr/> (consulté le 17/06/09)
- **Smith, C-L., Matsumoto, T., Niwa, O., et al., 1987.** An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.*, 15: 4481-4489.
- **SOLEDA, V., 2009.** Fractionnement de protéines du lait par filtration dynamique. Thèse présentée pour l'obtention du grade de doctorat. L'université de technologie Compiègne.
- **THAPON, J.L., 2005.** Science et technologie du lait, Agrocampus-Rennes, France: 14(77 pages).
- **Trumel, C., Schelcher, F., Braun, J.P., Guelfi, J.F., 1996.** L'électrophorèse des protéines sériques: Principes d'interprétation chez le chien, le chat et le cheval. *Rev.Med.vét* :123-130.
- **Variocavalli, S., Sofia, V., Silva, Cecilia Cimino, F.Xavier Malcata, Nora priolo :** Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silibum marianum* flowers. *Food Chemistry*
- **VIGNOLA, C., 2002.** Science et Technologie du lait: Transformation du lait. Ed POLYTECHNIQUE. Canada. 1-29p.

- **Préparation des gels :**

- 1- Gel de concentration :**

- Eau distillé 6,1 ml
- Acrylamide/bisacrylamide 1,3ml
- Tampon 0,5 μ tris Hcl 2,5ml
- Urée 0,5g
- Aps 250 μ l
- TEMED 250 μ l

- 2- Gel de separation:**

- Eau distillé 2,4ml
- Acrylamide/bisacrylamide 5ml
- Tampon 1,5 μ tris Hcl 2,5ml
- Urée 2,4g
- Aps 250 μ l
- TEMED 250 μ l

- **Préparation tampon échantillon:**

- 75m μ tris Hcl
- 240 mg urée
- 50 μ l mercapthoéthanol
- 100 μ l glycérol
- Bromophénol

- **Préparation tampon de migration :**

- Tris 0,12g
- Glycine 0,58g
- Eau distillé 200ml

- **Solution Acrylamide/Bisacrylamide :**

- Acrylamide 14,6g
- Bisacrylamide 0,4g
- Eau distillé 50ml

*** Tampon tris Hcl :**

***1,5 μ :**

- Tris base 18,15g
- Eau distillé 100ml
- pH 8,8

***0,5 μ :**

- Tris base 6g
- Eau distillé 100ml
- pH 6,8

***75 μ :**

- Tris base 0,45g
- Eau distillé 50ml
- pH 8,9