

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abderrahmane MIRA de Bejaia**  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Sciences Alimentaires  
Laboratoire de **Biomathématiques, Biochimie, Biophysique et de Scientométrie**  
*3BS*

**Mémoire présenté par**

**M<sup>lle</sup> AKKOUCHE Zoubida**

En vue de l'obtention du diplôme de  
**Magister en Sciences Alimentaires**

**Option : Contrôle de Qualité des Aliments, Certification et Méthode de**  
Validation

*Thème*

**Effet du traitement thermique sur les  
protéines du blanc d'œuf.**

Devant le jury :

**Président : M. CHIBANE**

Professeur (UAMB)

**Directeur : K. MADANI**

Maître de conférences (UAMB)

**Examineurs : L. MAKHLOUFI**

Professeur (UAMB)

**Y. KACI**

Maître de conférences (USTHB)

**Invitée : L. HARKAT**

Maitre assistante A (UAMB)

**2009-2010**

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Abderrahmane MIRA de Bejaia**  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Sciences Alimentaires  
Laboratoire de **Biomathématiques, Biochimie, Biophysique et de Scientométrie**  
*3BS*

**Mémoire présenté par**

**M<sup>lle</sup> AKKOUCHE Zoubida**

En vue de l'obtention du diplôme de  
**Magister en Sciences Alimentaires**

**Option : Contrôle de Qualité des Aliments, Certification et Méthode de**  
Validation

*Thème*

**Effet du traitement thermique sur les**  
**protéines du blanc d'œuf.**

Devant le jury :

**Président : M. CHIBANE**

Professeur (UAMB)

**Directeur : K. MADANI**

Maître de conférences (UAMB)

**Examineurs : L. MAKHLOUFI**

Professeur (UAMB)

**Y. KACI**

Maître de conférences (USTHB)

**Invitée : L. HARKAT**

Maitre assistante A (UAMB)

**2009-2010**

## *Remerciements*

*Je remercie Dieu le tout puissant pour m'avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.*

*Je remercie Mr Chibane Mohamed qui me fait l'honneur de présider ce jury.*

*Je remercie Mr Makhloufi L et Mr Kaci Y qui me font l'honneur de juger ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à Mr MADANI K pour m'avoir encadré, en me faisant bénéficier de ses connaissances et de ses conseils qu'il trouve ici tout mon respect et ma gratitude.*

*Je tiens également à remercier Mme HARKAT L pour son aide et pour ses conseils qu'elle trouve ici toute ma gratitude.*

*Je tiens aussi à remercier Mr TOUATI A et Mr. BELHADI D.*

*Je remercie très chaleureusement Lyes, Sakina, Nourredinne, Salha, Khadija pour leur aide inestimable, leurs encouragements et leurs conseils.*

*Enfin, mes remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Ceux qui me sont les plus chers au monde : A la mémoire de mon père.  
A ma mère, que Dieu la protège et lui prête une longue et heureuse vie.*

*Mes chers frères ainsi que leurs familles.*

*Ma chère sœur.*

*A Lyes et toute sa famille.*

*Mes amis et amies.*

*Toute la promotion de Magister, Sciences Alimentaires.*

# Sommaire

Liste des abréviations

Liste des annexes

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 01

## *Synthèse bibliographique*

### **Chapitre I : *Structure et composition du blanc d'œuf***

I.1 Description générale de l'œuf de poule .....	04
I.2 Composition générale de l'œuf de poule .....	05
I.3 Le blanc d'œuf ou albumen .....	07
I.3.1 Organisation de l'albumen de l'œuf de poule .....	07
I.3.2 Composition de la fraction non protéique de l'albumen .....	08
I.3.2.1 Les sucres du blanc d'œuf .....	09
I.3.2.2 La fraction inorganique .....	10
I.3.2.3 Les vitamines .....	11

### **Chapitre II : *Protéines du blanc d'œuf***

II.1 L'ovalbumine .....	13
II.1.1 Généralités .....	13
II.1.2 Structure .....	14
II.1.3 Une conformation plus stable, la S-ovalbumine .....	15
II.1.4 Fonctions de l'ovalbumine .....	17
II.2 L'ovotransferrine .....	18
II.2.1 Généralités .....	18
II.2.2 Structure .....	18
II.2.3 Fonctions de l'ovotransferrine .....	19
II.3 Le lysozyme .....	20

II.3.1 Généralités .....	20
II.3.2 Structure .....	20
II.3.3 Fonctions du lysozyme .....	22
II.4 Ovomucine .....	22

### **Chapitre III : Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf**

III.1 Dénaturation des protéines.....	24
III.1.1 Dénaturation thermique des protéines .....	25
III.1.2 Effet de la chaleur sur la structure des protéines globulaires.....	26
III.1.2.1 Dénaturation thermique des protéines globulaires.....	26
III.1.2.2 Agrégation .....	27
III.1.2.3 Coagulation ou gélification.....	28
III.1.3 Effet de la chaleur sur les propriétés fonctionnelles des protéines du blanc d'œuf....	28
III.1.3.1 Sur le pouvoir gélifiant .....	29
III.1.3.2 Sur le pouvoir moussant .....	31
III.1.3.3 Sur le pouvoir aromatique .....	33
III.1.3.4 Sur Le pouvoir liant .....	33
III.1.4 Critères de dénaturation des protéines .....	33
III.1.5 Effets bénéfiques du traitement thermique sur les protéines .....	35

### **Chapitre IV : Interactions protéines-polyphénols**

IV.1 Principe de complexation et liaison intervenantes .....	38
IV.2 Paramètres influençant l'interaction .....	39
IV.2.1 Paramètres liés aux protéines .....	39
IV.2.2 Paramètres liés aux polyphénols .....	40
IV.2.3 Paramètres liés aux conditions du milieu.....	40

## ***Matériel et méthodes***

I. Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf .....	42
I.1 Préparation des échantillons.....	42
I.1.1 Séparation du blanc d'œuf .....	42
I.1.1.2 Préparation de la solution du blanc d'œuf .....	42
I.1.1.3 Traitement thermique de la solution du blanc d'œuf.....	42

<b>I.2</b> Estimation de la dénaturation thermique du blanc d'œuf .....	44
<b>I.2.1</b> Mesure du trouble .....	44
<b>I.2.2</b> Dosage et solubilité des protéines d'albumen.....	45
<b>I.2.3</b> Mesure de la densité .....	45
<b>I.2.4</b> Mesure de la viscosité.....	45
<b>I.2.5</b> NATIVE-PAGE.....	46
<b>I.2.6</b> SDS-PAGE .....	48
<b>II.</b> Analyse de l'interaction des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> –albumen .....	49
<b>II.1</b> Préparation de la solution d'extrait de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	49
<b>II.2</b> Analyses phytochimiques .....	49
<b>II.2.1</b> Dosage des polyphénols totaux .....	49
<b>II.2.2</b> Dosage des tanins totaux .....	50
<b>II.3</b> Mesure de la turbidité des complexes polyphénols-albumen.....	51
<b>II.4</b> Mesure de la solubilité des complexes polyphénols-albumen .....	51
<b>II.5</b> NATIVE-PAGE des complexes écorce –albumen sous traitement thermique .....	52
<b>II.6</b> NATIVE-PAGE des complexes écorce –albumen sans traitement thermique .....	52
<b>III.</b> Analyse statistique .....	52

## *Résultats et Discussion*

<b>I.</b> Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf .....	53
<b>I.1</b> Turbidité.....	53
<b>I.2</b> Solubilité des protéines d'albumen .....	58
<b>I.3</b> Densité .....	61
<b>I.4</b> Viscosité.....	63
<b>I.5</b> NATIVE – PAGE .....	65
<b>I.6</b> SDS – PAGE.....	68
<b>II.</b> Effet de l'addition des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> sur la dénaturation thermique du blanc d'œuf.....	74
<b>II.1.</b> Caractérisation des extraits de la plante .....	74
<b>II.1.1</b> Dosage des polyphénols totaux .....	74
<b>II.1.2</b> Dosage des tannins .....	75
<b>II.2</b> Turbidité des mélanges extrait de <i>Eucalyptus globulus</i> –albumen .....	77

<b>II.3</b> Solubilité des mélanges extrait de <i>Eucalyptus globulus</i> –albumen .....	<b>82</b>
<b>II.4</b> NATIVE – PAGE des mélanges extrait d'écorce–albumen sous traitement thermique .	<b>84</b>
<b>II.5</b> NATIVE – PAGE des mélanges extrait d'écorce –albumen sans traitement thermique	<b>89</b>
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>93</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>97</b>

**Annexes**

## *Liste des abréviations*

**2D PAGE** : Polyacrylamide gel electrophoresis bidimensionnelle

**ANOVA**: Analysis Of Variance

**BSA**: Bovin Serum Albumine (Sérum Albumine Bovine)

**BT** : Blanc d'œuf traité thermiquement

**DO** : Densité Optique

**DSC** : La calorimétrie différentielle à balayage

**E-A** : Ecorce-Albumen

**EAG** : Equivalent en Acide Gallique

**EAT** : Equivalent en Acide Tannique

**Ecorce-prt** : Ecorce-protéines d'albumen

**Feuilles-prt** : Feuilles-protéines d'albumen

**Fruits-prt** : Fruits-protéines d'albumen

**HRPs** : Histidins Rich Proteins (Protéines Riches en Histidines)

**Lys**: Lysozyme

**MS**: Matière sèche

**NATIVE-PAGE** : Native polyacrylamide gel electrophoresis

**Oval**: Ovalbumine

**Ovot**: Ovotransferrine

**PRPs** : Proline rich protein (Protéines Riches en Prolines)

**Prt** : Protéine

**PSA**: Persulfate d'Ammonium

**SDS**: Sodium Dodecyl Sulfate

**SDS-PAGE** : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**T** : Transmittance

**T<sub>D</sub>** : Température de dénaturation

**TEA**: Triéthanolamine

**TEMED**: N, N, N', N'-tétraméthyl-1, 2-diaminométhane

**Tris** : Nom commun du 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol

## *Liste des annexes*

**Annexe 1 :** Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

**Annexe 2 :** Le viscosimètre FANGILAB. SA.

**Annexe 3 :** Solutions utilisées pour la NATIVE-PAGE et SDS-PAGE.

**Annexe 4 :** Résultats de la transmittance mesurée immédiatement après traitement thermique et après 24 heures de conservation à 4°C, ainsi que leurs courbes de comparaison.

**Annexe 5 :** Résultats de la solubilité mesurée immédiatement après traitement thermique et après 24 heures de conservation à 4°C, ainsi que leurs courbes de comparaison.

**Annexe 6 :** Résultats des mesures de la densité.

**Annexe 7 :** Résultats des mesures de la viscosité.

**Annexe 8 :** Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des polyphénols totaux et des tannins.

**Annexe 9:** Résultats de la transmittance des mélanges extraits de *Eucalyptus globulus* (écorce, fruits et feuilles) et protéines du blanc d'œuf.

**Annexe 10 :** Résultats de la solubilité des mélanges extraits de *Eucalyptus globulus* (écorce, fruits et feuilles) et protéines du blanc d'œuf.

**Annexe 11 :** Liste des 20 acides aminés protéinogènes.

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> Coupe schématique d'un œuf de poule .....	05
<b>Figure 2:</b> Composition moyenne de l'albumen (% MS) .....	09
<b>Figure 3:</b> Structure tridimensionnelle de l'ovalbumine.....	15
<b>Figure 4:</b> La thermostabilité de l'ovalbumine native et de la S-ovalbumine .....	16
<b>Figure 5:</b> Les différences structurales globales entre l'ovalbumine native et la S-ovalbumine .....	17
<b>Figure 6:</b> Structure tridimensionnelle de l'ovotransferrine .....	19
<b>Figure 7:</b> Structure tridimensionnelle du lysozyme.....	21
<b>Figure 8:</b> Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine.....	24
<b>Figure 9:</b> Schéma simplifié de la réaction de dénaturation-renaturation.....	26
<b>Figure 10:</b> Principales conséquences d'une augmentation de température T (°C) sur la structure secondaire, tertiaire d'une protéine globulaire .....	26
<b>Figure 11:</b> Représentation schématique de la gélification thermique de protéines globulaires .....	28
<b>Figure 12:</b> Formation de la mousse .....	31
<b>Figure 13:</b> Adsorption d'une protéine à l'interface eau-air .....	32
<b>Figure 14:</b> Structure chimiques d'un tannin hydrolysable (A) et d'un tannin condensé (B) .....	37
<b>Figure 15:</b> Interaction des protéines avec les polyphénols.....	39
<b>Figure 16 :</b> Diagramme récapitulatif du schéma d'analyses réalisées .....	44
<b>Figure 17:</b> Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la turbidité des solutions du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2, mesuré immédiatement après traitement thermique .....	53
<b>Figure 18:</b> Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la turbidité des solutions du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2 mesuré après 24 heures de conservation à 4°C.....	54
<b>Figure 19:</b> Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la solubilité des solutions du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2 mesuré immédiatement après traitement thermique. ....	59

<b>Figure 20:</b> Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la solubilité des solutions du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2 mesuré après 24 heures de conservation à 4°C. ....	59
<b>Figure 21:</b> Evolution de la densité de solution du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2 en fonction de la température et du temps de traitement thermique. ....	61
<b>Figure 22:</b> Evolution de la viscosité de solution du blanc d'œuf (dilué à 1/200) avec le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 en fonction de la température et du temps de traitement thermique. ....	63
<b>Figure 23:</b> Profil électrophorétique native des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min. ....	65
<b>Figure 24:</b> Profil électrophorétique native des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min. ....	66
<b>Figure 25:</b> SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique en présence de $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. ....	69
<b>Figure 26:</b> SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet des traitements thermiques en présence de $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. ....	70
<b>Figure 27:</b> SDS-PAGE des protéines du blanc d'œuf sous l'effet du traitement thermique en absence de $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. ....	71
<b>Figure 28:</b> SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet de traitement thermique en absence de $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. ....	72
<b>Figure 29:</b> Teneur en polyphénols totaux des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> . ....	74
<b>Figure 30:</b> Teneurs en tannins totaux des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> . ....	76
<b>Figure 31:</b> Effet des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> sur la turbidité des protéines du blanc d'œuf. ....	78
<b>Figure 32:</b> Courbes de comparaison de la turbidité des protéines d'albumen seules et celle des complexes protéine-extrait de différentes parties de <i>Eucalyptus globulus</i> . ....	79
<b>Figure 33:</b> Effet des extraits de <i>Eucalyptus globulus</i> sur la solubilité des protéines du blanc d'œuf. ....	82
<b>Figure 34:</b> Courbes de comparaison de la solubilité des protéines d'albumen seules et celle des complexes protéines-extrait de différentes parties de <i>Eucalyptus globulus</i> . ....	83

<b>Figure 35:</b> Profil électrophorétique native des protéines du blanc d'œuf mélangé avec l'extrait d'écorce de <i>Eucalyptus globulus</i> sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min.....	85
<b>Figure 36:</b> Profil électrophorétique native des protéines du blanc d'œuf mélangé avec l'extrait d'écorce de <i>Eucalyptus globulus</i> sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min :.....	87
<b>Figure 37:</b> Profil électrophorétique native des protéines d'albumen mélangées soit avec l'acide tannique, soit avec l'extrait d'écorce de <i>Eucalyptus globulus</i> .....	89

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau I :</b> Proportions des différentes parties de l'œuf de poule .....	05
<b>Tableau II:</b> Composition des parties comestibles d'un œuf de poule de 60g .....	06
<b>Tableau III :</b> Composition d'un œuf cru de 60 g en acides aminés (en mg) .....	07
<b>Tableau IV:</b> Teneurs de l'œuf en minéraux .....	10
<b>Tableau V:</b> Teneur de l'œuf en vitamines .....	11
<b>Tableau VI:</b> Principales caractéristiques des protéines du blanc d'œuf .....	13
<b>Tableau VII :</b> Les différentes formes d'ovalbumine.....	14
<b>Tableau VIII:</b> Température de dénaturation des principales protéines de l'albumen déterminées par DSC .....	30
<b>Tableau IX :</b> Tableau récapitulatif des différents barèmes utilisés.....	43
<b>Tableau X:</b> Les intervalles de température pour chaque phase de gélification d'albumen selon la mesure de transmittance. ....	55

# *Introduction*

## *Introduction*

L'Homme a utilisé les œufs aviaires comme nourriture depuis l'époque préhistorique (Hirose, 2003). Cette réserve de protéines, lipides, minéraux et vitamines est remarquable par la grande diversité des nutriments qu'elle contient et leur haute valeur nutritionnelle, due à un parfait équilibre de ses constituants. L'œuf est donc reconnu depuis toujours comme un aliment de haute qualité nutritionnelle pour l'Homme (Nys et Sauveur, 2004).

Au-delà de leur intérêt nutritionnel, leur fonction première, à savoir la formation d'un nouvel individu, incite à penser qu'ils contiennent de nombreux composés essentiels à la vie, et que par conséquent ils constituent une source potentielle majeure de molécules à activités biologiques susceptibles d'intéresser les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires (Nau et *al.*, 2003).

L'industrie agroalimentaire utilise actuellement largement l'œuf (notamment le blanc d'œuf) comme ingrédient et ce malgré la concurrence de plus en plus forte des produits laitiers. A l'origine de cet intérêt, les nombreuses propriétés fonctionnelles que présente ce dernier (propriétés moussantes et gélifiantes en particulier) (Nau et *al.*, 1995).

Les protéines du blanc d'œuf sont riches en acides aminés indispensables, et possèdent une excellente valeur nutritionnelle, de ce fait elles ont longtemps été considérées comme protéines de référence (Cheftel et *al.*, 1985).

Néanmoins, le blanc d'œuf issu du cassage des œufs est sensible aux contaminations du milieu ambiant (Van der Plancken et *al.*, 2005).

Afin de lutter contre ces contaminations et de protéger le consommateur, le traitement thermique des produits alimentaires à base d'œufs est souvent exigé pour assurer la sûreté microbienne ou pour obtenir des attributs organoleptiques souhaitables (Thapon et Bourgeois, 1994).

Le blanc d'œuf étant un milieu hydraté, visqueux, riche en protéines ; un traitement thermique engendrerait une dénaturation de ses composants, le brunissement non-enzymatique et la coagulation des protéines (Sanchez et Frémont, 2003).

En effet l'augmentation de la température d'une solution protéique, augmente l'énergie de vibration et de rotation des molécules. Au delà d'une certaine amplitude, ces mouvements changent profondément les équilibres entre les interactions faibles qui donnent la stabilité à la conformation globulaire de la protéine. Les chaînes polypeptidiques se déplient et peuvent former un gel voire des agrégats par l'association des molécules entre elles (Appavou, 2005). Cette agrégation entraîne des changements considérables dans les propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines de l'œuf (Van Der Plancken et *al.* , 2006).

Il est donc très important que les industriels de la filière ovoproduits fournissent un produit alliant fonctionnalité et sécurité sanitaire (Lechevalier, 2005).

Pour limiter les effets dommageables du traitement thermique, certains auteurs proposent l'ajout d'additifs afin d'augmenter la stabilité des protéines à la chaleur. Les extraits riches en polyphénols, comme l'acide caféique, contribue à augmenter la stabilité thermique des protéines laitières vis-à-vis de la chaleur (Filion ,2006). Les composés phénoliques sont présents dans les aliments et les matières premières d'origine végétale. La structure chimique de ces substances leur confère une capacité très développée à se fixer sur toutes sortes de molécules, essentiellement les protéines (Cowan, 1999).

Le but de cette étude était d'acquérir des connaissances sur l'effet du traitement thermique sur certaines propriétés de l'albumen. Ces nouvelles connaissances seront utiles à l'amélioration des procédés de pasteurisation et de stérilisation pour en diminuer l'impact négatif des traitements thermiques sur les propriétés technologiques du blanc d'œuf.

Au cours du présent travail, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à une étude bibliographique, relative à la composition et structure de l'œuf, aux protéines du blanc d'œuf et leurs propriétés biologiques, ainsi que l'effet de la chaleur sur ces dernières et enfin nous avons donné un aperçu général sur les interactions protéines-polyphénols.

La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui porte sur l'estimation de la dénaturation thermique des protéines du blanc d'œuf (par mesure de turbidité, de solubilité, densité et viscosité) après avoir réalisé le dosage des protéines. Aussi de suivre l'évolution microstructurale, moléculaire de ces protéines lors des étapes successives de la gélification thermique par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (Native-PAGE) et dénaturantes (SDS-PAGE) en appliquant différents barèmes (température/temps). Puis une étude interactionnelle protéines-polyphénols sur le comportement du blanc d'œuf vis-à-vis des extraits de *Eucalyptus globulus* (écorce, fruits et feuilles) durant le traitement thermique est investie, en analysant la turbidité et la solubilité des mélanges extrait phénolique –albumen , ainsi que l'étude des profils électrophorétiques en conditions natives après avoir réalisé le dosage des polyphénols totaux et tannins.

# *Synthèse bibliographique*

## **Chapitre I : Structure et composition du blanc d'œuf**

### **1. Description générale de l'œuf de poule**

L'œuf se forme progressivement lors de son trajet dans les voies génitales femelles. La cellule œuf située dans l'ovaire se charge en vitellus (jaune) pendant les 6 à 7 jours qui précèdent son émission : les dépôts de substances fabriquées par les cellules hépatiques se font en couches concentriques alternativement riches en protéines (déposées la nuit) et riches en lipides (déposées le jour) ; la cellule œuf migre à la surface de la sphère vitelline. La fécondation de la cellule œuf a lieu ou non, après son émission, dans le pavillon accolé à l'ovaire. Dans l'oviducte, la segmentation de la cellule œuf donne le blastoderme (futur embryon), mais surtout l'œuf et son vitellus se recouvre de protéines (albumen) sous forme relativement concentrée ; la progression s'effectue avec le futur « petit bout » de l'œuf vers l'avant et par rotation ce qui entraîne la formation des chalazes ; ce dépôt dure 3 heures et se termine par la formation de la membrane coquillière double constituée de fibres de kératine. Dans l'utérus, l'albumen se charge d'eau (albumen ou blanc définitif), puis la coquille apparaît grâce au dépôt de carbonate de calcium dans une trame protéique ; une cuticule externe moins poreuse assure une bonne protection de l'ensemble ; l'œuf séjourne dans l'utérus une vingtaine d'heures, avant d'être pondu (Siret, 2009).

L'œuf de poule apparaît sous forme d'une masse ovoïde, d'un poids variant de 55 à 65g selon la race, l'âge de la poule, la période de ponte et l'alimentation (Thapon et Bourgeois, 1994).

Il présente une structure complexe (figure 1) et ses principales parties sont de l'intérieur vers l'extérieur : le jaune ou vitellus, le blanc ou albumen, les membranes coquillières (interne et externe) et la coquille (Linden et Lorient, 1994).

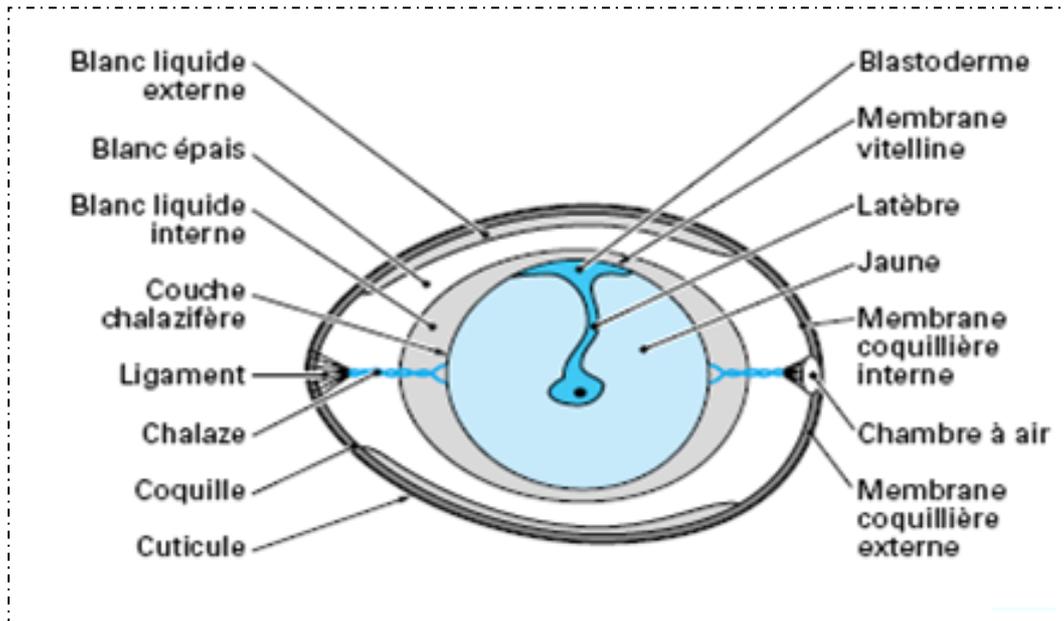


Figure N° 1 : Coupe schématique d'un œuf de poule (Lafon et Lafon, 2009).

## 2. Composition générale de l'œuf de poule

L'œuf de poule est constitué d'une coquille (9 à 12% de son poids), de blanc (60%) et de jaune (30 à 33%) (Mine, 2008).

Les proportions des différentes parties de l'œuf de poule sont données dans le tableau I et la composition de différentes parties comestibles de l'œuf (coquille exclue) dans le tableau II.

Tableau I : Proportions des différentes parties de l'œuf de poule (Lafon et Lafon, 2009).

Parties de l'œuf	Poids moyen (g)	% du poids total de l'œuf	
		moyenne	Extrêmes
<b>Coquille</b>	5,50	9,1	8,5 à 10,5
<b>Membranes coquillières</b>	0,25	0,4	
<b>Blanc</b>	37	61,5	57 à 65
<b>Jaune</b>	17,3	29,0	25 à 33
<b>Sous-total :parties comestibles</b>	54	90,5	89 à 92
<b>Total</b>	60	100	

**Tableau II :** Composition des parties comestibles d'un œuf de poule de 60g (coquille exclue)  
(Lafon et Lafon, 2009).

Composition	En g par œuf			En g pour 100 g de chaque partie		
	Entier	Blanc	Jaune	Entier	Blanc	Jaune
<b>Total</b>	53,5 à 55	35 à 37	17 à 18,5	100	100	100
<b>Eau</b>	39,5 à 41,5	30 à 33	8,0 à 9,2	74,0 à 75,5	87 à 89	46,5 à 49
<b>Matière sèche</b>	13 à 14,3	3,8 à 4,5	8,7 à 10,0	24,5 à 26,0	11 à 13	51 à 53,5
<b>Protéines</b>	6,4 à 7,0	3,3 à 4,0	2,7 à 3,2	12,0 à 12,8	9,5 à 1,5	16 à 17
<b>Lipides :</b>	6,1 à 6,9		6 à 6,8	11,8 à 12,3		33 à 34
<b>-saturés</b>	2,3 à 2,5		2,1 à 2,4	4,3 à 4,5		11,2 à 11,7
<b>-insaturés</b>	3,5 à 4		3,3 à 3,8	6,7 à 7		18,2 à 19
<b>-cholestérol</b>	0,24 à 0,27		0,24 à 0,27	0,47 à 0,50		1,31 à 1,38
<b>Glucides</b>	0,15 à 0,20	0,12 à 0,16	0,03 à 0,05	0,3 à 0,4	0,4 à 0,5	0,15 à 0,25
<b>Cendre</b>	0,45 à 0,55	0,16 à 0,24	0,2 à 0,3	0,8 à 1	0,5 à 0,7	1,1 à 1,6
<b>Valeur énergétique :</b>						
<b>-en cal</b>	88 à 95	14 à 18	74 à 80	160 à 180	40 à 55	380 à 400
<b>-en J</b>	368 à 397	59 à 75	309 à 334	669 à 762	167 à 230	1588 à 1672

C'est un aliment traditionnel au coût peu élevé, il est apprécié pour sa simplicité d'utilisation et ses qualités nutritionnelles, en particulier sa richesse en protéines, vitamines, minéraux et oligo-éléments à haute valeur nutritionnelle. L'œuf entier contient en effet de 10 à 12% de protéines (soit 1/3 de l'extrait sec), d'excellente valeur biologique, particulièrement bien équilibrées en acides aminés essentiels ou non (tableau III) (Nathier-Dufair, 2005).

**Tableau III :** Composition d'un œuf cru de 60 g en acides aminés (en mg) (Lafon et Lafon, 2009).

Acide aminé	Blanc	Jaune
<b>Acide aspartique</b>	380	250
<b>Acide glutamique</b>	480	340
<b>Alanine</b>	210	150
<b>Arginine</b>	210	200
<b>Cystéine</b>	105	50
<b>Glycine</b>	125	85
<b>Histidine</b>	80	75
<b>Isoleucine</b>	190	155
<b>Leucine</b>	300	250
<b>Lysine</b>	235	220
<b>Méthionine</b>	140	70
<b>Phénylalanine</b>	200	120
<b>Proline</b>	150	120
<b>Sérine</b>	240	240
<b>Thréonine</b>	160	150
<b>Tryptophane</b>	60	45
<b>Tyrosine</b>	150	130
<b>Valine</b>	240	170

Il s'agit d'une excellente source de protides et une source modérée de glucides. C'est un véritable aliment bas calories naturel. Le rapport lipides/protéines est de 0,9 comme le bœuf contre 1,2 pour le mouton et 2,2 pour le porc (Hirose, 2003).

### 3. Le blanc d'œuf ou albumen

#### 3.1 Organisation de l'albumen de l'œuf de poule

Le blanc d'œuf ou l'albumen est une masse presque sans couleur, transparente, inodore et liquide. Il représente environ 60% du poids de l'œuf (Thapon et Bourgeois, 1994).

Il n'est pas un milieu homogène mais résulte de la juxtaposition de quatre zones distinctes (figure 1) :

- Blanc liquide externe (23% du blanc liquide total) au contact des membranes coquillières ; c'est cette zone qui s'étale rapidement lorsque l'œuf est cassé sur une surface plane ;
- Blanc épais (57%) attaché aux deux extrémités de l'œuf et présentant l'aspect d'un gel ;

- Blanc liquide interne (17%) renfermé entre le blanc épais et le jaune ;
- Chalazes (3%) sortes de filaments spiralés (Mine, 2008).

Les proportions de chacune de ces différentes couches dépendent de nombreux facteurs : souche, âge et état sanitaire de la pondeuse, durée et mode de conservation de l'œuf, taille de l'œuf, taux de ponte, conditions d'élevage, ...etc (Thapon et Bourgeois, 1994).

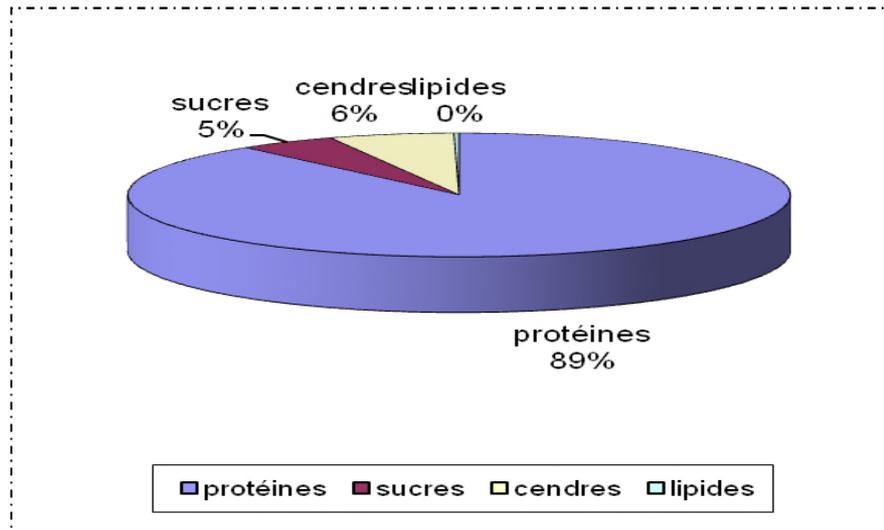
Ces différentes fractions n'ont pas la même composition. La teneur en eau varie de 84 à 89% des couches intérieures vers les couches extérieures de l'œuf. Le blanc épais contiendrait 4 fois plus d'ovomucine que le blanc liquide. Il a une structure de gel qui lui confère une viscosité intrinsèque 40 fois supérieure à celle du blanc liquide à 20°C (Lechevalier, 2005 ; Mine, 2008).

Par sa structure particulière, l'albumen offre une protection mécanique à l'embryon tandis que sa composition chimique traduit son rôle d'élément nourricier et de barrière antimicrobienne (Allemeersch, 1983 ; Mine, 2008).

### **3.2 Composition de la fraction non protéique de l'albumen**

L'albumen, est une solution aqueuse (88,5% d'eau) de protéines (10,5%), de sucres (0,5%) et de sels minéraux (0,5%) (Lechevalier, 2005). On y trouve quelques lipides à l'état de traces (Thapon et Bourgeois, 1994), ce qui représente une grande originalité pour un produit comestible d'origine animale (90% de la matière sèche sont des protéines). Il renferme également du glucose libre (deux fois plus concentré que dans le plasma sanguin) qui constitue la première source d'énergie utilisable par l'embryon (Sauveur, 1988 ; Linden et Lorient, 1994).

La figure 2 donne la composition en pourcentage de la matière sèche (% MS) de l'albumen.



**Figure N° 2:** Composition moyenne de l'albumen (% MS) (Thapon et Bourgeois, 1994).

L'hétérogénéité du blanc d'œuf dépend à la fois des différences de concentration en protéines et des caractéristiques physicochimiques du milieu. Or, au cours du stockage des œufs, des changements de caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des constituants du blanc peuvent intervenir. Ces modifications dépendent des conditions de stockage (durée, température, humidité relative) et consistent essentiellement en une liquéfaction du blanc épais, une augmentation du pH (de 7,5 au moment de la ponte à 9,5 après quelques jours) par départ de CO<sub>2</sub>, une transformation d'ovalbumine en S-ovalbumine et une augmentation de la quantité d'acides aminés libres et de bases azotées (Nathier-Dufair, 2005).

### 3.2.1 Les sucres du blanc d'œuf

Dans le blanc d'œuf, les glucides se trouvent sous 2 formes :

- Une forme libre qui représente 0,5% du poids de l'albumen (glucose à 98%).
- Une forme liée aux protéines sous la forme d'oligosaccharides représentant également 0,5% du poids de l'albumen (essentiellement glucosamine et mannose mais aussi galactose, acides sialiques et galactosamine).

Dans les glycoprotéines animales, seules l'asparagine, la sérine et la thréonine peuvent intervenir dans la liaison protéine-sucres. Ces liaisons peuvent être classées en 2 catégories :

les liaisons N-acylglucosamine et les liaisons séryl et thréonyl O-substituées présentes au sein des protéines du blanc d'œuf (Lechevalier, 2005 ; Mine, 2008).

### 3.2.2 La fraction inorganique

Le blanc d'œuf renferme de nombreux minéraux (tableau IV). De par sa composition minérale, l'albumen est plus proche d'un liquide intracellulaire que d'un liquide extracellulaire (Lechevalier, 2005).

**Tableau IV:** Teneurs de l'œuf en minéraux (Lafon et Lafon, 2009).

Minéral	Contenu total moyen (mg/œuf de 60g)			Valeurs relatives extrêmes (mg/100g de poids frais)		
	Œuf entier sans coquille	Blanc	Jaune	Œuf entier sans coquille	Blanc	Jaune
<b>Sodium</b>	72	62	10	135	140 à 200	40 à 70
<b>Potassium</b>	73	53	20	135	130 à 170	90 à 130
<b>Chlore</b>	93	62	31	170	150 à 180	150 à 180
<b>Calcium</b>	29	3	26	55	7 à 15	100 à 190
<b>Magnésium</b>	6	4	2	11	10 à 12	10 à 12
<b>Phosphore</b>	120	5	115	220	10 à 15	550 à 650
<b>Fer</b>	1,1	-	1,1	2-3	-	5 à 10
<b>Soufre</b>	90	60	30	170	160 à 200	160 à 180

La concentration en ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) ne varie pratiquement pas d'une zone de l'albumen à l'autre. En revanche, la répartition des cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ), dont une partie liée aux protéines, n'est pas homogène. En effet, on retrouve 30% de ces cations dans le blanc épais contre 15% dans le blanc liquide (Thapon et Bourgois, 1994). Ces cations pourraient donc jouer un rôle dans l'acquisition des propriétés visqueuses de l'albumen épais, en particulier par leur fixation sur l'ovomucine  $-\beta$ , riches en acides sialiques chargés négativement (Lechevalier, 2005).

Le blanc d'œuf contient également du gaz carbonique, en équilibre avec le bicarbonate (96% du  $\text{CO}_2$  total), qui joue un rôle fondamental en contrôlant le pH. Comme le  $\text{CO}_2$  diffuse rapidement au travers de la coquille, il est difficile de donner avec précision la teneur du blanc d'œuf en gaz carbonique au moment de la ponte (Nathier-Dufair, 2005).

Dès la ponte, le CO<sub>2</sub> diffuse au travers des pores de la coquille à une vitesse qui dépend des conditions de stockage des œufs, déplaçant ainsi l'équilibre chimique et provoquant l'augmentation du pH. Voisin de 7,5 au moment de la ponte, il s'élève aux environs de 9,3 en 3 à 6 jours puis évolue peu. Les propriétés physiques de la couche externe de la membrane vitelline sont alors légèrement modifiées, augmentant sa perméabilité. Il en résulte, entre autre, des transferts d'eau et d'ions vers le jaune. La composition minérale de l'albumen varie également en fonction de la race des poules et de leur alimentation. Les variations ne sont pas identiques entre les différentes zones de l'albumen (Lechevalier, 2005).

### 3.2.3 Les vitamines

Les vitamines sont, pour la plupart d'entre elles, beaucoup plus abondantes dans le jaune que dans le blanc (Sauveur, 1988). Le blanc est dépourvu de vitamines liposolubles (A, D, E, K) et de vitamine C, il ne contient que quelques vitamines hydrosolubles comme l'acide panthothénique (vitamine PP) et de riboflavine (vitamine B<sub>2</sub>) (tableau V) ; responsable de sa couleur vert-jaune rappelant celle du lactosérum (Thapon et Bourgois, 1994 ; Mine, 2008).

**Tableau V** : Teneur de l'œuf en vitamines (Sauveur, 1988 ; Thapon et Bourgois, 1994).

	Contenu total (par œuf de 60g)		Valeur relative (pour 100g de poids frais)	
	Œuf entier	Blanc	Œuf entier	Blanc
Vitamines liposolubles :				
A (U.I)	150-400	-	250-700	-
D (U.I)	20-80	-	35-150	-
E (mg)	0,6-2	-	1,1-3,5	-
K (mg)	0,01-0,03	-	0,02-0,06	-
Vitamines hydrosolubles :				
Choline (mg)	225	-	410	-
Thiamine(B1) (µg)	52	1 ,5	95	3,5
Riboflavine(B2) (µg)	200	120	300-350	300-450
Nicotinamide (µg)	43	33	60-80	85-95
Pyridoxine (B6) (µg)	68	8	150-200	25
Ac. panthothénique (µg)	830	80	1 200-1 700	190-250
Biotine (µg)	10	2	15-20	5-7
Acide folique (µg)	15	0,5	15-35	1
B12 (µg)	0,5	-	0,7-1,2	-

## **Chapitre II : Protéines du blanc d'œuf**

La synthèse des protéines du blanc d'œuf a lieu dans l'oviducte sous contrôle hormonal. Le nombre total des protéines du blanc n'est pas connu précisément, mais serait supérieur à 40, ce sont des protéines globulaires ayant pour la plupart un point isoélectrique acide (Croguennec, 2000, Jeantet et *al.*, 2007).

Ce sont toutes, à l'exception du lysozyme, de la cystatine et de la "thiamin binding protein", des glycoprotéines (2 à 58% de contenus glucidiques) riches en acides aminés soufrés.

Un certain nombre d'entre elles sont reconnues comme étant particulièrement sensibles aux traitements thermiques (Lechevalier, 2005, Jeantet et *al.*, 2007). La température de dénaturation à pH 7: ovotransferrine, 63 °C ; lysozyme, 75°C ; ovomucoïde, 77 °C ; ovalbumine, 85°C, et d'autres sensibles à la dénaturation de surface (globuline, ovalbumine, ovotransferrine, lysozyme, ovomucoïde et ovomucine par ordre d'importance) (Croguennec, 2000).

Les caractéristiques des principales protéines du blanc sont présentées dans le tableau VI. En plus de leurs propriétés techno-fonctionnelles remarquables, certaines possèdent des propriétés biologiques.

Les fonctions majeures attribuées aux protéines de blanc d'œuf sont la fourniture en acides aminés et le transport d'éléments indispensables pour le développement de l'embryon ainsi que sa protection contre les attaques microbiennes (Lechevalier, 2005 ; Huopalahti et *al.*, 2007).

**Tableau VI:** Principales caractéristiques des protéines du blanc d'œuf (Lechevalier, 2005, Jeantet *et al.*, 2007 ).

Protéines	Proportion (%)	Masse Molaire (Da)	pHi	Glycannes (%)	Propriétés biologiques
Ovalbumine	54	45 000	4,5	3,1	Phosphoglycoprotéine immunogénique
Ovotransferrine	12	77 700	6,5	2,6	Fixe deux atomes de fer
Ovomucoïde	11	28 000	4,1	16,5 à 32,6	Inhibiteur trypsique
Lysozyme	3,4	14 300	10,7	0	Lyse les parois des bactéries Gram +
Ovomucine	3,5	240.10 <sup>6</sup>	4,5-5,0	13 à 58	Inhibe l'hémagglutination virale
Ovoglobuline G2	1	49 000	5,5	5,6 à 6,2	?
Ovoglobuline G3	1	49 000	5,8	?	?
Ovoflavoprotéine	1	29 200	4	11	Fixe la riboflavine (vitamine B <sub>2</sub> )
Ovoinhibiteur	0,1 à 1,5	49 000	5,1	5 à 9,6	Inhibiteur de protéases sériques
Ovoglycoprotéine	0,5 à 1	24 400	3,9	30,4	?
Ovostatine	0,5	7,6 à 9.10 <sup>5</sup>	4,5-4,7	5,8	Inhibiteur de protéases sériques
Cystatine	0,05	12 700	5,1	0	Inhibiteur de protéases sériques
Avidine	0,05	68 300	10	7	Fixe la biotine (vitamine H)
Thiamin Binding protein	?	38 000	?	0	Fixe la thiamine (vitamine B <sub>1</sub> )
Glycoprotéine mineure1	?	52 000	5,7	17,4	?
Glycoprotéine mineure2	?	52 000	5,7	16,4	?
Ch21 (Ex-FABP)	?	18 000	5,2	?	Fixe les acides gras à longue chaîne
CALgamma	?	20 800	6,3	?	?
HEP21	?	10 000	6,7	?	?

## I. L'ovalbumine

### I.1 Généralités

L'ovalbumine est une protéine globulaire, quantitativement la principale protéine du blanc d'œuf (54% de la fraction protéique du blanc d'œuf en poids) (Lechevalier, 2005 ; Huopalahti *et al.*, 2007). Sa séquence et sa structure tridimensionnelle la classe dans la famille des serpins (inhibiteur de protéases à sérine) (Réhault *et al.*, 2007) et leurs homologues non-inhibiteurs dont elle fait partie.

Isolée dès la fin du XIX<sup>ième</sup> siècle par précipitation au sulfate d'ammonium, elle est aujourd'hui facilement purifiée, par cette technique ou par chromatographie d'échange d'ions, ce qui en fait une protéine de choix pour l'étude physico-chimique des protéines globulaires (Lechevalier, 2005).

## I.2 Structure

La séquence polypeptidique compte 385 acides aminés, ce qui lui confère une masse d'environ 45000 Da. La moitié de ces résidus est hydrophobe et un tiers sont des résidus chargés, en majorités acides, lui conférant un pHi de 4,5. Sa structure est globulaire (Huopalahti et *al.*, 2007).

C'est une phosphoglycoprotéine, le premier groupement de phosphore se localise au niveau de la Ser 68 et le second au niveau de la Ser 344 (Huntington et Stein, 2001). Selon le degré de phosphorylation de l'ovalbumine on distingue 03 formes :

L'A<sub>1</sub>-ovalbumine contient deux groupements phosphoryles, la A<sub>2</sub>-ovalbumine contient un seul groupement phosphoryle et l'A<sub>3</sub>-ovalbumine ne contient aucun groupement phosphoryle (Lechevalier, 2005). Les caractéristiques des trois formes sont résumées dans le tableau VII :

**Tableau VII** : Les différentes formes d'ovalbumine (Huntington et Stein, 2001).

	<i>A<sub>1</sub>-ovalbumine</i>	<i>A<sub>2</sub>-ovalbumine</i>	<i>A<sub>3</sub>-ovalbumine</i>
<b>La fraction (%)</b>	85	12	3
<b>pH<sub>I</sub></b>	4,75	4,8	4,94

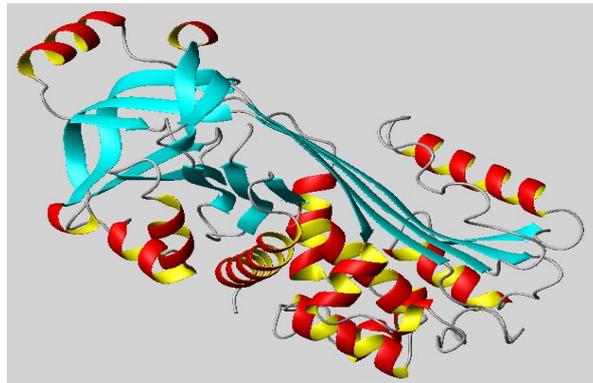
Elle possède un glycanes fixé sur le résidu Asn<sup>292</sup>, de taille variable mais comportant au moins 2 N-acétylglucosamines et 4 mannoses, mais pas d'acide neuraminique (Alais et Linden, 1997). Ce site serait également exposé à la surface de la protéine, permettant au sucre de se trouver dans un environnement hydrophile.

L'ovalbumine est également une protéine soufrée : elle possède 6 résidus Cys enfouis au cœur de la protéine dont 2 sont impliqués dans un pont disulfure (Cys<sup>73</sup> et Cys<sup>120</sup>) (Croguennec, 2000). Alors chaque molécule d'ovalbumine possède un pont disulfure et quatre groupements SH libres, trois de ces groupements sont très réactifs dans la protéine native, le quatrième étant enfoui à l'intérieur de la chaîne polypeptidique. Au cours de la dénaturation thermique, ce quatrième groupement sulfhydryle est démasqué et devient également actif (Thapon et Bourgois, 1994 ; Croguennec, 2000 ; Lechevalier, 2005 ; Huopalahti et *al.*, 2007 ; Jeantet et *al.*, 2007).

C'est la seule protéine du blanc d'œuf qui possède des groupements SH libres pouvant donner lieu à des réarrangements selon les conditions de conservation, pH et de dénaturation de surface (Lechevalier, 2005 ; Jeantet et *al.*, 2007 ; Huopalahti et *al.*, 2007).

C'est une protéine qui est influencée par son environnement ionique ; elle peut fixer du  $Cu^{2+}$  et du  $Mg^{2+}$  au niveau des phosphorines, ce qui réduit la fermeté du gel d'ovalbumine et du blanc d'œuf (Croguennec, 2001).

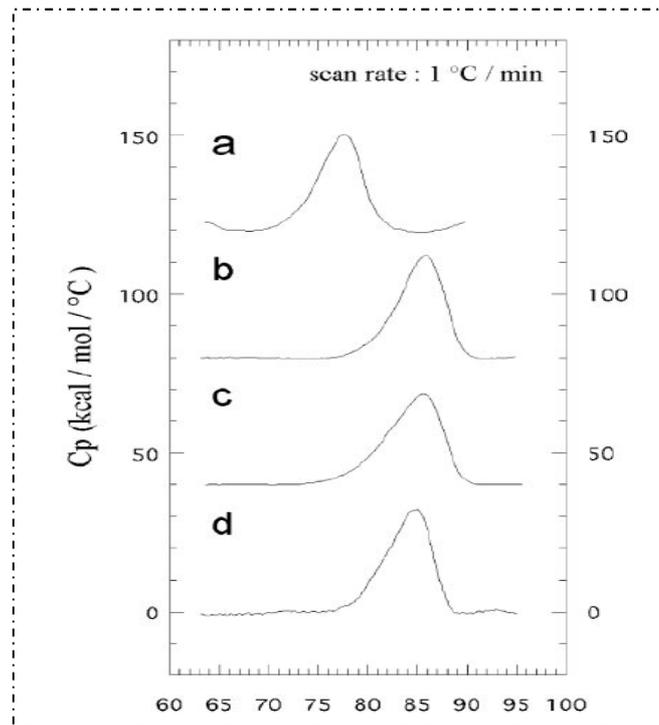
Une part importante de la chaîne polypeptidique est engagée dans les structures secondaires, avec 32% des acides aminés impliqués dans des feuillets  $\beta$ , 30% dans des hélices  $\alpha$  comme le montre sa structure tridimensionnelle (figure 3), déterminée par diffraction des rayons X haute résolution (1,95 Å) (Lechevalier, 2005 ; Huopalahti et *al.*, 2007).



**Figure N° 3:** Structure tridimensionnelle de l'ovalbumine (Lechevalier, 2005).

### **I.3 Une conformation plus stable, la S-ovalbumine**

Lors de la conservation des œufs ou de traitements thermiques modérés en milieu alcalin, l'ovalbumine acquiert une conformation plus thermostable, la S-ovalbumine (Lechevalier, 2005). Des études calorimétriques ont montrés que l'ovalbumine se transforme en S-ovalbumine dans des conditions alcalines *in vitro* (figure 4). Cette transformation dans le blanc d'œuf de poule est due à la sécrétion de dioxyde de carbone au court de stockage par sa coquille et cette sécrétion est responsable de l'augmentation de pH du blanc d'œuf (Yamasaki et *al.*, 2003).



**Figure N° 4 :** La thermostabilité de l'ovalbumine native et de la S-ovalbumine mesurée par DSC dans un tampon phosphate à pH 6 (Yamasaki *et al.*, 2003).

**a :** L'ovalbumine native des œufs fraîches ;  $T_D=77,7^{\circ}\text{C}$

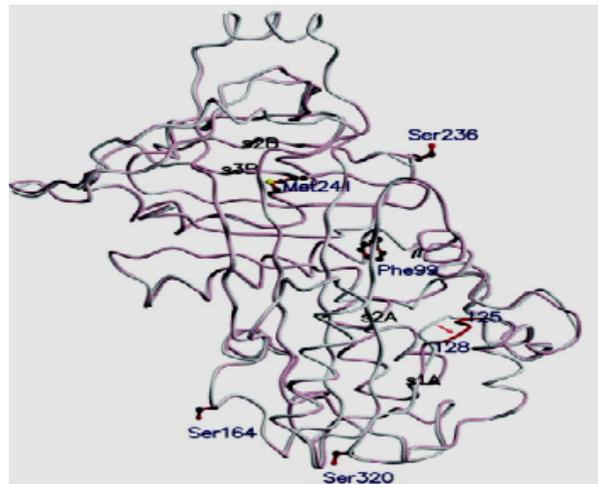
**b :** La S-ovalbumine formée après un stockage de l'œuf pendant un mois à  $30^{\circ}\text{C}$  ;  $T_D=85,8^{\circ}\text{C}$

**c :** La S-ovalbumine produite par un traitement alcalin ;  $T_D=85,5^{\circ}\text{C}$

**d :** La S-ovalbumine pure ;  $T_D=85,1^{\circ}\text{C}$

A pH 9, la température de dénaturation, déterminée par calorimétrie différentielle, de l'ovalbumine est de  $84,5^{\circ}\text{C}$  alors qu'elle est de  $92,5^{\circ}\text{C}$  pour la S-ovalbumine (Lechevalier, 2005), avec un intermédiaire dénaturée à  $88,5^{\circ}\text{C}$  (Huopalahti *et al.*, 2007).

L'augmentation de la stabilité thermique chez la S-ovalbumine est due à un remaniement structural de l'ovalbumine. La structure globale de la S-ovalbumine, y compris la structure de la boucle de centre réactive, est presque identique à celle de l'ovalbumine, excepté le mouvement significatif de feuillets- $\beta$  A<sub>1</sub> loin de feuillets- $\beta$  A<sub>2</sub> (125-128), les changements de la conformation de la chaîne latérale autour de Phe-99 et surtout la remarque la plus saisissante au niveau des trois serines ( Ser-164, Ser-236, et Ser-320 ) qui prennent la configuration-D ( figure 5). Outre ces interactions des études sur la structure secondaire de l'ovalbumine et de la S-ovalbumine ont montré une diminution dans le taux d'hélice  $\alpha$  (de 2,5%) et une augmentation dans le taux des feuillets  $\beta$  (3 à 4%) (Yamasaki *et al.*, 2003).



**Figure N°5** : Les différences structurales globales entre l'ovalbumine native et la S-ovalbumine, la structure de S-ovalbumine (rose) est superposée à la structure d'ovalbumine native (blanc). La flèche rouge représente la distance dans laquelle le feuillet  $\beta A_1$  et loin du feuillet  $\beta A_2$  (Yamasaki et *al.*, 2003).

#### I.4 Fonctions de l'ovalbumine

L'ovalbumine possède des propriétés gélifiantes, moussantes et émulsifiantes qui sont utilisés dans la pratique ; ces propriétés dépendantes de l'état de la protéine ; elles sont réduites quand le taux de S-ovalbumine s'accroît (Alais et Linden, 1997). En plus des propriétés citées, l'ovalbumine joue un rôle dans le développement de l'embryon du poussin (Huntington et Stein, 2001).

Par traitement thermique, l'ovalbumine acquiert une activité inhibitrice de protéase suite à un changement de sa structure secondaire dans la région du site actif. Elle possède donc dans sa séquence primaire toutes les informations pour la formation du complexe serpine-protéase (Lechevalier, 2005).

Deux peptides dérivés de l'ovalbumine présentent des activités anti-hypertensives. Le premier, appelé ovokinine, qui correspond au fragment 358-365, est produit par l'hydrolyse pepsique de l'ovalbumine. Le second, correspondant au fragment 359-364 est libéré lors de l'hydrolyse chymotrypsique de l'ovalbumine, appelé ovokinine(2-7) (Nau et *al.*, 2003).

## II. L'ovotransferrine

### II.1 Généralités

L'ovotransferrine, également appelée conalbumine, représente environ 13% de la fraction protéique du blanc d'œuf (Huopalahti et al., 2007). Elle appartient à la famille des transferrines avec la possibilité de fixer deux atomes de fer par molécule, comme elle présente la particularité de complexer d'autres cations bi et trivalents comme le  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , et le  $Fe^{3+}$  (Cheftel et al., 1985 ; Huopalahti et al., 2007).

Cette protéine a été isolée comme l'ovalbumine par précipitation au sulfate d'ammonium ou de sodium. Elle peut également être obtenue par chromatographie d'échange d'ions (Lechevalier, 2005).

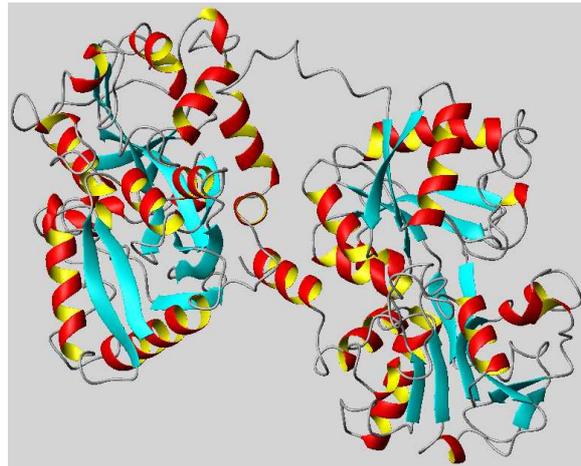
### II.2 Structure

L'ovotransferrine est une simple chaîne polypeptidique contenant 686 acides aminés (PM 77700 Da). Il s'agit également d'une protéine globulaire. Son pHi est proche de la neutralité (6,5). Elle présente une conformation bilobale (figure 6), (lobe N terminal et le lobe C terminal) de conformations similaires, reliés entre eux par une courte séquence peptidique (Ibrahim et al., 1998 ; Huopalahti et al., 2007 ; Jeantet et al., 2007).

La structure bilobale de l'ovotransferrine est maintenue en place par 15 ponts disulfures ; la molécule ne possède aucun groupement SH libre (Ibrahim et al., 1998 ; Lechevalier, 2005 ; Jeantet et al., 2007).

Chaque lobe se divise en deux domaines et contient un site de fixation spécifique du fer dans la cavité formée par la région inter domaine. Chimiquement, ces deux lobes ne sont pas identiques. Le lobe C est maintenu en place par neuf ponts disulfures tandis que le lobe N en possède six (Jeantet et al., 2007).

C'est une glycoprotéine : elle ne possède qu'un seul glycane, composé de trois résidus mannoses et six résidus N-acétylglucosamines, localisé au niveau du résidu Asn<sup>473</sup>. Le rôle du résidu glycane qui n'intervient pas dans la fixation du fer est toujours inexpliqué (Lechevalier, 2005).



**Figure N°6:** Structure tridimensionnelle de l'ovotransferrine (Lechevalier, 2005).

La conalbumine est la plus thermosensible de toutes les protéines du blanc d'œuf lors de la mise en œuvre des traitements thermiques (Thapon et Bourgeois, 1994). Elle coagule vers 63°C (Alais et Linden, 1997).

Néanmoins, la fixation du fer au niveau des sites actifs engendre un changement de conformation de la protéine et sa résistance au chauffage est accrue. De même, l'augmentation de la force ionique permet d'améliorer sa stabilité thermique (Huopalahti et al., 2007).

### II .3 Fonctions de l'ovotransferrine

L'ovotransferrine appartient à la même famille que la serotransferrine et la lactoferrine. Elle fixe le fer de manière réversible et joue ainsi un rôle dans son transport vers les sites de stockage ou d'utilisation et la défense contre les infections bactériennes. Ainsi, elle est capable d'inhiber la croissance de certaines bactéries proliférant dans les aliments telles que *Pseudomonas sp* ou *Escherichia coli* (Huopalahti et al., 2007) . Plus récemment, Ibrahim et al (1998) ont identifié un domaine sur la molécule présentant une activité antibactérienne indépendante de l'inhibition par ferriprivation. Ce domaine est inséré dans la séquence 109-200 sur le lobe N de la protéine ; il inhiberait le développement de *S. aureus* et *E. coli* (Lechevalier, 2005).

Elle possède une certaine action anti-oxydante (Thapon et Bourgeois, 1994) et inhibe les bactéries Gram négatives en les privant du fer nécessaire à leur croissance (Nau et al., 2003).

Actuellement, l'utilisation de l'ovotransferrine se limite au secteur médico-nutritionnel. Les rares applications interviennent dans le traitement d'infections intestinales bactériennes chez les nouveau-nés (Huopalahti et al., 2007).

L'activité anti-hémagglutinante de cette glycoprotéine a tout d'abord été mise en évidence contre le virus influenza du porc, avant d'être confirmée par Tsuge et al. (1996) contre le rotavirus bovin et le virus de la maladie de Newcastle des poules (Nau et al., 2003).

### **III. Le lysozyme**

#### **III .1 Généralités**

Le lysozyme est une protéine globulaire qui représente 3,5% des protéines du blanc d'œuf (Lechevalier, 2005). Découvert au début des années 1920 par Alexander Fleming, fut la première protéine du blanc d'œuf dont on démontra l'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram-positives (Nau et al., 2003), par hydrolyse des liaisons  $\beta(1-4)$  entre l'acide N-acétylmuraminique et le N-acétylglucosamine des mucopolysaccharides de la paroi bactérienne (Lechevalier, 2005). Depuis, le lysozyme s'est avéré efficace contre certaines infections bactériennes et virales, mais il a également été montré qu'il possède des activités anti-inflammatoires et immuno-modulantes (Nau et al., 2003).

Lysozyme est une enzyme omniprésente dans la nature, se produit dans presque toutes les sécrétions fluides du corps, et tissus d'être humain et organismes animaux. Elle a aussi été isolée de quelques plantes, bactéries, et bactériophages. Elle est exceptionnellement abondante dans le blanc d'œuf de la volaille, et l'albumen de l'œuf de poule est la source commerciale majeure de cette enzyme (Ibrahim et al., 1996 ; Huopalahti et al., 2007).

Le lysozyme est classiquement purifié par précipitation à pH 9,5 en présence de NaCl 5%. Il peut également être obtenu par chromatographie d'échange d'ions, ce qui préserve davantage les propriétés fonctionnelles et biologiques de la protéine (Lechevalier, 2005).

#### **III .2 Structure**

Il existe plusieurs types de lysozyme, le plus courant et le plus étudié étant le lysozyme c (celui présent dans l'œuf de poule) (Lechevalier, 2005).

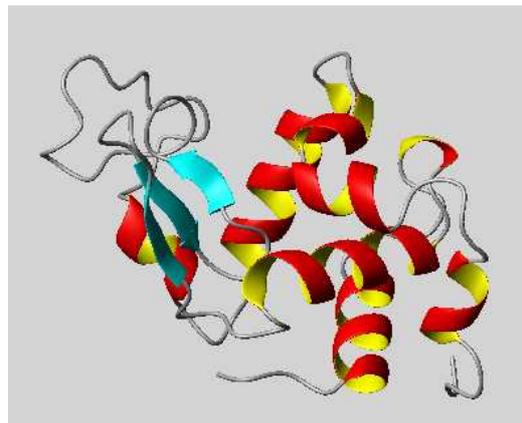
Il présente 129 résidus d'acides aminés, un PM de 14,4 KDa et un pH isoélectrique très élevé de 10,7 (Thapon et Bourgeois, 1994). Environ 40 % de ces résidus sont hydrophobes et un tiers sont chargés, parmi lesquels une proportion importante de résidus basiques, Ceci confère à la protéine respectivement sa structure globulaire et un pHi particulièrement élevé de 10,7.

Le lysozyme est la seule protéine connue du blanc d'œuf avec l'avidine à posséder un pHi basique. Il peut de ce fait former des complexes électrostatiques avec des protéines comme l'ovomucine, l'ovotransferrine ou l'ovalbumine. Le complexe ovomucine-lysozyme est ainsi connu pour jouer un rôle important dans l'évolution des propriétés viscoélastiques du blanc d'œuf au cours du vieillissement (Huopalahti *et al.*, 2007).

Le lysozyme possède quatre ponts disulfures entre les Cys 6 et 127, 30 et 115, 64 et 80, 76 et 94, qui pourront réagir avec les thiols libres de certaines protéines telle l'ovalbumine, par échange SH/SS.

En ce qui concerne la structure secondaire, le lysozyme compte 8 hélices  $\alpha$  pour un seul feuillet  $\beta$ .

La structure tertiaire du lysozyme a été largement étudiée par RMN et rayons X (figure 7). La chaîne est repliée sur elle même de manière à ce que les quarante acides aminés N-terminaux forment un domaine globulaire compact avec un corps hydrophobe enfermé entre 2 hélices  $\alpha$ . Un second domaine plus hydrophile (40-85<sup>ème</sup> acides aminés) constitue une face de la cavité du site actif du lysozyme. Le reste de la chaîne remplit l'espace entre les deux domaines et lie la cavité du site actif aux résidus hydrophobes. Tous les résidus polaires chargés, à une ou deux exceptions près, sont exposés à la surface de la protéine, les groupements apolaires ou hydrophobes sont en grande majorité enfouis à l'intérieur, les flancs non polaires des hélices se tassant les uns contre les autres. Le feuillet  $\beta$ , plus exposé au solvant, est entièrement hydrophile (Lechevalier, 2005 ; Huopalahti *et al.*, 2007).



**Figure N°7** : Structure tridimensionnelle du lysozyme (Lechevalier, 2005).

### III .3 Fonctions du lysozyme

Le Lysozyme est une enzyme (CE.3.2.1.17), connu aussi comme une muramidase et N-acetylmuramique hydrolase (Thapon et Bourgeois, 1994) ; une enzyme qui appartient à la classe des enzymes qui lyse les parois des cellules bactérienne Gram + (Lechevalier, 2005), de ce fait elle est potentiellement utilisée comme un agent antimicrobien dans les aliments et les médicaments (Ibrahim et *al.*, 2002).

Des chercheurs ont également constaté que le lysozyme de blanc d'œuf possédait une activité bactéricide autre que l'hydrolyse enzymatique des parois bactériennes. Cette activité contre les bactéries Gram + et Gram – peut être obtenue par dénaturation partielle du lysozyme (Huopalahti et *al.*, 2007).

Ces propriétés bactéricides assurent à l'embryon une protection contre les invasions bactériennes et sont exploitées industriellement. Ainsi, le lysozyme a été largement utilisé dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite pour prévenir les défauts liés à une contamination par *Clostridium tyrobutyricum* (Lechevalier, 2005), et en raison de son inactivité vis-à-vis des souches de fermentation et des cultures secondaires nécessaires à l'affinage des fromages. Le lysozyme peut également limiter la croissance de bactéries pathogènes dans les aliments réfrigérés : *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium jejuni* et *Yersinia enterocolitica* sont sensibles à l'activité lytique du lysozyme (Nau et *al.*, 2003).

Il est également utilisé en tant que conservateur naturel, notamment au Japon, pour prolonger l'état de fraîcheur des légumes et des aliments à base de produits de la mer ou de produits carnés.

Les propriétés du lysozyme sont également exploitées dans les thérapies contre des infections virales ou bactériennes notamment au niveau de la cavité buccale (Lysopaïne®). Le lysozyme s'utilise également comme analgésique et comme agent stimulant dans les traitements antibiotiques (Huopalahti et *al.*, 2007).

### IV. Ovomucine

L'ovomucine est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Réhault et *al.*, 2007). La sous unité  $\alpha$  moins glycosilée (10 à 15%), la sous unité  $\beta$  très fortement glycosilée (50 à 65%) (Davis et Reeves, 2002). Son poids moléculaire est d'environ  $10^7$  Da. Très riche en sucres (33%) se présentant sous forme de fibres ultramicroscopiques flexibles (2000-3000 nm de longueur) (Thapon et Bourgeois, 1994), ce qui confère un aspect gélatineux au blanc et

limite de ce fait la dissémination des microorganismes (Réhault et *al.*, 2007), Elle représente 1,5 à 3,5% des protéines du blanc d'œuf (Davis et Reeves, 2002).

Cette protéine est insoluble dans l'eau et soluble dans les solvants saline de pH supérieur ou égal à 7(Linden et Lorient, 1994), elle peut être précipitée par simple dilution de l'albumen avec de l'eau distillée (pH 6 à 8) ou en abaissant le pH de l'albumen au voisinage de 4 (Thapon et Bourgeois, 1994).

Elle est assez thermorésistante mais elle est sensible à la dénaturation de surface (Alais et Linden, 1997); elle contribue à la stabilisation des mousses à froid mais n'ont aucune partie dans la formation de mousse (Cunningham, 1976 ; Thapon et Bourgeois, 1994).

Cette protéine peut s'associer avec plusieurs protéines du blanc d'œuf : ovalbumine, l'ovotransferrine mais surtout avec le lysozyme (Thapon et Bourgeois, 1994). Ceci explique la présence du lysozyme dans les quantités de 15 à 20% dans les préparations d'ovomucine (Guerin et Brulé, 1992 cité par Davis et Reeves, 2002). La conalbumine et l'ovalbumine étaient également présentes dans le précipité d'ovomucine en quantité indéterminée (Ferreira et *al.*, 1999).

L'ovomucine est un inhibiteur de l'hémagglutination virale (agglutination des hématies) (Alais et Linden, 1997). Son activité antivirale a été observée vis-à-vis du virus de la maladie de Newcastle de poule, du rotavirus bovin et du virus de la grippe humaine *in vitro* (Réhault et *al.*, 2007).

### Chapitre III : Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf

Les traitements thermiques appliqués au cours des procédés de fabrication entraînent dans une très grande majorité des cas des modifications conformationnelles des protéines alimentaires, le cas des protéines du blanc d'œuf pouvant conduire à leur gélification (Sanchez et Frémont, 2003).

Les traitements de stabilisation tels que la pasteurisation ou le séchage doivent agir sur la flore microbienne sans altérer les propriétés fonctionnelles de l'aliment (Thapon et Bourgeois, 1994).

#### 1. Dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est due soit à des agents physiques (température, haute pression, actions mécaniques ...etc.) ou à des agents chimiques (urée, détergents, solvants, acides et bases...etc.) (Campbell *et al.*, 2003 ; Navizet, 2004).

Elle peut être considérée comme toute modification de la conformation (au niveau des structures secondaire, tertiaire et quaternaire) qui n'est pas accompagnée par la rupture de liaisons peptidiques impliquées dans la structure primaire (Cheftel *et al.*, 1985). Elle comprend 2 étapes (figure 8) : quand la protéine se déplie et perd sa forme spécifique, on dit qu'elle est *déployée*, la suppression de l'agent dénaturant permet sa renaturation. La deuxième étape de la dénaturation consiste en un passage de l'état *déployé* en un état *dénaturé* par établissement de liaisons secondaires non spécifiques (Berrada, 2009).

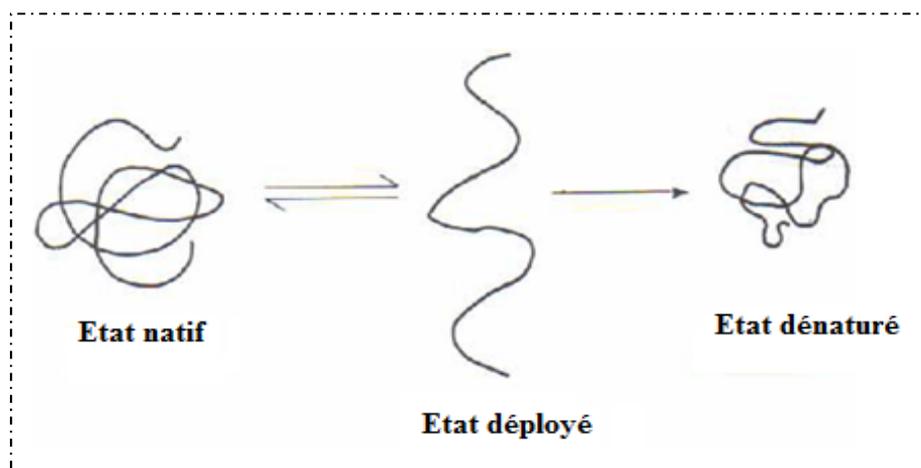


Figure N°8 : Dénaturation réversible et irréversible d'une protéine (Berrada, 2009).

Selon les protéines et les conditions expérimentales, la dénaturation peut être réversible ou irréversible. Dans la dénaturation réversible, la formation d'interactions inter ou intramoléculaires est suivie d'un retour à la conformation native. Quand les ponts disulfures contribuent à la conformation de la protéine et qu'ils sont rompus, la dénaturation est souvent irréversible (Cheftel et *al.*, 1985 ; Linden et Lorient, 1994). La protéine dénaturée est généralement plus flexible, moins compact, plus hydratée, plus sensible aux enzymes protéolytiques et d'un point de vue thermodynamique plus désordonnée que la protéine native (Hagolle, 1997 ; Weil, 2001).

### **1.1 Dénaturation thermique des protéines**

Parmi les agents physiques susceptibles de dénaturer les protéines, la chaleur est la plus connue ; la coagulation du blanc d'œuf est un exemple bien familier (Yon, 1969 ; Cheftel et *al.*, 1985 ).

La chaleur provoque une dénaturation dont l'étendue dépend de la température et de la durée de chauffage (Thapon et Bourgeois, 1994).

Le blanc d'œuf est un milieu hydraté, visqueux, riche en protéines, un traitement thermique de ce type de milieu engendre une dénaturation de ses composants. Les protéines subissent sous l'effet de la température un remaniement structural. Ce remaniement à l'échelle moléculaire a un effet direct sur les propriétés fonctionnelles des protéines (Sanchez et Frémont, 2003).

L'augmentation de la température d'une solution protéique, augmente l'énergie de vibration et de rotation des molécules. Au delà d'une certaine amplitude, ces mouvements changent profondément les équilibres entre les interactions faibles qui donnent la stabilité à la conformation globulaire de la protéine. Les chaînes polypeptidiques se déplient et peuvent former un gel voire des agrégats par l'association des molécules entre elles. Enfin, la chaleur agit sur la capacité calorifique de la protéine sachant que la valeur de celle-ci est plus petite lorsque la molécule est repliée dans son état natif (figure 9) (Appavou, 2005).

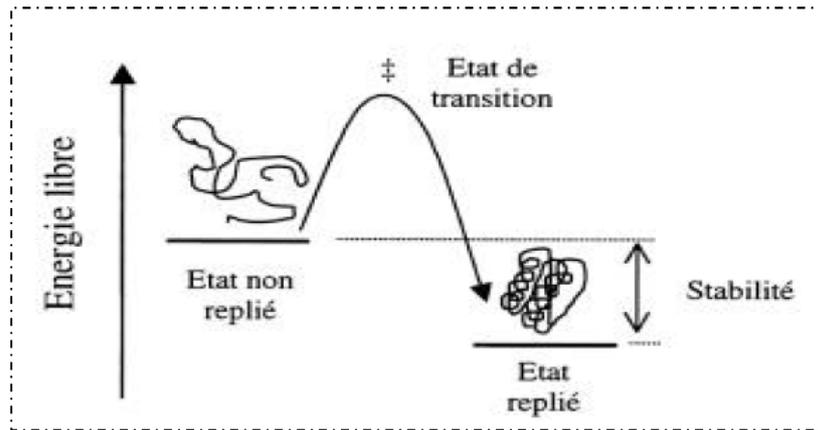


Figure N°9 : Schéma simplifié de la réaction de dénaturation-renaturation (Appavou, 2005).

## 1.2 Effet de la chaleur sur la structure des protéines globulaires

Les modifications de structure des protéines globulaires, résultant d'un traitement thermique, peuvent conduire à la formation d'un coagulum ou gel thermo-irréversible. Cette gélification peut se décomposer en plusieurs étapes successives : dénaturation des protéines, agrégation et coagulation ou gélification (Lechevalier, 2005).

### 1.2.1 Dénaturation thermique des protéines globulaires

Le chauffage d'une protéine globulaire provoque s'il est d'intensité suffisante des changements conformationnels irréversibles se traduisant par une perte de structure secondaire et tertiaire (figure 10), c'est la phase de dénaturation (Campbell et *al.*, 2003).

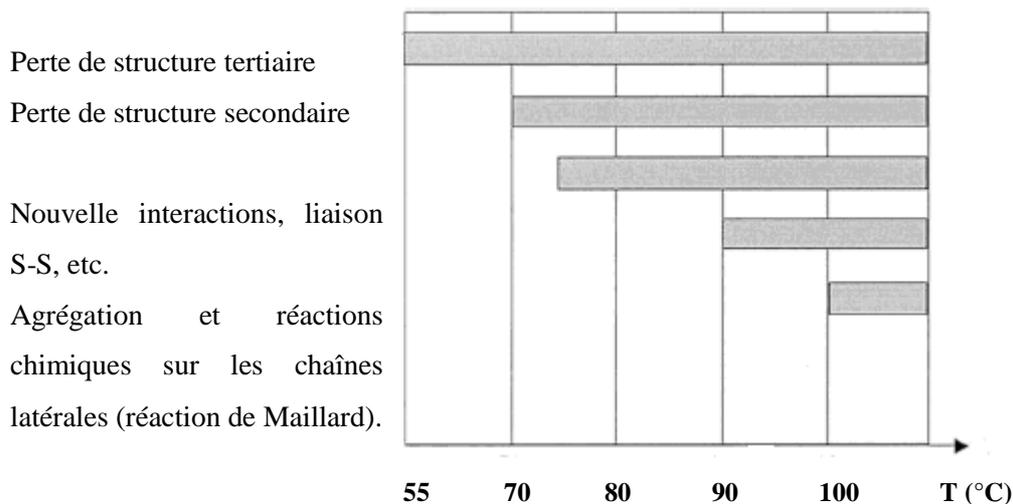


Figure N°10 : Principales conséquences d'une augmentation de température T (°C) sur la structure secondaire, tertiaire d'une protéine globulaire (Sanchez et Frémont, 2003).

Pendant cette étape, la molécule protéique se déplie et adopte une conformation différente de celle à l'état natif. Par conséquent, il y'aura exposition des groupements hydrophobes tel que les groupements sulfhydriles. Cet effet hydrophobe au niveau de la structure secondaire signifie habituellement qu'il y a une petite diminution de la proportion des hélices  $\alpha$  et une augmentation de celle des feuillets  $\beta$  (Campbell et *al.*, 2003).

D'autres changements structuraux peuvent être induits par un chauffage tel que rupture de ponts disulfures et réaction de Maillard (figure 10). Il est cependant utile de préciser que le niveau de dénaturation et d'agrégation subie par une protéine dépend de sa structure initiale et de sa concentration, de la température, du temps de chauffage et du mode de chauffage utilisé, des paramètres environnementaux (pH et force ionique) et de la présence d'autres molécules (Sanchez et Frémont, 2003).

La sensibilité d'une protéine à la dénaturation est fonction de la vitesse avec laquelle l'agent dénaturant va rompre les interactions ou liaisons qui stabilisent les structures secondaire, tertiaire ou quaternaire. Comme ces structures varient d'une protéine à l'autre, les effets des agents dénaturant dépendront de la protéine (Cheftel et *al.*, 1985 ; Linden et Lorient, 1994).

### **1.2.2 Agrégation**

La dénaturation est suivie par une phase d'agrégation des protéines dénaturées formant alors des structures supramoléculaires appelées agrégats dont le diamètre apparent peut atteindre des dizaines de micromètres (Sanchez et Frémont, 2003).

L'agrégation est due aux interactions protéine-protéine avec formation de complexes de masse moléculaire élevée. L'association des molécules résulte d'un équilibre entre forces attractives et répulsives.

Les agrégats peuvent être de deux types en fonction de la charge portée par la protéine native :

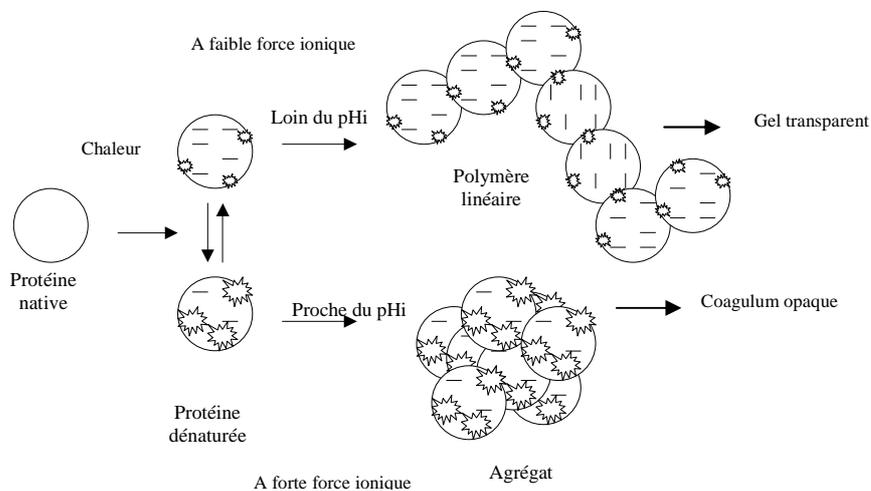
- Des agrégats linéaires ou filamenteux quand les forces de répulsion sont importantes (pH extrêmes, faible force ionique,...). Dans ce cas, l'étape d'association est plus lente que celle de dénaturation et les interactions protéines-solvant restent importantes. Les agrégats formés sont fortement hydratés et peuvent rester solubles jusqu'à une taille critique.
- Des agrégats dits "aléatoires" ou coagulum quand les forces de répulsion sont faibles (pH voisin du pHi, forte force ionique,...). L'agrégation intervient alors avant la dénaturation, les interactions protéine-protéine sont favorisées et les agrégats se présentent sous l'aspect de "paquets" de molécules (Lechevalier, 2005).

### 1.2.3 Coagulation ou gélification

L'augmentation de la connectivité entre les agrégats formés peut conduire à la formation d'un gel ou d'un coagulum, selon le type d'agrégats présents.

Ainsi, les réseaux formés à partir d'agrégats linéaires sont fins, transparents et emprisonnent une grande quantité d'eau. On parle de gel. A l'inverse, les réseaux formés à partir d'agrégats "aléatoires" ont des zones de jonction du réseau tridimensionnel constituées d'un grand nombre de protéines. Ils sont plus opaques, se déforment moins à la rupture et sont davantage sujets à des phénomènes de synérèse. On parle alors de gel particulaire ou coagulum.

Une représentation schématique des deux types de gels est proposée en figure 11 (Lechevalier, 2005).



**Figure N°11** : Représentation schématique de la gélification thermique de protéines globulaires (Croguennec, 2000 ; Jeantet et *al.*, 2007 ).

### 1.3 Effet de la chaleur sur les propriétés fonctionnelles des protéines d'albumen

En plus de leurs hautes qualités nutritionnelles, les protéines du blanc d'œuf sont bien connues pour leurs propriétés gélifiantes ou coagulantes et moussantes. La corrélation entre les propriétés structurales des protéines de l'albumen et leurs propriétés fonctionnelles a fait l'objet de plusieurs études. Comme le traitement thermique est souvent requis pour assurer une sécurité hygiénique ou obtenir des qualités organoleptiques souhaitables des produits alimentaires contenant du blanc d'œuf, une grande attention était portée sur les changements des propriétés structurales du blanc d'œuf responsables des modifications des propriétés fonctionnelles (Van der Plancken et *al.*, 2005).

La pasteurisation est connue comme étant l'un des traitements les plus nuisibles pour les propriétés moussantes et gélifiantes du blanc d'œuf (Lechevalier, 2005).

### **1.3.1 Sur le pouvoir gélifiant**

Ce pouvoir est dû à une dénaturation irréversible des protéines de l'albumen, principalement de l'ovalbumine sous l'action de divers agents physiques (chaleur, action mécanique) (Thapon et Bourgeois, 1994). Cette gélification consiste en une rupture des liaisons intramoléculaires provoquant un dépliement des molécules protéiques avec formation de nouvelles liaisons intermoléculaires, par conséquent il y a changement de structure secondaire avec un passage de la forme  $\alpha$  à la forme  $\beta$  plissée (moins soluble) (Linden et Lorient, 1994), il se forme ainsi un réseau fibrillaire protéique (gel) dans lequel l'eau et les substances solubles sont emprisonnées (Thapon et Bourgeois, 1994).

Le réseau du gel protéique est généralement formé via des interactions non covalentes telles que les interactions hydrophobes, ponts hydrogènes, ou bien avec des interactions électrostatiques et moins fréquemment par interactions covalentes telles que les ponts disulfures (Mine, 1995).

Le blanc d'œuf est utilisé comme agent gélifiant et épaississant afin d'améliorer la consistance des produits alimentaires (Ngarize et *al.*, 2004 ; Ngarize et *al.*, 2005). Cette propriété est recherchée dans l'industrie de cuisson telle que la pâtisserie (les gâteaux, les flans, les crèmes anglaise et les gâteaux) et la charcuterie (quenelles, surimi, saucisses...) (Thapon et Bourgeois, 1994 ; Davis et Reeves, 2002).

Le blanc perd sa fluidité vers 62 C° mais le maximum de fermeté est atteint au-delà de 70C°. Les protéines du blanc d'œuf n'ont pas toutes le même comportement vis-à-vis de la chaleur (tableau VIII) (Nathier-Dufair, 2005 ; Jeantet et *al.*, 2007).

En chauffant le blanc à 10°C/min, deux pics principaux de variations enthalpiques apparaissent entre 60 et 65°C pour le premier et entre 80 et 85°C pour le second, correspondant respectivement à la dénaturation de l'ovotransferrine et de l'ovalbumine. Un pic intermédiaire peut être visible et correspond à la dénaturation du lysozyme (Lechevalier, 2005).

**Tableau VIII :** Température de dénaturation des principales protéines de l'albumen déterminées par DSC (Lechevalier, 2005).

Protéines	Température de dénaturation			
	Dans le blanc d'œuf		En solution aqueuse	
	pH 7	pH 9	pH 7	pH 9
Ovalbumine	84,5	84,0	84,0 <sup>a</sup>	84,0 <sup>a</sup>
Ovotransferrine	65,0	69,5	61,0 <sup>b</sup>	62,0 <sup>b</sup>
Lysozyme	74,0	-	75,0 <sup>a</sup>	72,5 <sup>a</sup>

a : eau

b : tampon tris -HCl

Après dénaturation par un traitement thermique, les protéines du blanc d'œuf préalablement dépliées par chauffage agissent l'une sur l'autre dans des conditions favorables pour former un gel. La fermeté des gels est corrélée avec l'intensité du traitement thermique (Campbell et al., 2003 ; Lechevalier, 2005).

La formation d'un gel est un processus compliqué et elle est généralement affectée par la concentration en protéines, quantité et état de l'eau, force ionique, temps de chauffage, température, pH et interactions avec d'autres composants (Campbell et al., 2003).

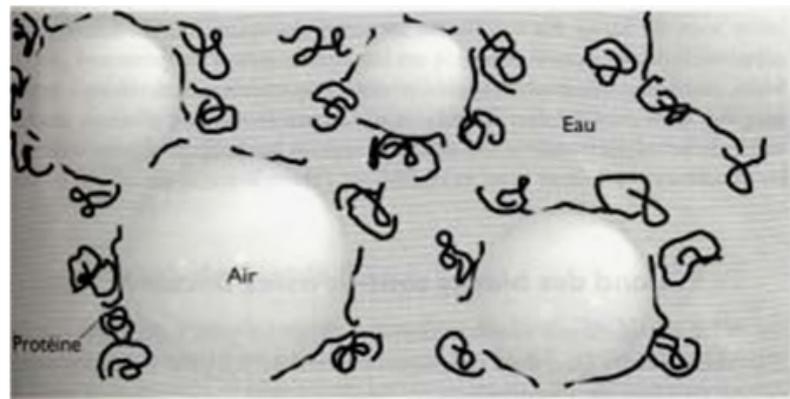
Kitabatake *et al.*, (1989) ont obtenu des gels de blanc d'œuf plus fermes par un chauffage en deux temps en présence de NaCl que par un simple chauffage du même produit (Lechevalier, 2005).

Généralement, la formation du gel est favorisée dans les conditions qui réduisent les forces répulsives électrostatiques entre les molécules de protéine. En d'autres termes, les valeurs du pH voisines du point isoélectrique (pHi) et la concentration ionique élevée sont des facteurs qui peuvent favoriser la formation d'un réseau à trois dimensions, à condition que la concentration en protéine soit suffisamment élevée pour des conditions données (Campbell et al., 2003).

L'ajout de chlorure de sodium et de sucres a tendance à freiner la gélification thermique du blanc d'œuf : ce sont des agents protecteurs de dénaturation qui sont ajoutés communément aux ovoproduits commerciaux (Nathier-Dufair, 2005).

### 1.3.2 Sur le pouvoir moussant

Comme la plus part des protéines et de nombreuses autres substances (détergents et phospholipides), les protéines du blanc d'œuf sont de grand agent tensioactif, ce qui confère au blanc d'œuf un excellent pouvoir moussant (Thapon et Bourgeois, 1994 ; Davis et Reeves, 2002). En relation direct avec ces propriétés tensioactives, ces protéines montrent une capacité toute particulière à inclure des bulles d'air au cour du battage : il se forme une mousse (figure 12) (Thapon et Bourgeois, 1994).

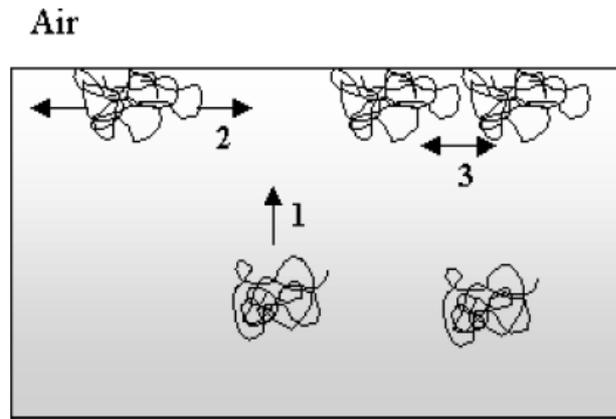


**Figure N° 12** : Formation de la mousse (Marotte et *al.* , 2000).

Les capacités moussantes du blanc d'œuf sont attribuées à l'interaction entre les diverses protéines constitutives essentiellement : les globulines, l'ovomucine et l'ovalbumine (Nathier-Dufair, 2005).

Les caractéristiques principales qui définissent un bon agent moussant peuvent être récapitulées comme suit :

- L'aptitude d'adsorption rapide dans l'interface air-eau durant le battage pour subir un changement conformationnel rapide et un réarrangement à l'interface (figure 13);
- De former un film viscoélastique cœsif via l'interaction intermoléculaire (Mine, 1995 ; Davis et Reeves, 2002 ; Campbell et *al.*, 2003 ; Jeantet et *al.*, 2007).



**Figure N°13** : Adsorption d'une protéine à l'interface eau-air (schématique) ; 1. Transport vers l'interface ; 2. Réorganisation (déplissement) ; 3. Interactions protéine-protéine (Gauthier, 2000).

Les propriétés moussantes du blanc d'œuf sont influencées par de nombreux facteurs : facteurs liés à l'animale (âge de la poule, alimentation, état sanitaire), à la conservation de l'œuf, aux traitements technologiques de l'albumen (action du froid et de la chaleur, traitements mécaniques, additifs...).

La stabilité de la mousse est une propriété technologique importante. Le pouvoir moussant est recherché dans l'industrie de biscuiterie (biscuits à la cuillère), pâtisserie (meringues), confiseries, plats cuisinés (macarons, mousses de légumes) (Thapon et Bourgeois, 1994).

Il a été trouvé que des traitements thermiques modérés mis en œuvre avant la formation de la mousse améliorent certaines propriétés moussantes des protéines du blanc d'œuf. Ces traitements thermiques entraînent une augmentation du foisonnement mais la stabilité peut décroître, cependant des traitements thermiques plus sévères altèrent la capacité moussante (Cheftel et *al.*, 1985 ; Van Der Plancken et *al.*, 2006).

Le chauffage des mousses provoque une expansion de l'air, un abaissement de la viscosité, la rupture des bulles, et l'effondrement du réseau (Cheftel et *al.*, 1985).

Des études ont démontré que l'ovalbumine dénaturée possède un pouvoir moussant plus élevé que l'ovalbumine native, parce que les protéines dénaturées s'adsorbent plus facilement sur la surface des bulles d'air. Si les solutions de l'ovalbumine partiellement dépliée subissent un chauffage extrême, elles sont instables et la coagulation s'ensuit, réduisant de ce fait la puissance moussante (Campbell et *al.*, 2003).

### **1.3.3 Sur le pouvoir aromatique**

L'œuf entier et plus particulièrement le jaune possèdent une saveur caractéristique très appréciée. Les arômes sont fixés sur les lipides du jaune qui renferment plus de 100 composés volatils différents.

Les traitements technologiques de pasteurisation, de concentration et de congélation modifient peu le pouvoir aromatique de l'œuf, le séchage peut provoquer des saveurs anormales en cas de surchauffe du produit ou de stockage prolongé. C'est le fait de la dégradation des protéines, de l'oxydation des lipides pendant le stockage ou la réaction de Maillard. La stabilisation de l'arôme peut être obtenue par une acidification à pH 5,5 précédant le séchage ou par le désucrage qui, en éliminant le glucose, limite les réactions de Maillard (Nathier-Dufair, 2005).

### **1.3.4 Sur Le pouvoir liant**

Le pouvoir liant caractérise l'aptitude d'une protéine à maintenir la stabilité de l'ensemble des composants d'un produit solide, semi liquide, ou liquide. Cette propriété peut s'expliquer par la formation d'un film protecteur autour des particules ou d'un réseau fibrillaire dont les mailles emprisonnent ces mêmes particules. L'augmentation de la viscosité peut également améliorer la stabilité et l'homogénéité de la suspension.

Parmi les protéines de l'œuf se sont les albumines qui présentent le meilleur pouvoir liant (Thapon et Bourgeois, 1994). Les propriétés liantes sont recherchées particulièrement par la charcuterie, ce pouvoir liant est dû à la capacité des systèmes colloïdaux que sont le blanc, et à un moindre degré le jaune de former des gels englobant d'autres substances ajoutées (Sauveur, 1988).

Tous les additifs provoquant une augmentation de la viscosité du blanc d'œuf améliorent son pouvoir liant. A l'inverse, des traitements dénaturants qui peuvent altérer cette propriété (Thapon et Bourgeois, 1994).

## **1.4 Critères de dénaturation des protéines**

La dénaturation peut affecter non seulement les propriétés structurales des protéines, mais aussi un grand nombre de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Les protéines dénaturées se distinguent de celles natives par plusieurs caractéristiques mais les modifications qui apparaissent ne sont pas générales ; elles varient d'une protéine à l'autre et pour une même protéine, elles dépendent de l'agent dénaturant.

La diminution de la solubilité et la perte de l'activité biologique constituent les tests les plus importants qui permettent de déceler la dénaturation d'une protéine (Yon, 1969 ; Thapon et Bourgeois, 1994).

➤ **Perte de l'activité biologique des protéines**

Cette perte peut certes constituer un critère de dénaturation, mais elle n'est pas considérée comme une preuve décisive, car certains enzymes peuvent subir des modifications dans leurs propriétés physiques et chimiques sous l'action d'agents dénaturants sans perdre leur activité biologique ; le lysozyme chauffé à 100°C, ne perd pas ses propriétés lysantes, néanmoins il subit des modifications puisqu'il est plus rapidement hydrolysé par la trypsine après chauffage (Yon, 1969).

➤ **Diminution de la solubilité**

La solubilité est liée au changement d'énergie libre net résultant de l'interaction des résidus hydrophobes et hydrophiles sur la surface de la protéine avec le solvant environnant. Un chauffage intense dénature la structure tertiaire des protéines qui provoque une perte irréversible de solubilité induisant une précipitation ou une coagulation (Campbell et *al.*, 2003). La dénaturation s'accompagne presque toujours d'une perte de solubilité de la protéine (Hatta et *al.*, 1997; Croguennes et *al.*, 2002).

Il est évident que les protéines insolubles sont indésirables pour l'industrie alimentaire, donc il est important que la dénaturation par la chaleur soit contrôlée pour éviter une perte significative de solubilité (Campbell et *al.*, 2003). La diminution de la solubilité est accompagnée d'une augmentation de la sensibilité aux attaques enzymatiques (Berrada, 2009).

➤ **Apparition de groupements réactifs**

Après la dénaturation, il peut apparaître des ponts dissulfures intermoléculaires dont la formation entraîne généralement une agrégation des molécules protéiques et contribue largement à la diminution de la solubilité. Les groupements -SH et les ponts disulfures sont titrés plus facilement sur les protéines dénaturées que sur les protéines natives (Lechevalier, 2005).

La dénaturation s'accompagne aussi de la libération de groupements phénoliques masqués dans la protéine native, et de quelques groupements carboxyliques et amines (Yon, 1969).

➤ **Augmentation de la turbidité**

Chauffé à une température de 55°C pendant 20 minutes, la solubilité des protéines du blanc d'œuf diminue, engendrant ainsi une augmentation de la turbidité.

Après traitement thermique à pH 7,6, des solutions plus troubles sont obtenues comparée à pH 8,8. L'augmentation de la turbidité pourrait être expliquée par la dénaturation des protéines les plus thermosensibles suivies par les thermorésistantes (Van Der Plancken *et al.*, 2006).

➤ **Augmentation de la viscosité**

La viscosité de l'albumen dépend de nombreux facteurs : Zootechnologiques (âge et alimentation des poules), durée de stockage, fraction de l'albumen considéré (blanc épais ou blanc liquide), conditions de mesure (température, concentration en protéines, pH...) (Thapon et Bourgeois, 1994 ; Lechevalier, 2005).

La viscosité de l'albumen augmente brutalement à partir de 60°C ce qui traduit la dénaturation des protéines, en deçà de cette température la viscosité diminue progressivement avec l'augmentation de la température (Lechevalier, 2005).

### **1.5 Effets bénéfiques du traitement thermique sur les protéines d'albumen**

La dénaturation thermique peut être également bénéfique, lors de la cuisson (Lorient, 2009). A l'état cru, les protéines du blanc d'œuf ingérées seules ne sont digestibles qu'à 50 % du fait de la présence de facteurs anti-trypsiques (ovomucoïde et ovoinhibiteur) et surtout parce que l'albumen cru stimule peu les sécrétions de sucs gastrique et pancréatiques. La cuisson en coagulant les protéines facilite le travail des enzymes digestives et permet d'atteindre une digestibilité de 92% (Nathier-Dufair, 2005).

Un autre effet positif du traitement thermique est en réduisant le risque de contamination par des *Salmonelles enteritidis*, responsables de 60% des toxi-infections alimentaires induites par cette bactérie lors de la consommation d'œufs (Nys et Sauveur, 2004).

## **Chapitre IV : Interaction protéines - polyphénols**

Les polyphénols, particulièrement les tanins, constituent une famille distincte de métabolites secondaires présents dans beaucoup de plantes et sont considérés comme des défenseurs de ces dernières contre les herbivores et les attaques microbiennes (Baxter et *al.*, 1997).

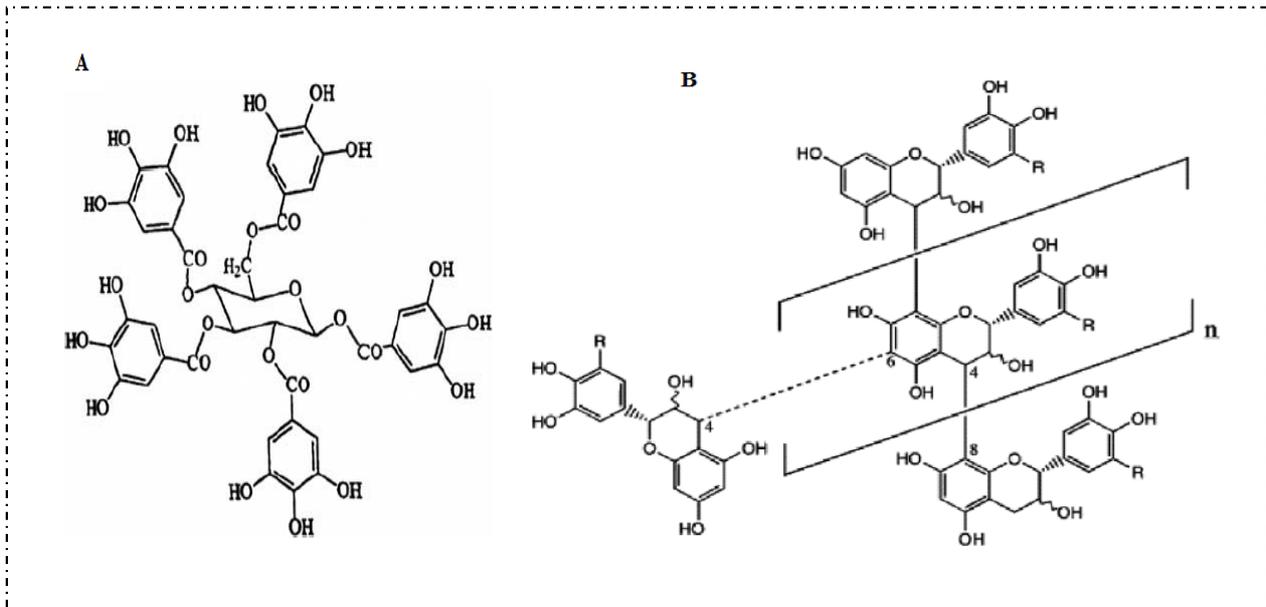
Pendant leur consommation, ils réagissent avec les protéines salivaires en formant des agrégats insolubles qui sont supposés obstruer la lubrification de la bouche et causer la sensation d'astringence (Carvalho et *al.*, 2004).

Cette propriété d'interagir avec les protéines est valable dans le cas du tannage qui consiste à la formation d'une combinaison des tanins avec le collagène de la peau, combinaison qui constitue le cuir (Ribéaux-Gayon et *al.*, 1968 ; Bennick, 2002).

Les polyphénols étant capables d'interagir avec les protéines, peuvent modifier ainsi leurs propriétés fonctionnelles. Les interactions polyphénols-protéines ont un rôle dans le traitement de certaines denrées alimentaires. L'agglutination des protéines sur les proanthocyanidines immobilisés est utilisée pour clarifier certaines boissons (Ferreira et *al.*, 1999).

En se basant sur leur structure, les tanins sont commodément divisés en deux groupes, les tanins hydrolysables et tanins condensés (Bennick, 2002).

Les tanins hydrolysables sont constitués par une molécule glucidique sur laquelle est estérifié de l'acide gallique ou un de ses dérivés (d'où le nom de tanins galliques ou pyrogalliques qu'on leur donne quelquefois), ils sont facilement hydrolysés par voie chimique ou enzymatique (figure 14 A), alors que les tanins condensés (proanthocyanidines) résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (catéchines) ; ils sont désignés aussi sous le nom de « tanins catéchiques » et résistent à l'hydrolyse (figure 14B) (Ribéaux-Gayon et *al.*, 1968).



**Figure N°14** : Structures chimiques d'un tannin hydrolysable (A) et d'un tannin condensé (B) (Smith et *al.*, 2005).

D'après la littérature, il semblerait qu'il n'y a pas de séquence spécifique d'interaction sur la protéine. Mais le seul fait d'avoir des séquences riches en résidus proline, glycine et glutamine suffirait à provoquer la complexation avec les tanins (Simon, 2003).

La famille des protéines riches en proline (PRPs) qui comprennent jusqu'à 70% des protéines de la salive humaine sont connues pour lier fortement les polyphénols (Baxter et *al.*, 1997).

La communauté scientifique confère également aux polyphénols des propriétés médicinales à la suite de leur ingestion par l'homme. En effet, leurs multiples groupements phénoliques auraient des effets antiradicalaires, antioxydant, anticancérigène, antibactérien, vitaminique... et préviendraient donc de maladies cardiovasculaires, de certains cancers, d'infections bactériennes... Les effets néfastes des tanins sur la santé sont souvent oubliés, mais ils perturberaient l'absorption minérale, provoquent l'inhibition de certaines enzymes digestives et participent au développement de certains cancers (comme celui de l'œsophage) (Simon, 2003). En effet, plusieurs études ont rapportées que les tanins ont des effets nuisibles sur les animaux. Lorsque l'alimentation de ces derniers est riche en tanins, ils ont constaté : une diminution dans leur croissance dans les premiers temps, mais une croissance normale est observée au fil du temps concomitante avec le début de synthèse de PRPs salivaires (Cai et Bennick, 2006).

### **I.1 Principe de complexation et liaisons intervenantes**

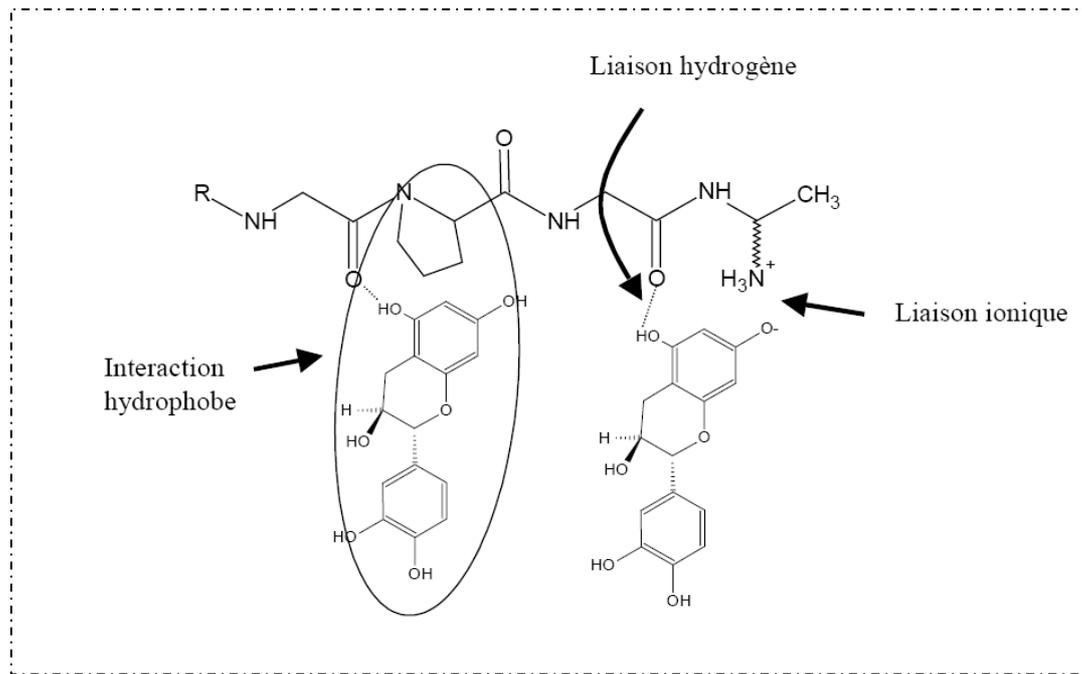
L'association tannins-protéines est principalement un phénomène de surface. Dans les conditions engendrant la précipitation des protéines, deux situations sont envisageables : en premier lieu, l'interaction est telle qu'un ou plusieurs tanins fixe (nt) la protéine formant une mono couche, diminuant ainsi leur caractère hydrophile. Ensuite, l'augmentation de la concentration en protéines permettrait aux polyphénols de jouer le rôle d'agents pontants entre les différentes molécules, grâce à leur propriété multidentale. La couche superficielle hydrophobe se reformerait alors et entraînerait la précipitation des protéines.

Cette précipitation pouvant être réversible par un ajout de protéine, chacune n'étant apte à fixer qu'un nombre fixe de polyphénols ou bien par ajout de polysaccharides avec lesquels les tanins se complexent ce qui provoque une diminution de la liaison avec les protéines par effet compétitif (Simon , 2003).

Le mécanisme de l'interaction protéine - polyphénol est mal connu, il pourrait se produire par des liaisons : covalentes, ioniques, hydrogènes ou par des interactions hydrophobes représentées sur la figure 15. Le complexe ainsi formé précipite lorsqu'il est suffisamment hydrophobe (Marcheix et *al.*, 2005 ; Sundar et *al.*, 2008).

Quand les polyphénols sont exposés à l'oxydation cela peut engendrer des ortho-quinones qui sont des intermédiaires très réactifs que potentiellement pourrait résulter des liaisons covalentes entre les tanins et les protéines, a présent il y a peu d'évidence pour les liaisons covalentes entre les tanins et les protéines (Bennick, 2002).

A ce jour, la force majeure d'interaction n'a pas pu être définie et les liaisons hydrogène ou interactions hydrophobes se battent la vedette (Simon, 2003). Ces interactions dépendent de nombreux facteurs tant au niveau du polyphénol, de la protéine et des conditions du milieu (Papadopoulou et *al.*, 2004).



**Figure N°15** : Interaction des protéines avec les polyphénols (Simon, 2003).

## I.2 Paramètres influençant l'interaction protéines-polyphénols

### I.2.1 Paramètres liés aux protéines

La structure tridimensionnelle des protéines est primordiale dans l'interaction tannins-protéines. Elles doivent adopter une structure ouverte, plus exposée au solvant, pour faciliter l'approche des tannins (Ribéaux-Gayon, 1968 ; Simon, 2003 ; Marcheix et *al.*, 2005 ; Tiziani et *al.*, 2008). Il n'existe pas de séquences spécifiques d'interaction, seule leur particularité à posséder en tandem des résidus hydrophobes ; proline, glycine et glutamine suffirait à provoquer une forte affinité pour les polyphénols. Ces trois résidus suffisent à engendrer une conformation ouverte et étendue à la protéine (Zimmer et Cordesse, 1996 ; Simon, 2003 ; Tiziani et *al.*, 2008).

Le poids moléculaire de la protéine conditionne les possibilités de liaison et d'insolubilisation de la protéine. D'une manière générale, plus le poids moléculaire des protéines est élevé, plus l'affinité des tannins est élevée (Hgermane et butler, 1981). Au-delà d'un certain poids moléculaire les molécules sont trop volumineuses pour interagir efficacement (Leinmuller et *al.*, 1991).

## **I.2.2 Paramètres liés aux polyphénols**

La taille du polyphénol (soit le degré de polymérisation pour les tanins condensés) est importante. L'augmentation de leur poids moléculaire favorise la complexation avec les protéines. Le nombre de groupements hydroxyles sur les cycles A et B ainsi que les galloylations sont importants. Plus il y a de OH plus l'affinité est importante, donc le nombre d'unités monomériques fait accroître la quantité d'hydroxyles (Simon, 2003).

D'un autre côté, si la molécule de tannin est trop volumineuse, elle ne peut pas s'approcher suffisamment des sites actifs de la protéine et les combinaisons deviennent moins énergétiques. Les combinaisons avec les protéines sont plus accentuées pour des poids moléculaires des tannins compris entre 500 et 3000 Da (Ribéaux-Gayon, 1968).

## **I.2.3 Paramètres liés aux conditions du milieu**

### **I.2.3.1 Effet du pH**

En général la précipitation des protéines par les tannins est plus élevée lorsque le pH du milieu correspond au pH isoélectrique de la protéine en question (Bennick, 2002). De ce fait, la gamme de pH pour laquelle les tannins peuvent insolubiliser des protéines est vaste et couvre les pH biologiques compris en majorité entre 3 et 8 (Zimmer et Cordesse, 1996).

### **I.2.3.2 Temps d'incubation**

La réaction de complexation est très rapide en présence de tannins et de protéines purifiés : moins de 15 minutes quelles que soient les protéines pures et quelle que soit la classe de tannins purifiés, alors que 15 heures de contact sont, par exemple, nécessaires pour obtenir le poids maximal de complexes précipités de caséines purifiées en présence de tannins non purifiés extraits de feuilles de chêne (Zimmer et Cordesse, 1996).

### **I.2.3.3 Présence de polymères compétitifs**

Des composés secondaires peuvent intervenir également sur la fixation des tanins et sur l'affinité avec les protéines, tel que les polysaccharides qui peuvent interférer en agissant de manière compétitive avec les protéines et sur la fixation des polyphénols (Simon, 2003).

### **I.2.3.4 Autres facteurs du milieu**

D'autres facteurs interviennent privilégiant l'un ou l'autre type de liaison. Les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes suivent une tendance opposée avec le traitement

thermique ; une augmentation de température cause une diminution des liaisons hydrogène, mais une augmentation des interactions hydrophobes (Prigent, 2005).

En condition non oxydantes, toutes les liaisons engagées par les tannins sont théoriquement réversibles. Alors qu'en présence d'oxygène moléculaire, la transformation des groupements phénol en quinones est favorisée, permettant la formation de liaisons covalentes irréversibles (Zimmer et Cordesse, 1996).

À faible pH et à faible concentration en protéine, une augmentation de la force ionique augmente la complexation car les répulsions électrostatiques entre les protéines sont réduites. La présence des ions inorganiques tels que  $K^+$  et  $Na^+$ , favorise la précipitation du complexe tanins- protéines.

L'influence du solvant sur la solubilité des polyphénols agit sur l'association avec les protéines. Une faible solubilité favorise la fixation des polyphénols car les liaisons hydrogènes faites avec le solvant doivent être supprimées avant de se lier avec les protéines (Simon, 2003).

# *Matériel et méthodes*

Le travail est réalisé au sein des laboratoires de technologie alimentaire et de microbiologie de l'université ABDERRAHMANE MIRA de Bejaia et du laboratoire d'écologie de l'Université Sciences et techniques Houari Boumediene (USTHB) à Alger. Le but est de suivre l'effet du traitement thermique sur les protéines de blanc d'œuf en appliquant différents barèmes 'température/temps'. A cet effet, des mesures de viscosité, de densité, de solubilité, de turbidité et électrophorèses sur gel de polyacrylamide en conditions native (NATIVE-PAGE) et en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ont été réalisés sur du blanc d'œuf ayant subi un traitement thermique.

Une étude interactionnelle protéines-polyphénols a été réalisée. Le comportement du blanc d'œuf vis-à-vis des extraits de *Eucalyptus globulus* (écorce, feuilles et fruits) durant le traitement thermique a été investie, en analysant la turbidité et la solubilité des mélanges extrait phénolique-albumen, ainsi que l'étude des profils électrophorétiques en condition native après avoir réalisé le dosage des polyphénols totaux et des tannins.

## **1. Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf**

### **1.1 Préparation des échantillons**

#### **1.1.1 Séparation du blanc d'œuf**

Après lavage et nettoyage des œufs achetés dans le commerce, les œufs sont cassés avec précaution et le blanc est ainsi séparé du jaune ; en prenant la précaution d'enlever les chalazes. Le pH de l'albumen est mesuré immédiatement à l'aide d'un pH mètre (HANNA instrument, pH211 Microprocessor pHMeter), il est égale à 9,45.

#### **1.1.2 Préparation de la solution du blanc d'œuf**

Le volume de blanc d'œuf est mesuré à l'aide d'une éprouvette puis ajusté avec la solution tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 de façon à obtenir une solution à une dilution au 1/200<sup>ème</sup>. Une douce agitation pendant 10 minutes est effectuée sur l'échantillon, suivi d'une filtration avec une bande à gaze. Des volumes identiques sont transvasés dans des tubes à essai.

#### **1.1.3 Traitement thermique de la solution du blanc d'œuf**

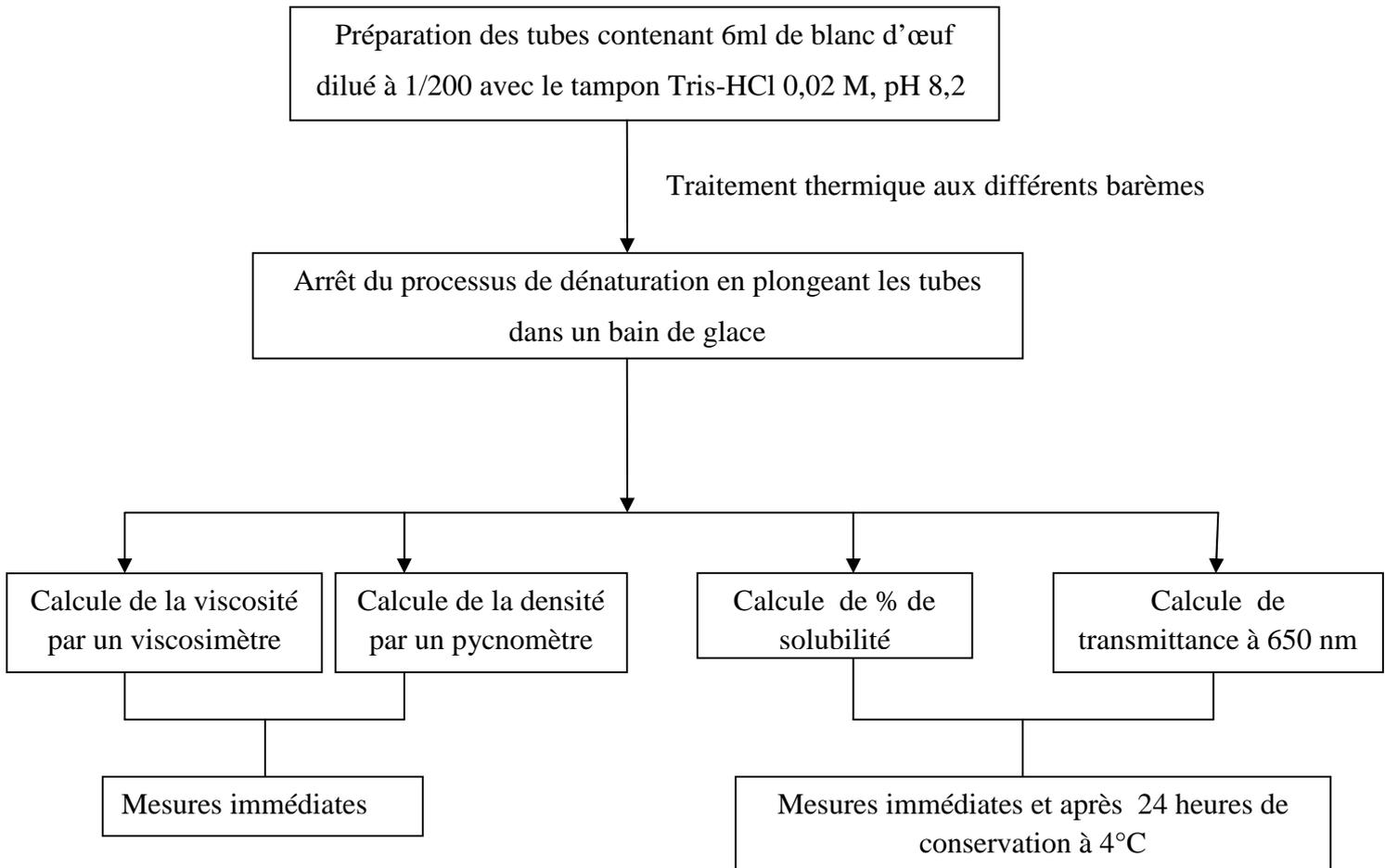
Les différents barèmes du traitement thermique réalisés sur les échantillons de blanc d'œuf sont résumés dans le tableau IX.

**Tableau IX:** Tableau récapitulatif des différents barèmes (Temps/Température) utilisés.

Température (C °)	Temps (3min)	Temps (10 min)	Temps (20 min)
<b>56</b>	T <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	T <sub>1</sub> T <sub>2</sub> T <sub>3</sub>
<b>59</b>	T <sub>4</sub> T <sub>5</sub> T <sub>6</sub>	T <sub>4</sub> T <sub>5</sub> T <sub>6</sub>	T <sub>4</sub> T <sub>5</sub> T <sub>6</sub>
<b>62</b>	T <sub>7</sub> T <sub>8</sub> T <sub>9</sub>	T <sub>7</sub> T <sub>8</sub> T <sub>9</sub>	T <sub>7</sub> T <sub>8</sub> T <sub>9</sub>
<b>65</b>	T <sub>10</sub> T <sub>11</sub> T <sub>12</sub>	T <sub>10</sub> T <sub>11</sub> T <sub>12</sub>	T <sub>10</sub> T <sub>11</sub> T <sub>12</sub>
<b>68</b>	T <sub>13</sub> T <sub>14</sub> T <sub>15</sub>	T <sub>13</sub> T <sub>14</sub> T <sub>15</sub>	T <sub>13</sub> T <sub>14</sub> T <sub>15</sub>
<b>71</b>	T <sub>16</sub> T <sub>17</sub> T <sub>18</sub>	T <sub>16</sub> T <sub>17</sub> T <sub>18</sub>	T <sub>16</sub> T <sub>17</sub> T <sub>18</sub>
<b>74</b>	T <sub>19</sub> T <sub>20</sub> T <sub>21</sub>	T <sub>19</sub> T <sub>20</sub> T <sub>21</sub>	T <sub>19</sub> T <sub>20</sub> T <sub>21</sub>
<b>77</b>	T <sub>22</sub> T <sub>23</sub> T <sub>24</sub>	T <sub>22</sub> T <sub>23</sub> T <sub>24</sub>	T <sub>22</sub> T <sub>23</sub> T <sub>24</sub>
<b>80</b>	T <sub>25</sub> T <sub>26</sub> T <sub>27</sub>	T <sub>25</sub> T <sub>26</sub> T <sub>27</sub>	T <sub>25</sub> T <sub>26</sub> T <sub>27</sub>
<b>83</b>	T <sub>28</sub> T <sub>29</sub> T <sub>30</sub>	T <sub>28</sub> T <sub>29</sub> T <sub>30</sub>	T <sub>28</sub> T <sub>29</sub> T <sub>30</sub>
<b>86</b>	T <sub>31</sub> T <sub>32</sub> T <sub>33</sub>	T <sub>31</sub> T <sub>32</sub> T <sub>33</sub>	T <sub>31</sub> T <sub>32</sub> T <sub>33</sub>
<b>89</b>	T <sub>34</sub> T <sub>35</sub> T <sub>36</sub>	T <sub>34</sub> T <sub>35</sub> T <sub>36</sub>	T <sub>34</sub> T <sub>35</sub> T <sub>36</sub>

Après traitement thermique dans un bain marie thermostaté (Memertt) sous agitation continue, les tubes sont immédiatement plongés dans un bain de glace pendant 1 minute afin d'arrêter le processus de dénaturation.

Les analyses citées ci-dessous sont appliquées sur chaque tube. Les mesures de turbidité et de solubilité sont réalisées immédiatement après le traitement et après 24 heures de conservation à 4°C, celles de densité et viscosité immédiatement après traitement thermique. Le schéma d'analyse est illustré sur la figure 16.



**Figure N° 16 :** Diagramme récapitulatif du schéma d'analyses réalisées.

## 1.2 Estimation de la dénaturation thermique des protéines du blanc d'œuf

### 1.2.1 Mesure du trouble

Consiste à mesurer la transmittance du blanc d'œuf traité par rapport à celle du blanc d'œuf non traité, ce dernier est utilisé afin de ramener la turbidité à 0 (qui correspond à une transmittance de 100%). Cette mesure est réalisée à une longueur d'onde de 650 nm (Van der Plancken *et al.*, 2006), immédiatement après traitement et après 24 heures de conservation à 4°C .

### 1.2.2 Dosage et solubilité des protéines d'albumen

Les échantillons traités sont centrifugés à 20000 x g pendant 20 min à 4°C (Van der Plancken et *al.*, 2006). Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (Annexe 1). La solubilité des protéines est exprimée par rapport à un blanc non traité selon la formule suivante :

$$S = \frac{\text{Concentration des protéines du surnageant traité thermiquement}}{\text{Concentration des protéines du surnageant non traité}}$$

Les mesures sont réalisées immédiatement après le traitement thermique et après 24 heures de conservation à 4°C (Machado et *al.*, 2007).

### 1.2.3 Mesure de la densité

La densité a été déterminée en utilisant un pycnomètre de 10 ml. Ce dernier a été étalonné avec de l'eau distillée à température ambiante (Machado et *al.*, 2007). La densité en g/cm<sup>3</sup> ou g/ml est calculée selon l'équation suivante :

$$d = \frac{(m_{\text{échantillon}} - m_{\text{pycnomètre vide}})}{(m_{\text{eau distillée}} - m_{\text{pycnomètre vide}})}$$

### 1.2.4 Mesure de la viscosité

La viscosité  $\eta$  traduit le comportement rhéologique des solutions ou des suspensions protéiques. C'est-à-dire leur propriété d'écoulement qui correspond à un phénomène de déformation sous l'influence d'une contrainte (Lorient et Matringe, 1994).

Pour mesurer la viscosité du blanc d'œuf, un viscosimètre d'Hoeppler, de type FUNGILAB, SA (Annexe 2) est utilisé. Le temps de chute de la bille dans le liquide visqueux permet de calculer la viscosité dynamique ( $\eta$ ) en tenant compte de la densité  $\rho_1$  et de la constante K de la bille utilisée, ainsi que de la densité ( $\rho_2$ ) du liquide dont nous voulons déterminer la viscosité dynamique (mPa.s ou mPoiseuille (mPI)). La viscosité est calculée selon l'équation suivante.

$$\eta = K (\rho_1 - \rho_2) \cdot t$$

Avec :

K : constante de la bille (mPa.s.cm<sup>3</sup>/ g. s)

$\rho_1$  : Densité de la bille en g/ cm<sup>3</sup>

$\rho_2$  : Densité du liquide qu'on veut mesurer sa viscosité en g/ cm<sup>3</sup>

t : Le temps de chute de la bille dans le tube en seconde.

Pour réaliser cette mesure, il faut remplir le tube du viscosimètre avec les échantillons de blanc d'œuf traités thermiquement et mesurer le temps de chute de la bille dans le liquide visqueux en seconde (Scher, 2006).

### 1.2.5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives (NATIVE-PAGE)

L'équipement utilisé est la mini-électrophorèse verticale sur plaque en gel de polyacrylamide, décrite par Laemmli (1970).

L'électrophorèse protéique, en condition non dénaturante, permet de séparer des protéines présentes dans l'albumen sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation sur gel de polyacrylamide est réalisée selon le protocole de Walker (2002), (les solutions utilisées sont données en annexe 3). La vitesse de séparation dépend de la masse et de la charge de chaque protéine.

#### A. Préparation du gel de séparation (7,5%)

1,875 ml de la solution stock d'acrylamide (7,5%), 1,875 ml de tampon Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8), 3,712 ml d'eau distillée et 37,5 µl de persulfate d'ammonium (10%) ont été mélangés et dégazés (pendant 30 secondes). Ajouter 3,75 µl de TEMED et agiter doucement pour bien mélanger la solution. Couler cette solution entre les plaques de l'électrophorèse. L'addition de TEMED initie la réaction de la polymérisation ; le gel est coulé juste après son addition.

#### B. Préparation du gel de concentration (5%)

0,5 ml de la solution stock d'acrylamide (7,5%), 1ml de tampon Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 2,466 ml d'eau distillée et 33,33 µl de persulfate d'ammonium (10%) sont mélangés et dégazés comme précédemment. 5 µl de TEMED sont ajoutés. La solution est coulée entre deux plaques de l'électrophorèse.

### **C. Coulage des gels entre les plaques de l'appareil d'électrophorèse**

Après avoir préparé le gel de séparation, le verser entre les deux plaques de l'électrophorèse. Des gouttes d'eau distillée sont ajoutées sur sa surface pour avoir une surface plane, lisse et non déshydratée.

Après environ 20 min de polymérisation, l'eau distillée sera éliminée puis le gel de concentration est ajouté et attendre sa polymérisation (30 min) après avoir placé le peigne.

Après une polymérisation complète des gels, enlever avec soin le peigne du gel de concentration, ôter aussi tout spacer du fond du gel, et assembler les plaques dans le réservoir de l'électrophorèse. Remplir le réservoir supérieur avec le tampon d'électrophorèse et s'assurant que le tampon remplit complètement les puits du chargement de l'échantillon puis en vérifier toutes fuites du réservoir supérieur. S'il n'y a pas de fuites, remplir le réservoir inférieur avec le tampon d'électrophorèse.

### **D. Préparation des échantillons de poids moléculaire standard**

Les protéines utilisées comme marqueurs dans cette étude sont :

- L'ovalbumine : 45 kDa
- L'ovotransferrine: 77,7kDa
- Lysozyme : 14 kDa

La solution standard est préparée de telle sorte que la charge protéique soit d'environ 20 µg dans 20 µl de tampon Tris HCl 0,02 M, pH 8,2.

### **E. Dépôt des échantillons, standards et migration**

Les échantillons de blanc d'œuf dilués à 1/200 avec le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 traités à différents barèmes (température/temps), ainsi que les marqueurs délicatement introduits 20 µL dans les puits du gel de concentration.

Un courant d'intensité de 25 mA et une tension de 100 V est appliqué jusqu'à ce que le front du bleu de Bromophénol (front de migration) arrive à 0,5 cm du bord du gel, toute en maintenant le système réfrigéré.

### **F. Révélation des bandes protéiques**

Après migration, les gels sont colorés, avec la solution du bleu de coomassie (R-250) pendant trois heures. Ce colorant, en milieu acide et en présence de méthanol, a une grande affinité pour les protéines. Sa petite taille lui permet de pénétrer rapidement dans le gel pour

atteindre les protéines. Il forme des liaisons électrostatiques avec les groupements  $\text{NH}_3^+$  et des liaisons non covalentes avec les régions non polaires des protéines.

Puis les gels sont décolorés dans la solution de décoloration sous agitation jusqu'à l'apparition de bandes protéiques. Les gels d'électrophorèse obtenus seront scannés.

### **1.2.6 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

Cette technique consiste à faire migrer les protéines en fonction de leur taille selon le protocole de Walker (2002), (les solutions utilisées sont données en annexe 3).

Réalisée en milieu réducteur ou non, elle permet donc de repérer la formation d'agrégats par création de liaisons covalentes de type pont disulfure.

Deux types d'électrophorèse ont été réalisés : dans un cas les échantillons protéiques sont chauffés 5 min à 100°C en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol, dans l'autre les échantillons protéiques sont simplement dilués en présence de SDS.

#### **A. Gel de séparation (10%)**

4,433 ml de la solution stock d'acrylamide (7,5%), 2,666 ml de Tris-HCl (1,875 M, pH 8,8), 6,033 ml d'eau distillée, 0,133 ml de SDS (10%) et 0,066 ml de persulfate d'ammonium (10%) sont mélangés et dégazés (pendant 30 seconde). Puis juste avant le coulage, 4,666  $\mu\text{l}$  de TEMED sont ajoutés.

#### **B. Gel de concentration (4%)**

0,675ml de la solution stock d'acrylamide (7,5%), 0,5 ml Tris-HCl (0,6M, pH 6,8), 0,05 ml de SDS (10%), 3,75 ml d'eau distillée et 0,025 ml de persulfate d'ammonium (10%) sont mélangés et dégazés. Puis juste avant le coulage, 7  $\mu\text{l}$  de TEMED sont ajoutés.

#### **C. Préparation des échantillons**

Les solutions des protéines standards et les solutions d'échantillons (préparés comme précédemment pour la native-page) sont diluées dans la solution de traitement de l'échantillon avec un rapport 1/1 (v/v) et chauffées à 95-100 °C pendant 5min.

Deux types de traitement ont été réalisés :

- Les échantillons protéiques sont chauffés 5 min à 100°C en présence de SDS et de  $\beta$ -mercaptoéthanol.
- Les échantillons protéiques sont simplement chauffés en présence de SDS.

## **D. Migration électrophorétique et révélation de bandes protéiques**

La quantité de protéines déposées est de 20 µg/puits et la migration électrophorétique est effectuée dans un tampon d'électrophorèse ; sous une différence de potentiel de 200 V et un ampérage de 30 mA.

Après migration, les protéines sont colorées, pendant deux heures, avec la solution de coloration à base du bleu de coomassie Brillant (R-250). La décoloration est effectuée dans la solution de décoloration sous agitation jusqu'à l'apparition de bandes protéiques.

## **II. Analyse de l'interaction des extraits de *Eucalyptus globulus* - blanc d'œuf**

### **II.1 Préparation de la solution d'extrait de *Eucalyptus globulus***

Les matières sèches extraites des feuilles, d'écorce et des fruits de *Eucalyptus globulus* avec l'acétone (70%) ont été réalisés par SLIMANI (étudiante en Magister 2009). Chaque extrait est reconstitué dans l'éthanol (75%) afin d'avoir une concentration de 1mg/ml pour la réalisation des dosages.

## **II .2 Analyses phytochimiques**

### **II .2.1 Dosage des polyphénols totaux**

#### **II .2.1.1 Principe**

La quantification des composés phénoliques totaux est basée sur la réaction d'oxydoréduction suivante : Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleu obtenue dont l'absorption maximum à 760 nm est proportionnelle au taux de composés phénoliques (Ribereau-Gayon et *al.*, 1982).

#### **II .2.1.2 Mode opératoire**

La méthode utilisée est celle décrite par Othman et ses collaborateurs (2007) avec légères modifications.

Un volume de 200 µl de chaque extrait est additionné à 1,5ml de réactif de Folin Ciocalteu (1/10) puis le laisser à l'obscurité pendant 5 min. 1,5ml de carbonate de sodium (7,5%) sont ajoutés. Les tubes sont incubés à l'obscurité à température ambiante pendant une heure et demie, la lecture est réalisée à 750 nm.

Une courbe standard est réalisée avec l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons en remplaçant l'extrait par l'éthanol (75%).

Les polyphénols totaux sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche d'échantillon (mg EAG/ g MS), trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

## **II .2.2 Dosage des tannins totaux**

### **II .2.2.1 Principe**

Le dosage des tannins totaux en utilisant la BSA, est basé sur l'aptitude des tannins à précipiter les protéines formant ainsi un complexe insoluble tannins-BSA. Ce précipité, une fois dissout dans une solution alcaline (SDS /TEA), forme un complexe ion ferriques-polyphénols de couleur bleu-vert-violacée, qui est mesurée au spectrophotomètre à 510 nm (Ribereau – Gayon, 1968).

### **II .2.2.2 Mode opératoire**

Nous avons utilisé le protocole de précipitation des protéines (BSA), proposé par Hagerman et Butler (1978), pour estimer le contenu en tannins totaux.

2 ml de la solution BSA (1mg/ml) sont ajoutés à 1ml de la solution d'extrait. Après 24 heures d'incubation à 4°C, une centrifugation est réalisée à 5000 tpm /20 min. Le culot récupéré est dissout dans 4ml de la solution SDS/TEA /15min, puis additionné à 1ml de chlorure de Fer (FeCl<sub>3</sub>). Le TEA (le triéthanolamine) est nécessaire pour le maintien du pH, le SDS est employé pour dissoudre le complexe tannins-protéines.

Le mélange réactionnel est agité vigoureusement avant d'être laissé au repos à l'abri de la lumière /15min. Trois répétitions sont réalisées pour chaque échantillon.

Les absorbances des échantillons sont lues à 510 nm contre un blanc contenant le même mélange réactionnel à l'exception de l'extrait.

Les résultats sont rapportés en mg équivalent acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT /g MS) (Hagerman et Butler, 1978).

### II.3 Mesure de la turbidité des complexes polyphénols-protéines d'albumen

La mesure du trouble formé par le complexe polyphénols-albumen sous l'influence de la température est réalisée selon le protocole de Vander Planken et ses collaborateurs (2006) modifié.

Un volume de la solution d'albumen diluée à 1/200 avec le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 est ajouté à un volume de chaque extrait (écorce, fruits et feuilles) de *Eucalyptus globulus* ayant une concentration de 1mg/ml (les solutions d'extrait sont préparées avec le même tampon que celui utilisé pour la solution du blanc d'œuf).

Les tubes sont incubés à différentes température de 56°C à 89 °C (tableau IX) pendant 20 min, puis mis immédiatement dans un bain de glace. La lecture de la transmittance est effectuée à 650 nm par rapport à un blanc non traité sans extrait de plante.

### II.4 Mesure de la solubilité des complexes polyphénols-protéines d'albumen

La mesure de la solubilité des complexes polyphénols-albumen, formés par des extraits de *Eucalyptus globulus* (fruits, écorce et feuilles) et du blanc d'œuf est réalisée selon le protocole de Vander Planken et ses collaborateurs (2006) modifié.

Un volume de la solution d'albumen diluée à 1/200 avec le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 est ajouté à un volume de chaque extrait ayant une concentration de 1mg/ml (préparé avec le même tampon que celui utilisé pour la solution du blanc d'œuf).

Les tubes sont incubés à différentes température de 56°C à 89 °C (tableau IX) pendant 20 min, puis mis immédiatement dans un bain de glace. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 20000 g pendant 20 min à 4°C.

Les protéines du surnageant sont dosées par la méthode de Bradford (Annexe 1). La solubilité des protéines est exprimée par rapport à un blanc non traité sans extrait de plante selon l'équation suivante (Machado *et al.*, 2007) :

$$S = \frac{\text{Concentration des protéines du surnageant traité thermiquement}}{\text{Concentration des protéines du surnageant non traité}}$$

## **II .5 NATIVE-PAGE des complexes protéines d'albumen-écorce de *Eucalyptus globulus* sous l'effet de la chaleur**

Le protocole réalisé est celui de Walker (2002), cité précédemment.

Les échantillons injectés dans les puits de gel de concentration sont préparés en mélangeant un volume de la solution d'albumen préparée comme précédemment avec un volume d'extrait d'écorce de *Eucalyptus globulus* de 1mg/ml, avant de subir le traitement thermique (tableau IX) pendant 20 min.

## **II .6 NATIVE-PAGE des complexes protéines d'albumen-écorce de *Eucalyptus globulus* sans traitement thermique**

Le protocole réalisé est celui de Walker (2002), cité précédemment.

Les échantillons injectés dans les puits de gel de concentration sont préparés comme suivant :

1. Un volume de la solution de chaque protéine purifiée ovalbumine, ovotransferrine et lysozyme (préparées avec le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 à 1 mg/ml) est mélangé avec un volume d'extrait d'écorce de *Eucalyptus globulus* de 1 mg/ml (reconstitué dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2).
2. Un volume de la solution d'acide tannique de 1mg/ml (préparé dans le tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2) est additionné à un volume de la solution d'albumen, et avec un volume de la solution d'ovalbumine de 1mg/ml.
3. Un volume d'albumen avec un volume d'extrait d'écorce de *Eucalyptus globulus* .
4. De l'albumen seule et des marqueurs (ovot, lys et oval à 0,5 mg/ml).

## **III. Analyse statistique**

Toutes les expérimentations (turbidité, solubilité, densité, viscosité des protéines d'albumen, dosage des polyphénols totaux et tannins, turbidité et solubilité des complexes protéines-polyphénols) réalisées dans le présent travail ont été répétées trois fois, les moyennes et les écarts types sont ensuite calculés par les fonctions statistiques d'EXCEL de Ms office 97.

L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application « ANOVA » à deux facteurs (température et temps) et test de Student à l'aide d'un logiciel STATISTICA 5.5 et le seuil de significativité est fixé à  $P < 0,05$ .

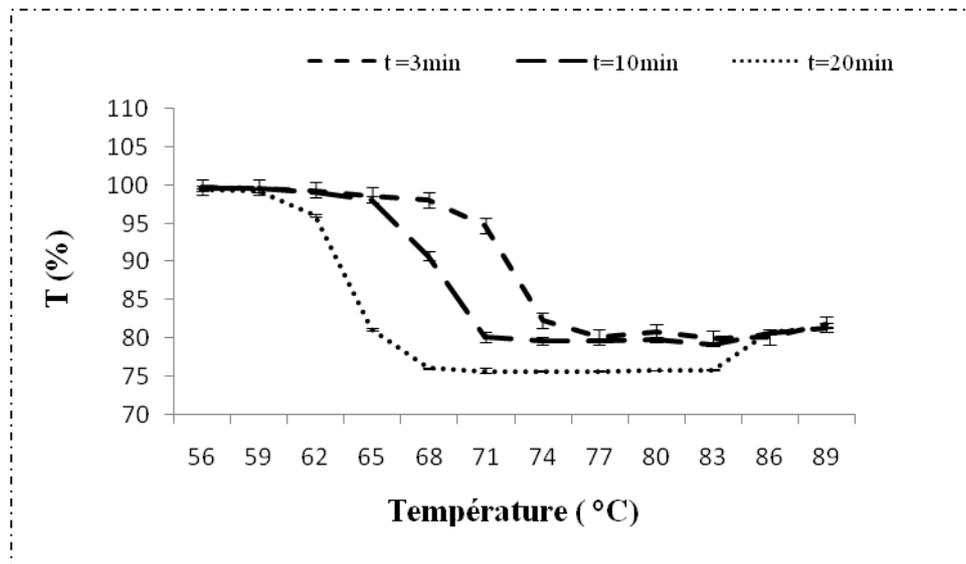
# *Résultats et discussion*

## I. Effet du traitement thermique sur les protéines du blanc d'œuf

### I.1 Turbidité

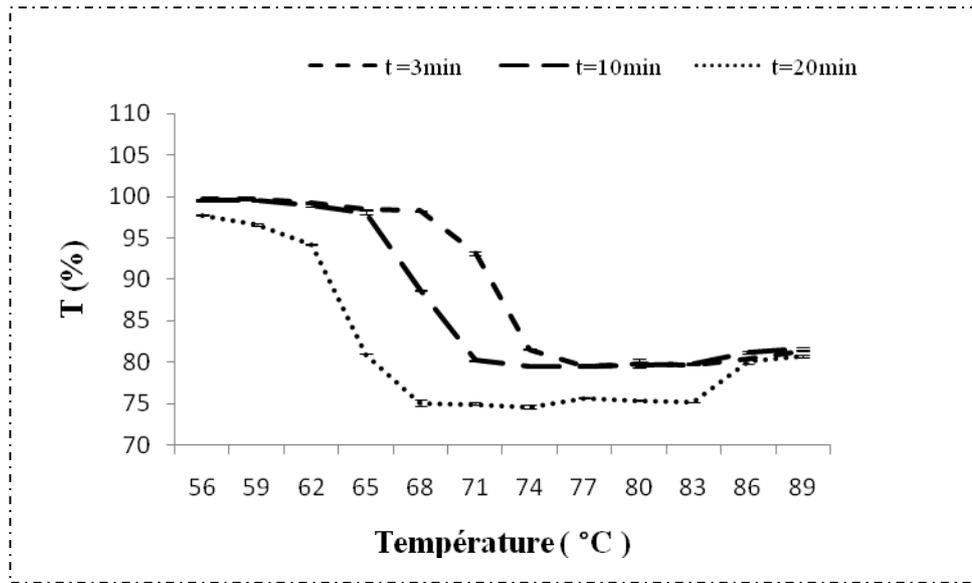
La turbidité est inversement proportionnelle à la transmittance. Cette dernière a été mesurée à 650 nm pour des échantillons de blanc d'œuf dilués à 1/200 avec du tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2 et traités thermiquement à différents barèmes.

Les résultats obtenus sont donnés en annexe 4. L'évolution des moyennes des transmittances T (%) en fonction de la température et du temps du traitement réalisées immédiatement après traitement thermique est illustrée sur la figure 17 et les mesures réalisées après 24 heures de conservation à 4°C sont illustrées sur la figure 18.



**Figure N° 17 :** Effets du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la turbidité des solutions du blanc d'œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2).

Mesure réalisée immédiatement après traitement thermique.



**Figure N° 18 :** Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la turbidité des solutions du blanc d’œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2). Mesure réalisée après 24 heures de conservation à 4°C.

Les figures 17 et 18, montrent une évolution sigmoïdale à pente négative de la dénaturation des protéines d’albumen aux températures croissantes allant de 56°C jusqu’à 89°C et cela pour les trois temps appliqués 3, 10 et 20 min, mesurée immédiatement après traitement thermique et après 24 heures de conservation à 4°C.

Cette sigmoïde à pente négative comporte quatre parties distinctes :

- Phase stationnaire 1 : La transmittance est stable en fonction de la température. Cette phase pourrait être considérée comme la phase de dénaturation des protéines.
- Phase descendante : Correspond à une évolution négative de la transmittance en fonction de la température .Il s’agit de la phase de transition entre l’étape de dénaturation et l’étape d’agrégation. La pente de cette partie nous renseigne sur la vitesse de transition entre l’étape de dénaturation et celle d’agrégation.
- Phase stationnaire 2 : Cette phase pourrait correspondre à la phase d’agrégation des protéines.
- Phase ascendante : Toutes les courbes comportent une phase positive à partir de 86°C. Cette diminution de trouble pourrait être associée à la sédimentation des agrégats formés ou

à la formation de la S-Ovalbumine dont le rayon de Stock est plus faible que celui de la protéine native d'un facteur de 2, ce qui conduit à la formation d'agrégats de petite taille.

Ces différentes phases s'étalent sur les intervalles de température indiquées sur le tableau X.

**Tableau X:** Les intervalles de température pour chaque phase de gélification d'albumen selon la mesure de transmittance ainsi les pentes négatives de la phase descendante.

Phases de gélification d'albumen	Transmittance mesurée immédiatement	Transmittance mesurée après 24 heures de conservation à 4°C
Phase stationnaire 1	De 56 °C à 68 °C/ 3 min	De 56°C à 68°C /3 min
	De 56 °C à 65 °C/ 10 min	De 56°C à 65°C /10 min
	De 56 °C à 59 °C/ 20 min	De 56°C à 59°C / 20 min
Phase descendante	De 68 °C à 77 °C/ 3 min et une pente de (-2,63)	De 68°C à 77°C/3 min et une pente de (-2,77)
	De 65 °C à 74 °C /10 min et une pente de (-3)	De 65°C à 74°C/10 min et une pente de (-2,97)
	De 59 °C à 71 °C /20 min et une pente de (-3,33)	De 59°C à 71°C /20 min et une pente de (-3,20)
Phase stationnaire 2	De 77 °C à 83 °C/ 3 min	De 77°C à 83°C/3 min
	De 74 °C à 83 °C/ 10 min	De 74°C à 83°C/10 min
	De 71 °C à 83 °C/ 20 min	De 71°C à 83°C/20 min
Phase ascendante	À partir de 86°C	À partir de 86°C

**a) Effet du temps du traitement thermique sur la transmittance**

L'analyse statistique révèle que l'évolution du pourcentage de la transmittance mesurée immédiatement et après 24 heures de conservation à 4°C du traitement thermique en fonction du temps est significative ( $P < 0,05$ ) et que le trouble est moins important à 3 min

qu'à 10 et 20 min respectivement. Alors en prolongeant le traitement thermique, le trouble apparaît rapidement (à plus faible température).

Pour la transmittance mesurée soit immédiatement après traitement ou après 24 heures de conservation à 4°C, le trouble apparaît à partir de 59°C à 20 min. Alors qu'à 3 et 10 min, il apparaît à 68°C et à 65°C respectivement.

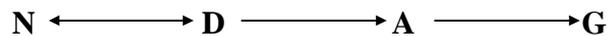
Ce qui est à constater est aussi la proportionnalité entre la durée du traitement thermique et la valeur absolue de la pente négative de la phase descendante (tableau X). Ce qui dénote une augmentation de la vitesse de transition entre la dénaturation et l'agrégation des protéines en fonction du temps de traitement thermique.

### **b) Effet de la conservation de 24 heures à 4°C sur la transmittance**

Le test de Student, indique des différences non significatives entre la transmittance mesurée immédiatement après traitement thermique et après 24 heures de conservation à 4°C des échantillons traités (courbes de comparaison en annexe 4).

Donc le phénomène de dénaturation des protéines du blanc d'œuf est irréversible et les interactions qui se produisent entre ses dernières sont de type ponts disulfures, hydrophobes, et électrostatiques.

Selon Lechevalier (2005), les protéines natives monomériques (N) sont dénaturées par la chaleur, engendrant la dissociation de liaisons hydrogène, le déploiement des chaînes polypeptidiques, l'exposition de résidus hydrophobes et de groupements réactifs enfouis au cœur des protéines à l'état natif. Quand les conditions le permettent, les protéines dénaturées (D) s'associent en agrégats solubles de hauts poids moléculaires (A) par formation de feuillets- $\beta$ . Puis, par formation de ponts disulfures, les protéines dénaturées associées en agrégats solubles polymérisent et engendrent un réseau tridimensionnel (G) maintenu en place par des ponts disulfures, des interactions électrostatiques et hydrophobes.



D'après Van der Plancken et ses collaborateurs (2006), Quand les propriétés physico-chimiques, tel que la turbidité et solubilité ont été mesurées en fonction du temps du stockage à 4 °C, aucuns changements supplémentaires considérable n'a été observé après 24 heures de conservation.

**c) Effet de la température du traitement sur la transmittance**

L'analyse statistique révèle que l'évolution de la transmittance en fonction de la température est significativement différente ( $P < 0,05$ ).

En fixant le temps du traitement thermique, plus la température augmente plus la turbidité augmente. Cela pourrait être expliqué par l'agrégation des protéines d'albumen les plus résistantes à la chaleur telle que l'ovalbumine qui représente 54 % des protéines du blanc d'œuf.

Lechevalier (2005) rapporte, qu'aux températures comprises entre 55°C et 65°C, la diminution de la transmittance pourrait être expliquée par la dénaturation et l'agrégation des protéines du blanc d'œuf les plus sensibles à la chaleur telle que l'ovotransferrine (13 % des protéines d'albumen) et à des températures plus élevée ( $\geq 74^\circ\text{C}$ ), la chute de la transmittance pourrait être due à la dénaturation et agrégation des protéines les plus résistantes à la chaleur tel que l'ovalbumine qui représente 54 % des protéines d'albumen.

**d) Type d'agrégats formés selon les conditions expérimentales**

Dans la présente étude la force ionique du milieu est faible (20 mM), le pH de 8,2 est loin du pH isoélectrique du blanc d'œuf ( $\text{PI} = 4,5 - 5$  pour la majorité des protéines d'albumen). Alors la majorité des protéines du milieu sont chargées négativement, ce qui augmente les forces répulsives entre elles, ainsi qu'une concentration protéique assez faible (dilution de 1/200). Toutes ces conditions appliquées mènent à conclure qu'il y a formation d'agrégats linéaires ou filamenteux.

L'agrégation est due aux interactions protéine-protéine avec formation de complexes de masse moléculaire élevée. L'association des molécules résulte d'un équilibre entre forces attractives et répulsives (Croguennec, 2000).

Lechevalier (2005) rapporte, que des agrégats linéaires ou filamenteux sont formés quand les forces de répulsion sont importantes (pH extrêmes, faible force ionique,...). Dans ce cas, l'étape d'association est plus lente que celle de dénaturation et les interactions protéines-solvant restent importantes. Les agrégats formés sont fortement hydratés et peuvent rester solubles jusqu'à une taille critique.

## **I.2 Solubilité des protéines d'albumen**

La solubilité des protéines est exprimée par rapport à un blanc non traité selon la formule suivante :

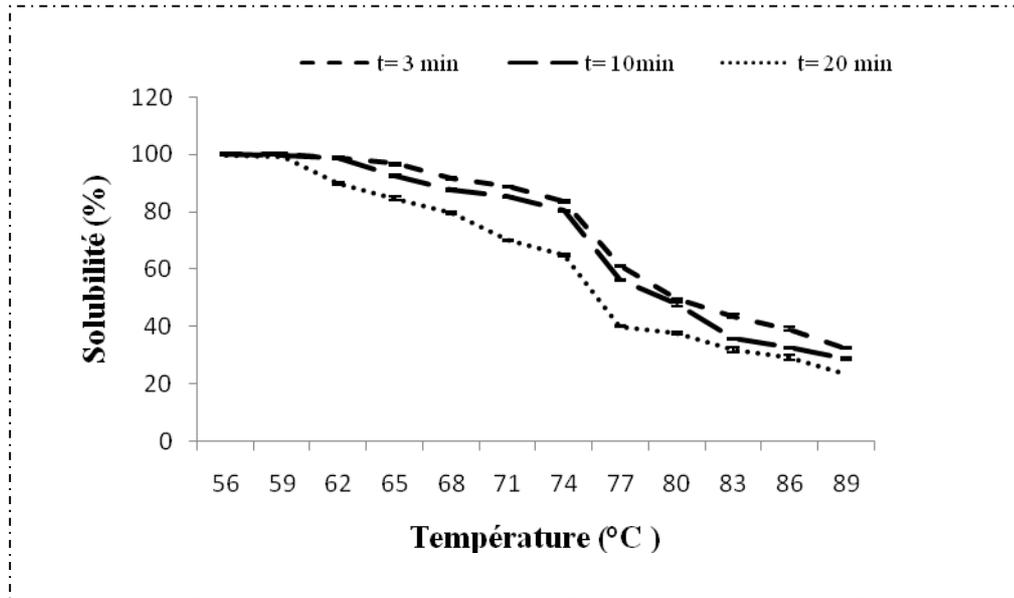
$$S = \frac{\text{Concentration des protéines du surnageant traité thermiquement}}{\text{Concentration des protéines du surnageant non traité}}$$

D'après la courbe d'étalonnage réalisée par la méthode de Bradford (annexe 1). La teneur en protéines du blanc d'œuf non traité est de  $(74 \pm 0,09)$  mg/ml ou  $(7,4 \pm 0,09 \%)$ .

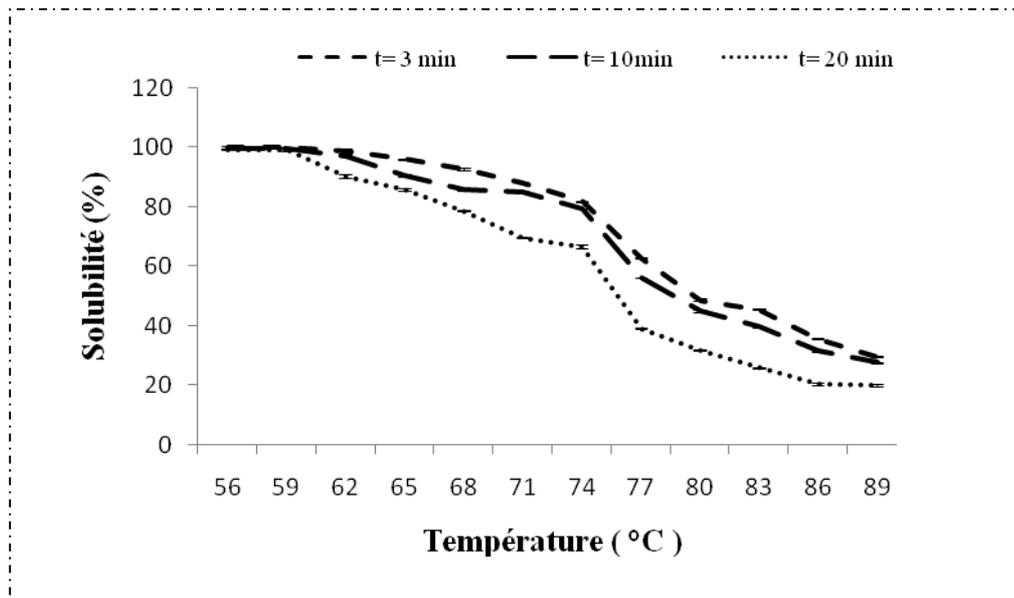
Selon Campbell et ses collaborateurs (2003), le blanc d'œuf contient 11 % de protéines, ce qui correspond à 110 mg /ml, la valeur obtenue est inférieure à cette dernière.

Cette perte de masse pourrait être expliquée lors de la séparation du jaune d'œuf du blanc et surtout lors de l'étape de la dilution et celle de filtration pour éliminer les fibres d'ovomucine, sachant que cette protéine fibreuse se lie à d'autres protéines telle que lysozyme, l'ovalbumine et ovotransferrine. Jeantet et ses collaborateurs (2007) rapportent que, l'ovomucine s'insolubilise par dilution du blanc d'œuf, et après précipitation, sa resolubilisation est extrêmement difficile. Elle peut s'associer, via des liaisons de nature électrostatique avec d'autres protéines de l'albumen (ovalbumine, ovotransferrine et surtout lysozyme). Au pH du blanc d'œuf (compris entre 7,5 et 9,5) , les groupement carboxyliques des acides sialiques de l'ovomucine peuvent en effet interagir avec les groupements amines des résidus lysyls du lysozyme ,formant un complexe lysozyme-ovomucine , insoluble dans l'eau, et qui serait responsable de la structure gélifiée du blanc d'œuf, en particulier du blanc épais.

L'évolution des moyennes de la solubilité en fonction du temps et de la température est illustrée dans les figures 19 et 20. Les résultats de % de solubilité obtenus sont donnés en annexe 5.



**Figure N° 19 :** Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la solubilité des solutions du blanc d’œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2). Mesure réalisée immédiatement après traitement thermique.



**Figure N° 20 :** Effet du traitement thermique de 3,10 et 20 minutes sur la solubilité des solutions du blanc d’œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2). Mesure réalisée après 24 heures de conservation à 4°C.

Il est à constater, selon les figures 19 et 20, que les traitements thermiques appliqués aux solutions du blanc d'œuf provoquent une perte de leur solubilité pour les trois temps étudiés en fonction de la température.

**a) Effet du temps du traitement thermique sur la solubilité**

L'analyse statistique indique que, la perte de solubilité est significative en fonction du temps du traitement thermique appliqué ( $P < 0,05$ ) et que cette perte est plus importante à 20 min qu'à 10 et 3 min respectivement.

Après un traitement de 20 min à 89 C° (figure 18), seulement  $(23,44 \pm 0,21)\%$  de protéines sont restées solubles, alors qu'après un traitement de 10 min et 3 min à 89 C°,  $(28,64 \pm 0,4)\%$  et  $(32,43 \pm 0,27)\%$  respectivement sont restées solubles.

**b) Effet de la conservation de 24 heures à 4°C sur la solubilité**

Le test de Student montre des différences non significatives entre la solubilité mesurée immédiatement et après 24 heures de conservation à 4C° (courbes de comparaison en annexe 5). Donc la perte de solubilité des protéines du blanc d'œuf sous l'effet de la chaleur est irréversible.

La perte de solubilité pourrait être expliquée par l'agrégation des protéines du blanc d'œuf après leurs dénaturation sous l'effet de la chaleur pour formes d'agrégats solubles liés entre eux par des liaison hydrophobes, électrostatiques et ponts disulfures, puis quand ils atteignent un poids moléculaire élevé, ils précipitent et deviennent insolubles.

**c) Effet de la température du traitement sur la solubilité**

L'analyse statistique révèle une perte significative ( $P < 0,05$ ) de la solubilité en fonction de la température du traitement.

Sur les figures 19 et 20, il est à constater une diminution de la solubilité dès 56°C puis elle chute à partir de 74°C.

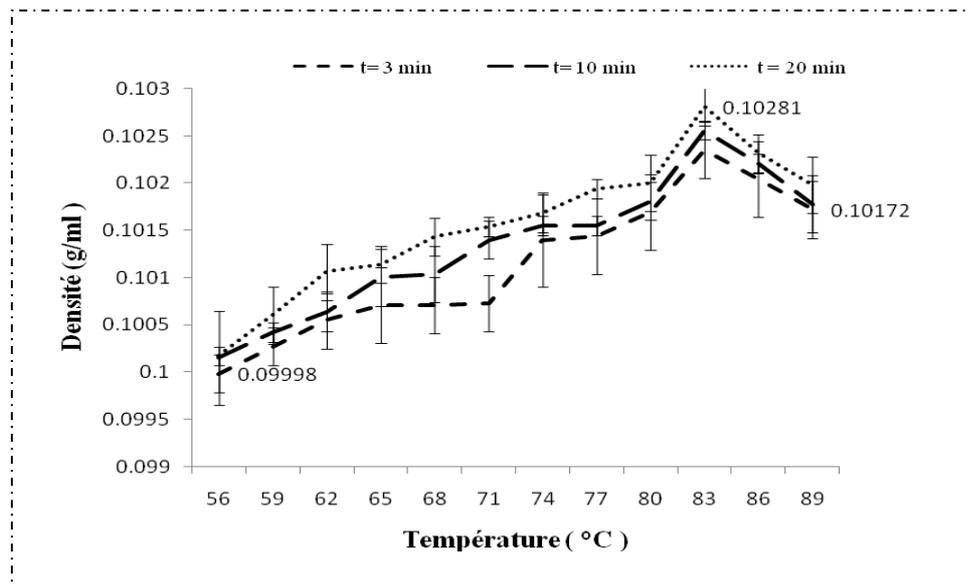
La baisse forte de solubilité à plus hautes températures (74–89°C) est probablement due à la dénaturation et agrégation des protéines résistantes à la chaleur telle que l'ovalbumine qui est la protéine majoritaire d'albumen (54%). Alors que la perte de celle-ci dans la gamme des températures inférieures (56-71°C) pourrait être due à la dénaturation et agrégation des

protéines du blanc d'œuf les plus sensibles à la chaleur, telle que l'ovotransferrine (qui représente 13 % des protéines du blanc d'œuf).

Thapon et Bourgeois (1994) ; Lechevalier (2005) ; Van der Plancken et ses collaborateurs (2006) rapportent que, l'augmentation de la turbidité sous l'effet de la chaleur est accompagnée par une perte irréversible de solubilité des protéines d'albumen agrégées.

### I.3 Densité

Les résultats obtenus de la densité du blanc d'œuf mesurée par la méthode du pycnomètre sont donnés en annexe 6 et l'évolution de celle-ci en fonction de la température et du temps du traitement thermique est schématisée dans la figure ci-après :



**Figure N° 21 :** Evolution de la densité de la solution du blanc d'œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20mM, pH 8,2) en fonction de la température et du temps de traitement thermique.

D'après l'allure des courbes montrées dans la figure 21, nous pouvons diviser l'évolution de la densité d'albumen en fonction de la température et du temps de traitement thermique en deux parties :

- Une augmentation de la densité de 56°C jusqu'à 83°C pour les trois temps étudiés.
- Une diminution de celle-ci de 83°C jusqu'à 89°C toujours pour les trois durées appliquées.

L'analyse statistique indique des différences significatives ( $P < 0,05$ ) de la densité en fonction du temps du traitement thermique. Cette densité est plus importante à 20 min comparée à celle obtenue à 10 min et 3 min respectivement. Aussi des différences significatives ( $P < 0,05$ ) en fonction de la température du traitement ont été révélées. La densité la plus élevée ( $0,10281 \pm 0,0002$ ) g/ml a été notée à  $83^{\circ}\text{C} / 20$  min.

Il n'existe pas d'interaction entre les deux facteurs température et temps ( $F_{\text{obs}}=33,007$  ;  $P=0$ ).

La densité augmente de ( $0,09997 \pm 0,0002$ ) g/ml à  $56^{\circ}\text{C} / 3$  min jusqu'à ( $0,10281 \pm 0,0002$ ) g/ml à  $83^{\circ}\text{C} / 20$  min, puis elle diminue jusqu'à ( $0,10172 \pm 0,0003$ ) g/ml à  $89^{\circ}\text{C} / 3$  min.

L'albumen en solution prend une certaine place dans l'eau; c'est cette propriété que nous appelons sa densité.

L'augmentation de la densité en prolongeant le temps et en augmentant la température jusqu'à  $83^{\circ}\text{C}$ , pourrait être expliquée par l'agrégation des protéines du blanc d'œuf après leur dénaturation pour former un gel dense en solution.

A partir de  $83^{\circ}\text{C}$  jusqu'à  $89^{\circ}\text{C}$  pendant 3,10 et 20 min la densité diminue ; ce qui pourrait correspondre à une précipitation des agrégats. En d'autres termes, l'albumen sort de solution; en laissant derrière lui une solution moins concentrée en protéines. La solution qui reste devient donc moins dense au fur et à mesure que l'albumen précipite et sédimente.

C'est ce qui se passe quand on fait du fromage. En ajoutant de la présure, la suspension de lait devient plus dense, mais quand la caséine précipite pour de bon (quand le fromage se forme), on a une séparation entre le précipité (le fromage lui-même) et ce qui reste de la phase aqueuse, le petit lait qui flotte au dessus.

D'après Donato (2004), les protéines agrégées forment des agrégats denses et sphériques, dont le diamètre varie selon la vitesse de chauffage appliquée au cours du traitement thermique. De manière générale, plus cette vitesse est lente et plus la taille des agrégats est importante.

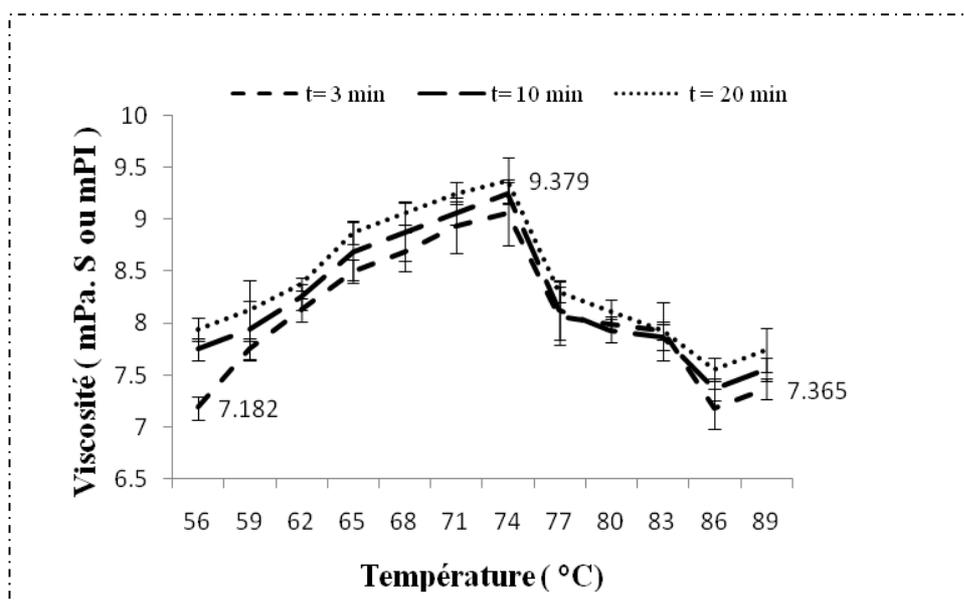
Selon Lechevalier (2005), l'augmentation de la densité des mousses est le premier effet connu du traitement thermique sur le blanc d'œuf. Des études ont mis en évidence la formation d'agrégats suite à des traitements thermiques, type pasteurisation. Or, la formation d'agrégats, en réduisant la proportion de protéines solubles et en augmentant la taille moyenne des molécules, peut contribuer à une augmentation de la densité des mousses.

Toutefois, des différences de comportement entre l'ovalbumine et la S-ovalbumine à l'interface air-eau ont été mises en évidence. Une diminution d'un facteur 2 du rayon de Stokes des agrégats formés à partir de la forme S de l'ovalbumine. La taille des particules étant un facteur de variation de la densité des mousses, la présence de S-ovalbumine peut donc contribuer à une diminution de cette dernière.

Neurath et Bull (1936) rapportent que, l'ovalbumine native a une densité inférieure à celle de l'état dénaturé, car les acides aminés de grande solubilité ont la plus petite densité. C'est évident que si la chaîne du peptide subit un déroulement puis une agrégation quand la protéine est dénaturée, sa densité devrait être plus haute que cela de toute autre structure possible.

#### I.4 Viscosité

Les résultats obtenus de la viscosité du blanc d'œuf sont donnés en annexe 7 et l'évolution de celle-ci en fonction de la température et du temps du traitement thermique est schématisée dans la figure ci-après :



**Figure N° 22 :** Evolution de la viscosité de solution du blanc d'œuf (dilution à 1/200, tampon Tris-HCl 20 mM, pH 8,2) en fonction de la température et du temps de traitement thermique.

Les résultats obtenus sur la figure 22 montrent une augmentation de la viscosité dans la gamme de température allant de 56°C jusqu'à 74°C puis elle diminue jusqu'à 89°C pour les trois temps étudiés (3,10 et 20 min).

L'analyse statistique ne révèle pas de différences significatives ( $P < 0,05$ ) de la viscosité en fonction du temps de chauffage de 3 et 10 min et s'avèrent significatives à 20 min. En fonction de la température, l'évolution de la viscosité est significative ( $P < 0,05$ ). De plus, il existe une interaction très hautement significative entre la température et le temps ( $F_{\text{obs}}=0,60$ ,  $P=0,90$ ).

La viscosité augmente de  $7,182 \pm 0,11$  mPI (à  $56^{\circ}\text{C}/3$  min) jusqu'à  $9,379 \pm 0,22$  mPI (à  $74^{\circ}\text{C}/20$  min). Au delà de  $74^{\circ}\text{C}$ , elle diminue jusqu'à  $7,365 \pm 0,1$  mPI (à  $89^{\circ}\text{C}/3$  min). Il faut noter que la viscosité est plus importante à 20 min qu'à 10 min et 3min respectivement. Donc en prolongeant la durée du traitement thermique et en augmentant la température, la viscosité de l'albumen augmente jusqu'à une valeur maximale située à  $74^{\circ}\text{C}$  et au delà de cette température, elle diminue.

L'augmentation de la viscosité des protéines globulaires sous l'effet de la chaleur pourrait être expliquée par leurs dénaturations suite à leurs dépliements pour former un réseau fibrillaire (gel) visqueux et plus étalé, et lorsque la température atteint  $74^{\circ}\text{C}$ , ces protéines dénaturées ont tendance à s'agréger et précipiter ce qui pourrait expliquer la diminution de leur viscosité. Une fois les protéines précipitées, elles ne contribuent plus à la viscosité de la solution (de même que des cailloux au fond d'un ruisseau n'affectent pas sa fluidité).

Selon Thapon et ces collaborateurs (1994), l'augmentation de la viscosité de  $56^{\circ}\text{C}$  à  $74^{\circ}\text{C}$  pourrait être expliquée par la dénaturation des protéines du blanc d'œuf suite à leur dépliement.

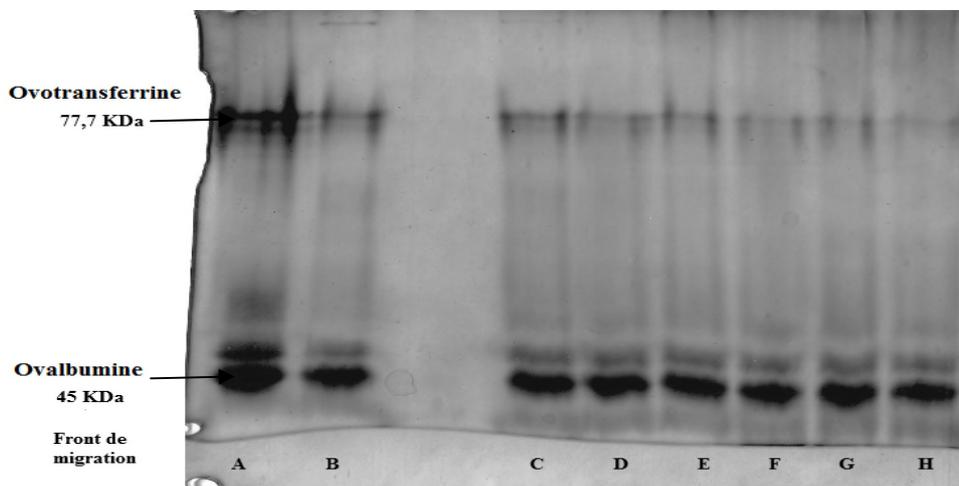
D'après Nathier-Dufair (2005), nous attribuons la viscosité élevée du blanc d'œuf frais à la présence d'une protéine fortement glycosylée, l'ovomucine, et au complexe qu'elle forme avec le lysozyme. Cette propriété est utilisée comme indicateur de fraîcheur de l'œuf puisqu'au cours de stockage, la viscosité diminue en raison de la dissociation du complexe provoquée par une élévation de pH ou de la température.

Selon Lechevalier (2005), La viscosité du blanc augmente brutalement à partir de  $60^{\circ}\text{C}$ , ce qui traduit la dénaturation des protéines. En deçà de cette température, elle diminue progressivement avec l'augmentation de la température. Un traitement thermique sévère diminue de façon beaucoup plus importante la longueur des fibres d'ovomucine, suite à

l'agrégation et précipitation de cette molécule visqueuse ; le blanc d'œuf perd totalement sa structure de gel. Ceci explique la chute brutale de la viscosité du blanc d'œuf à hautes températures.

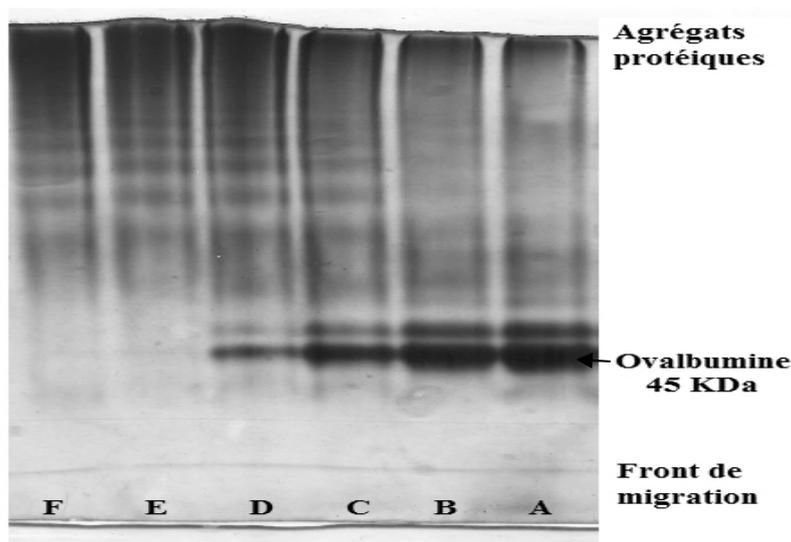
### **I.5 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions native (Native – PAGE)**

Les figures 23 et 24 montrent les profils électrophorétiques sur un gel de polyacrylamide (7,5%) en conditions natives des protéines du blanc d'œuf après traitement thermique pendant 20 minutes aux différentes températures énoncées en résultats et discussion.



**Figure N° 23:** Profil électrophorétique native des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min. **A:** témoin ( Oval, Ovot ,Lys ) à 1mg/ml , **B:** Blanc non traité , **C:** BT à 56°C, **D:** BT à 59°C, **E:** BT à 62°C, **F:** BT à 65°C, **G:** BT à 68°C, **H:** BT à 71°C.

- BT : Blanc d'œuf traité thermiquement



**Figure N° 24:** Profil électrophorétique native des protéines du blanc d’œuf sous l’effet du traitement thermique pendant 20 min. **A:** BT à 74°C, **B:** BT à 77°C , **C:** BT à 80°C , **D:** BT à 83°C, **E:** BT à 86°C, **F:** BT à 89°C.

Sur le premier gel, tous les échantillons sont semblables au contrôle négatif; appart la bande d’ovotransferrine dont l’intensité diminue à partir de 65°C , ce qui pourrait être due à son gélification suite à sa thermosensibilité .Comme la température la plus élevée ici est de 71°C, nous pouvant conclure que son effet sur la structure de l’albumen est minimal -ou du moins qu’il n’entraîne pas de modifications majeures dans sa structure telles qu nous pourrons l’observer sur un gel Blue Native ; la phase de dénaturation des protéines ne peut donc être visualisée sur un gel Blue Native.

Dans le deuxième gel, les températures élevées ont clairement un effet majeur car les protéines migrent toutes à une position plus élevée, suggérant une agrégation résistant aux conditions d’électrophorèse.

La comparaison entre les deux gels suggère que dans les conditions choisies, une coagulation et/ou une précipitation commence à être observée aux environs de 74°C, car c’est à cette température que des molécules de poids moléculaire plus élevé qui migrent moins et des agrégats de haut poids moléculaire sont visibles en haut du gel de séparation.

L'étalement des protéines vers le haut (figure 24) sur les pistes C, D, E et F indique que l'agrégation produit plusieurs molécules différentes de poids moléculaire bien déterminé.

La diminution de l'intensité des bandes du bas du gel dans les pistes C et D, ainsi que la disparition de celles des pistes E et F en augmentant la température est due à leur transformation en forme agrégées, qui se retrouvent plus haut dans le gel.

La forte bande qui se trouve en bas du gel est l'ovalbumine (45 KDa) car c'est la protéine la plus abondante du blanc d'œuf (54%), la bande plus faible qui se trouve immédiatement en haut de cette dernière est l'ovoinhibiteur (49 KDa) et la bande d'ovotransferrine (77,7 KDa) a disparue comparé au gel de la figure 23.

Des études ont montré que l'ovalbumine en Native-PAGE sur gradient de pH apparaît sous trois formes selon son degré de phosphorylation. La forme diphosphorylée A1 (pHi = 4,75, 87%), la forme monophosphorylée A2 (pHi = 4,89, 12%) et la forme non phosphorylée A3 (pHi = 4,94, 1%) (Desert et *al.*, 2001 ; Lechevalier, 2005).

Desert et ses collaborateurs (2001) ont montré que, certaines bandes ne migrent pas. Celles-ci devraient correspondre à des protéines incapables de pénétrer dans le gel d'acrylamide de 7,5 %. Cela pourrait être dû à leurs poids moléculaire élevé, donc elles s'agirait soit de l'ovomucine, de l'ovostatine ou bien d'agrégats protéiques.

Sous ces conditions de la NATIVE-PAGE réalisée (pH 8,8) et vu les valeurs du pI de plusieurs protéines du blanc d'œuf connus, seulement l'avidine et le lysozyme dont les pI sont respectivement 10 et 10,7 sont chargées positivement, donc elles ne devraient pas migrer vers l'anode et restent au niveau de la limite de séparation entre les deux gels, ce qui justifie l'absence de la bande de lysozyme sur le gel de la figure 23.

Une conclusion peut être faite sur la migration sur gel natif ; les protéines dénaturées ont tendance à s'agréger entre elles (à environ 74°C /20 min) à cause de l'exposition de résidus hydrophobes; ces agrégats migrent à des positions différentes.

## **I.6 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante (SDS – PAGE)**

Wang (2005) rapporte que, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode simple et traditionnelle pour la détermination d'agrégation des protéines. Les agrégats comportant des ponts disulfures peuvent être démontrés facilement sous des conditions non réductrices (absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol) et réductrices (présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol).

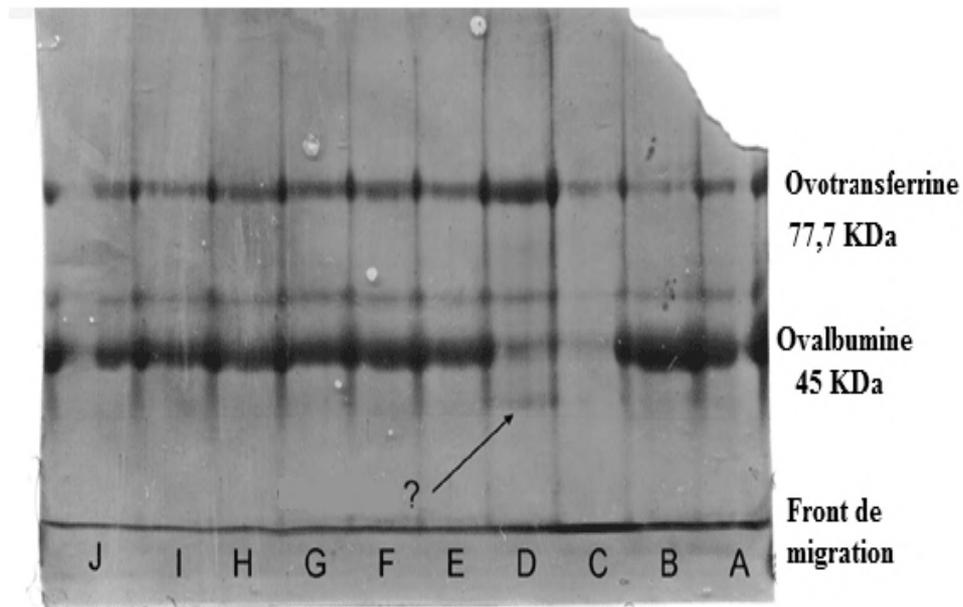
Dans la plupart des cas, cette technique est pratiquée sous des conditions dénaturantes en présence de SDS qui peut désassocier les agrégats physiques. Dans ce cas, les agrégats physiques ne peuvent pas être détectables. Pour surmonter cette limite, la native - PAGE ou la 2D native -PAGE sont nécessaires.

### **a) En présence de $\beta$ -Mercaptoéthanol**

En présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol + chaleur + SDS, toutes les sous unités polypeptidiques des protéines perdent leurs ponts disulfures éventuels, sont séparées, dénaturées et forment des micelles SDS - sous unité polypeptidique. Toutes ces micelles présentent alors la même densité de charge (rapport charge  $q$  sur le rayon hydrodynamique  $r$ ).

Ce sont les micelles ainsi obtenues qui vont être séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Comme toutes les micelles ont la même densité de charge et donc la même mobilité potentielle, c'est l'effet de tamisage moléculaire par le support gel qui sera mis en œuvre pour exercer l'effet séparatif différentiel.

La figure 25 montre la migration des protéines du blanc d'œuf après traitement thermique aux températures allant de 56°C à 71°C pendant 20 minutes sur un gel de polyacrylamide (10%) en condition dénaturante et en présence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol.



**Figure N° 25:** SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique en présence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. **A:** Blanc d'œuf non traité, **B:** Oval (1mg/ml), **C:** Lys (1mg/ml), **D:** Ovot (1mg/ml), **E:** BT à 56°C, **F:** BT à 59°C, **G:** BT à 62°C, **H:** BT à 65°C, **I:** BT à 68°C, **J:** BT à 71°C.

Sur le gel SDS, toutes les protéines sont dénaturées, ce qui permet de juger de leur état en conditions dénaturantes (particulièrement leur nombre).

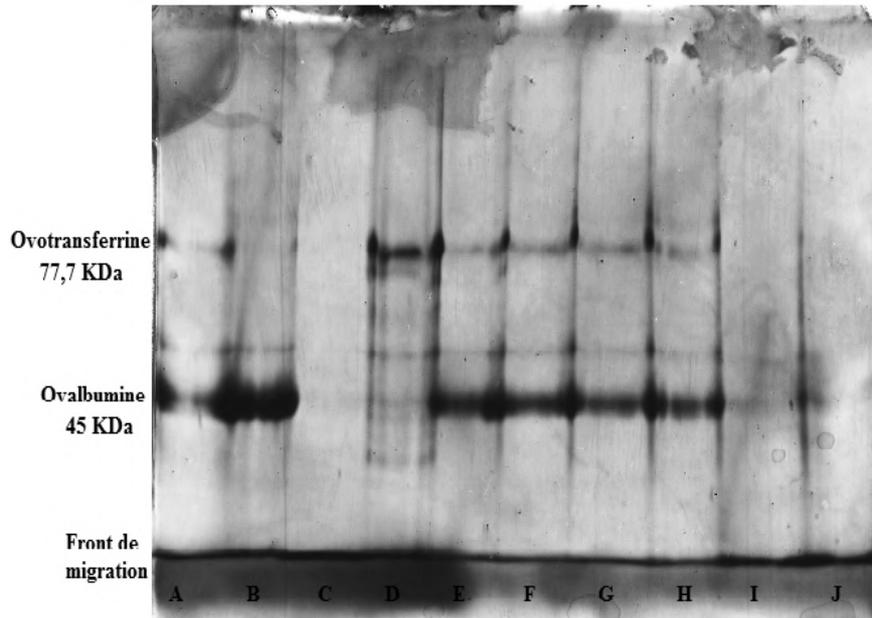
La piste A est le blanc d'œuf non-traité, elle indique quelles protéines sont en mesure d'être observées dans une coloration au bleu de Coomassie en condition dénaturante. Trois bandes se distinguent, dont deux majeures en haut et en bas du couloir A. Ces trois bandes devraient être, d'après les standards utilisés, l'ovotransferrine en haut, l'ovalbumine en bas, et probablement de l'ovoinhibiteur juste au dessus de cette dernière donnant une bande plus mince.

La piste B confirme la position de l'ovalbumine (la grosse bande en bas du gel). La piste C devrait contenir le lysozyme, mais cette protéine est trop petite (14 KDa) pour être séparée sur ce gel (10%). La bande de lysozyme est probablement noyée dans le front de migration. La piste D est l'ovotransferrine.

Les pistes de E à J donnent le même profil que le blanc d'œuf non-traité, et pour causes : d'abord, ces échantillons sont traités à des températures qui, comme déjà constaté sur les gels

Blue-Native, ne suffisent pas à changer la structure des protéines. En outre, puisqu'il s'agit ici d'un gel de SDS, toutes les protéines sont totalement dénaturées; une dénaturation préalable causée par la chaleur ne pourrait donc pas y être observée.

La figure suivante montre la migration des protéines du blanc d'œuf sur un gel de polyacrylamide (10%) en condition non native en présence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol après traitement thermique pendant 20 minutes aux températures allant de 74°C à 89°C .

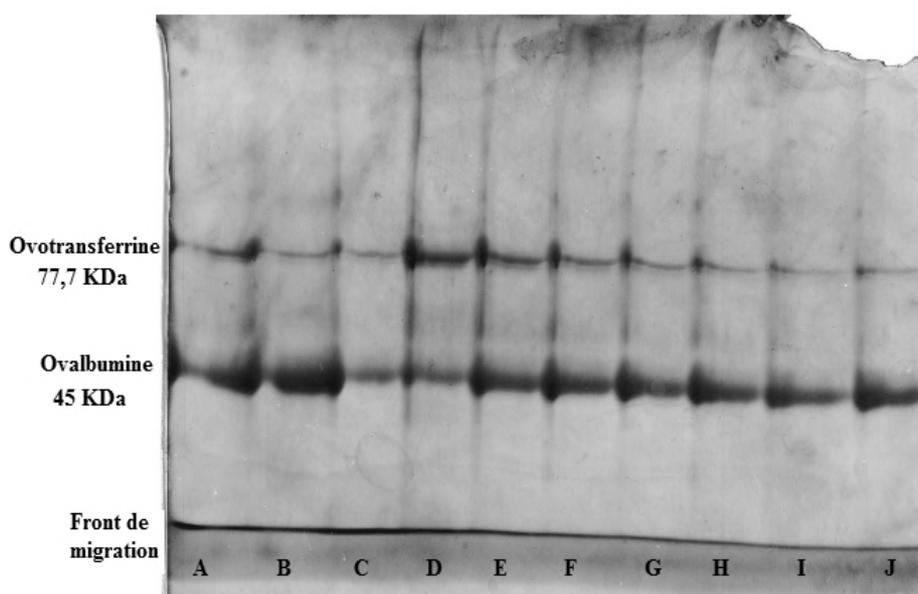


**Figure N° 26:** SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet des traitements thermiques en présence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. **A:** Albumen non traité, **B:** Oval (1mg/ml), **C:** Lys (1mg/ml), **D:** Ovot (1mg/ml), **E:** BT à 74°C, **F:** BT à 77°C, **G:** BT à 80°C, **H:** BT à 83°C, **I:** BT à 86°C, **J:** BT à 89°C.

Sur les pistes E, F, G, H, trois bandes dont l'intensité diminue en augmentant la température sont observées, et sur les pistes I et J ces bandes disparaissent. Cela pourrait être expliqué par la formation d'agrégats qui ne peuvent migrés dans ce gel. Alors nous pouvons dire que les agrégats formés impliquent des interactions autres que les ponts disulfures (interactions hydrophobes et électrostatiques).

**b) En absence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol**

La figure 27 et 28 montrent respectivement la migration des protéines du blanc d'œuf après traitement thermique aux températures de (56°C à 71°C) et (74°C à 89°C) pendant 20 minutes sur un gel de polyacrylamide (10%) en condition dénaturante en absence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol.

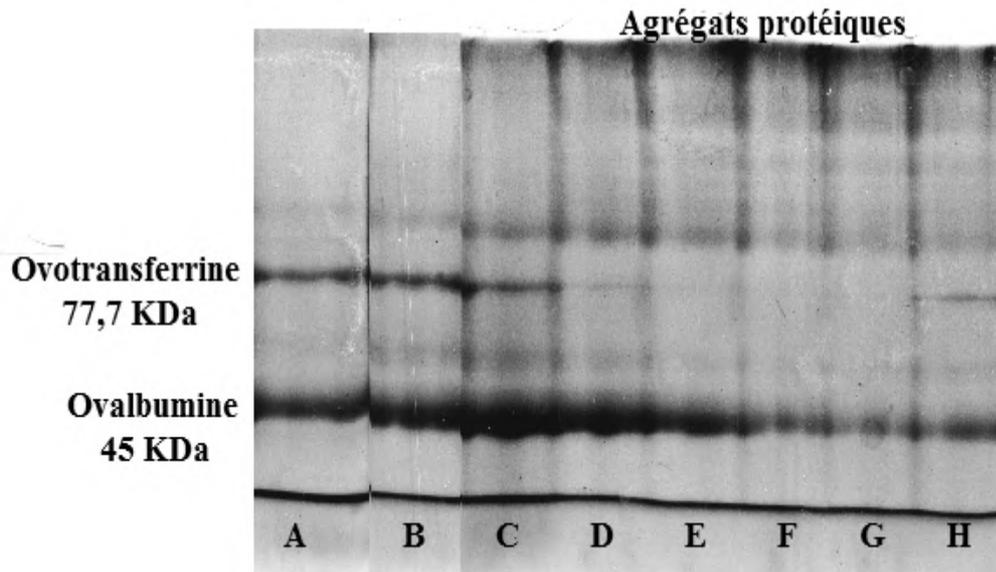


**Figure N° 27:** SDS-PAGE des protéines du blanc d'œuf sous l'effet du traitement thermique en absence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. **A:** Albumen non traité, **B:** Oval (1mg/ml), **C:** Lys (1mg/ml), **D:** Ovot (1mg/ml), **E:** BT à 56°C, **F:** BT à 59°C, **G:** BT à 62°C, **H:** BT à 65°C, **I:** BT à 68°C, **J:** BT à 71°C.

Comme pour les figures 25 et 26, sur la piste A (blanc d'œuf non-traité) deux bandes protéiques majeures en haut et en bas sont observées lesquelles correspondraient, d'après les marqueurs, à l'ovotransferrine en haut, et l'ovalbumine en bas du gel.

La piste B et D confirment les positions respectives de l'ovalbumine et de l'ovotransferrine. Les pistes E, F, G, H, I et J, donnent le même patron que le blanc d'œuf non-traité et nous remarquons la présence de deux bandes seulement (ovalbumine et ovotransferrine). En absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, le profil de l'échantillon est très comparable à celui obtenu en présence de l'agent réducteur. Cependant, par rapport au profil en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'intensité des bandes d'ovotransferrine et de l'ovalbumine a diminuée. Aussi nous remarquons l'absence de la bande que nous avons supposée d'ovoinhibiteur comparée au gel avec  $\beta$ -mercaptoéthanol.

La transition entre la dénaturation et l'étape d'agrégation dans cette gamme de température pourrait expliquer la diminution de l'intensité de chacune des deux protéines (ovalbumine et ovotransferrine) ainsi que la disparition de l'ovoïnhibiteur, ce qui suppose qu'elles mettent en jeu des liaisons de type ponts disulfures. D'ailleurs nous remarquons une couleur bleu en haut de gel de séparation, ce qui témoigne d'un début d'agrégation.



**Figure N° 28:** SDS-PAGE des protéines d'albumen sous l'effet du traitement thermique en absence de  $\beta$ -Mercaptoéthanol pendant 20 min. **A:** témoin (Oval, Ovot, Lys) à 1mg/ml, **B:** Blanc d'œuf non traité, **C:** BT à 74°C, **D:** BT à 77°C, **E:** BT à 80°C, **F:** BT à 83°C, **G:** BT à 86°C, **H:** BT à 89°C.

Pour les températures allant de 74°C à 89°C, et en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, des bandes supplémentaires sont visibles comparé au gel avec l'agent réducteur, ainsi que des bandes plus intenses de plus haut poids moléculaire à la limite entre le gel de séparation et le gel de concentration.

Sur la piste C (BT traité à 74°C), quatre bandes et des agrégats en haut du gel sont observés. Alors que sur les pistes D, E, F, G et H, deux bandes seulement (ovalbumine et la bande au dessus de l'ovotransferrine qui est représentée par une bande très mince correspondrait probablement à l'ovoïnhibiteur) sont visibles, dont l'intensité diminue en augmentant la température. En parallèle l'intensité des agrégats augmente avec la température et l'ovotransferrine disparaît.

Par ailleurs, la bande d'ovalbumine a perdu un peu de son intensité comparée à celle de la piste B en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, celle-ci serait donc partiellement agrégée.

Des agrégats sont visibles en haut du gel de concentration. Ils disparaissent en présence de l'agent réducteur, suggérant l'existence de liaisons covalentes type ponts disulfures. Ils impliquent l'ovotransferrine, l'ovalbumine et d'autres protéines de l'albumen qu'on n'a pas pu visualiser.

Lechevalier (2005) rapporte, qu'une solution à  $10 \text{ g.l}^{-1}$  d'ovalbumine, d'ovotransferrine et de lysozyme en tampon phosphate de sodium,  $67 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,1$ , conservant les ratios de concentration du blanc d'œuf (soit  $7,7$ ,  $1,8$  et  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ , respectivement), était exposée à l'interface air dans la colonne à mousse. Le mélange avant et après contact avec l'interface air était analysé par SDS-PAGE ( $12\%$ ) en conditions réductrices et non réductrices. Il a constaté qu'en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, les trois bandes caractéristiques de l'ovotransferrine, de l'ovalbumine et du lysozyme sont présentes à leurs poids moléculaires respectifs. Le rapport d'intensité des différentes bandes dans le mélange natif est en accord avec la proportion de chaque protéine introduite dans le mélange. En revanche, dans la mousse, ce rapport d'intensité est modifié. Alors qu'en absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol, des bandes supplémentaires sont visibles pour le mélange natif. En particulier, une bande assez intense apparaît au-dessus de la bande d'ovotransferrine correspondant au dimère d'ovalbumine ainsi que des bandes moins intenses de plus haut poids moléculaire. Par ailleurs, la bande de l'ovalbumine sous forme monomère a perdu  $28\%$  de son intensité. Celle-ci serait donc partiellement agrégée en solution. Dans la mousse, l'intensité de l'ensemble des bandes diminue et des agrégats sont alors visibles en haut du gel de concentration. Ces agrégats disparaissent en présence de l'agent réducteur, suggérant l'existence de liaisons covalentes type ponts disulfures. Ils impliquent l'ovotransferrine, l'ovalbumine et le lysozyme.

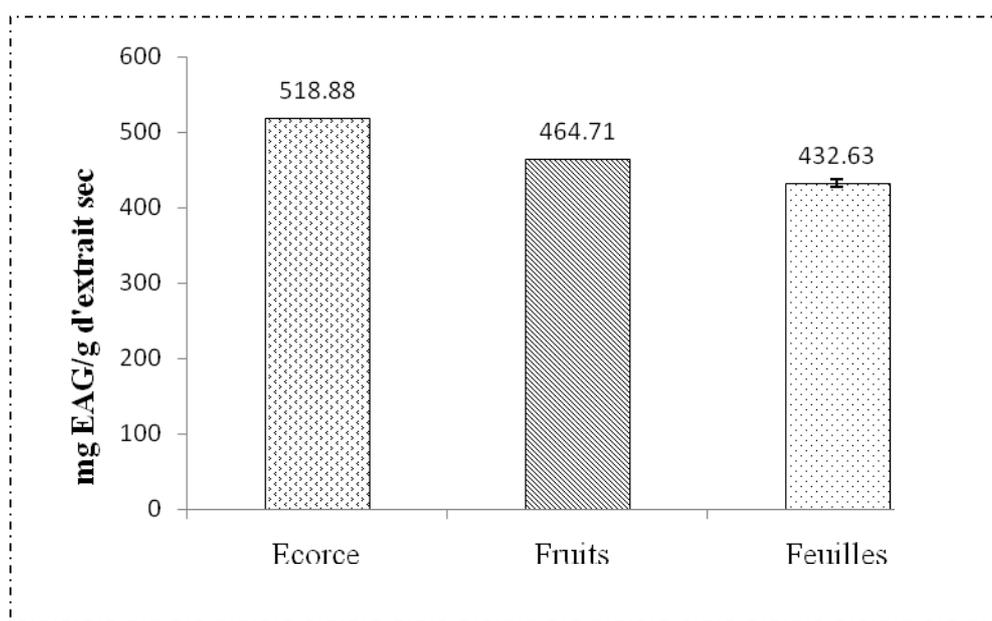
## II. Effet de l'addition des extraits de *Eucalyptus globulus* sur la dénaturation thermique des protéines du blanc d'œuf

### II.1 Caractérisation des extraits de la plante

#### II.1.1 Dosage des polyphénols totaux

La couleur bleue est observée après l'ajout du réactif de Folin-Ciocalteu, ce qui confirme la présence de polyphénols totaux dans les extraits de *Eucalyptus globulus* (feuilles, fruits et écorce). Le complexe Folin-Ciocalteu-polyphénols est stabilisé par le monohydrate de carbone sodique.

Le taux de polyphénols totaux dosés dans l'échantillon est déterminé à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique (annexe 8). Les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits de *Eucalyptus globulus* (écorce, fruits et feuilles) sont donnés dans l'histogramme ci-dessous :



**Figure N° 29:** Teneur en polyphénols totaux des extraits de *Eucalyptus globulus*.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'extrait d'écorce est le plus riche en polyphénols totaux avec une teneur de  $(518,88 \pm 0,41)$  mg EAG/g d'extrait sec, suivi par l'extrait des fruits  $(464,71 \pm 0,47)$  mg EAG/g d'extrait sec, et par l'extrait des feuilles contenant  $(432,63 \pm 4,59)$  mg EAG/g d'extrait sec.

D'un point de vue statistique, des différences significatives ( $P < 0,05$ ) existent concernant la teneur en polyphénols totaux entre les extraits des fruits, feuilles et écorce et que ce dernier s'avère le plus riche en polyphénols totaux.

Ces résultats montrent que l'écorce contient un taux relativement élevé de composés phénoliques.

Les polyphénols, sont une distincte famille de métabolites secondaire qui sont présent dans les feuilles, écorce, et fruit de beaucoup de plantes et arbres (Baxter, 1997).

D'après Vazquez et ses collaborateurs (2009), les extraits d'écorce de *Eucalyptus globulus* de différentes provenances espagnoles ont été caractérisés par l'abondance des polyphénols totaux, polymères de proanthocyanidines et ellagitannins.

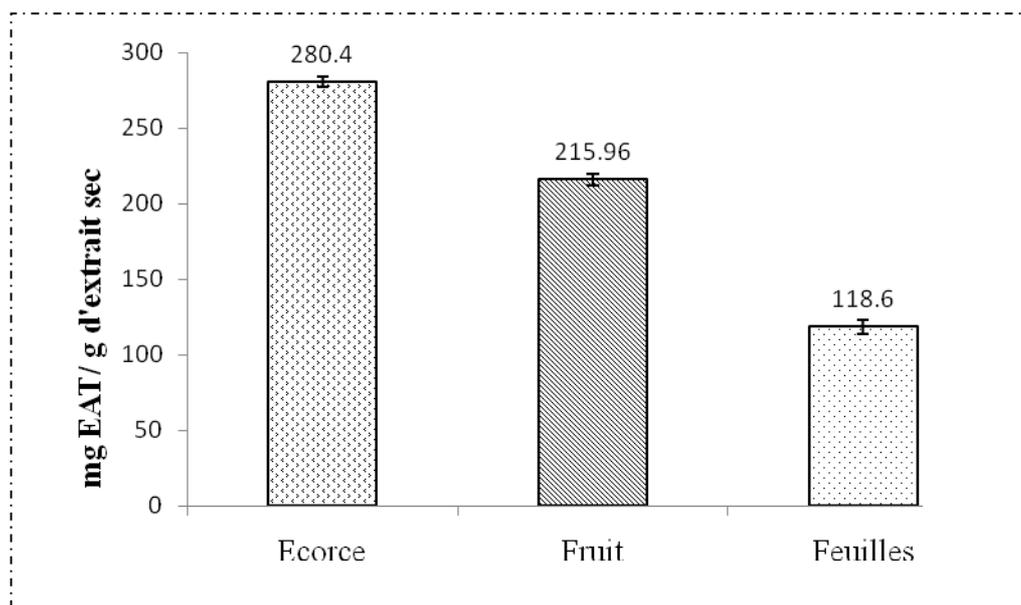
En effet, il a été déjà prouvé que la répartition des polyphénols dans une même plante varie d'une partie à une autre (Macheix et al ., 2005). Et que la teneur en ces composés dans la même plante dépend de plusieurs facteurs. Une même partie récoltée à des périodes différentes, présente des taux en composés phénoliques différents (Shahidi et Bhanger , 2006) .

### **II.1.2 Dosage des tannins**

La quantité des tanins fixés sur la BSA est mesurée par spectrophotométrie à 510 nm après la formation d'un chélate d'ion ferrique–tanin dans une solution alcaline, contenant (SDS/TEA) en plus du chlorure ferrique.

La teneur en tanins des extraits étudiés est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide tannique (annexe 8).

Les résultats de dosage des tannins totaux de *Eucalyptus globulus* sont donnés dans l'histogramme ci-dessous :



**Figure N° 30:** Teneurs en tannins totaux des extraits de *Eucalyptus globulus*.

Nous constatons selon ces résultats, que l'extrait d'écorce est plus riche en tannins ( $280,4 \pm 3,23$ ) mg EAT/g d'extrait sec, suivi d'extrait de fruit avec une teneur de ( $215,96 \pm 3,98$ ) mg EAT/g d'extrait sec , puis de l'extrait des feuilles ( $118,6 \pm 4,7$ )mg EAT/g d'extrait sec .

L'analyse statistique a révélée une différence significative ( $P < 0,05$ ) concernant la teneur en tannin totaux entre les trois extraits étudiés et que l'extrait d'écorce est le plus riche en ces composés .

Cette estimation en teneur de tannins nous a permis de déduire que les composés contenus dans les extraits de *Eucalyptus globulus* ont une caractéristique de précipitation des protéines. Dans cette présente étude, il s'agit du sérum albumine bovine.

Les tannins sont des métabolites secondaires présents dans de nombreuses plantes ligneuses et herbacées (Zimmer et Cordesse , 1996). Ils peuvent exister dans divers organes de la plante : racines ou rhizomes ,écorce, bois , feuilles, fleurs et graines.Cependant, ils sont plus

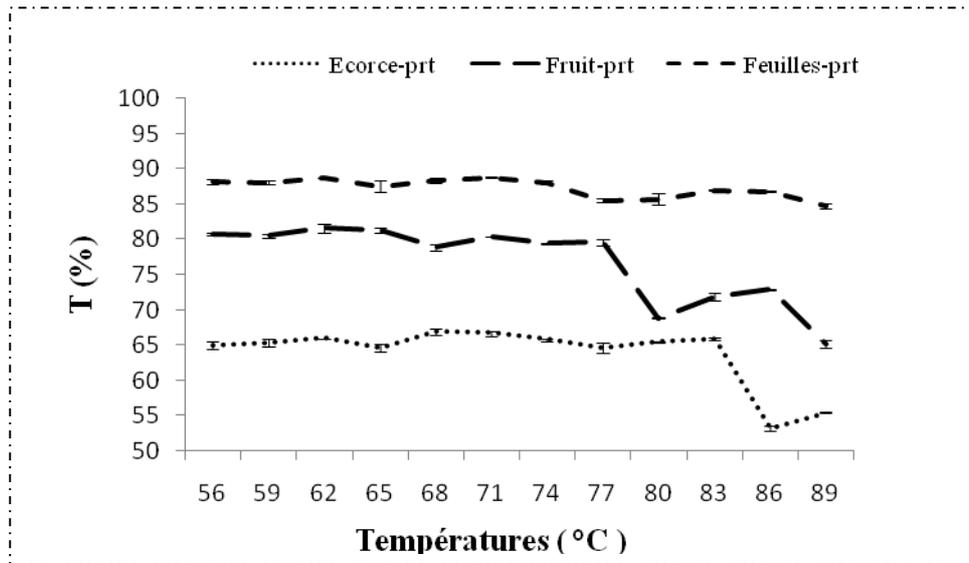
concentrés dans les écorces (Paris et Hurabeille,1981). Ce qui explique la richesse des extraits d'écorce de *Eucalyptus globulus* en tannins par rapport aux autres parties (fruits et feuilles).

L'importance de ces molécules dans une même espèce végétale dépend de nombreux facteurs dont certains liés à la plante elle-même : génétiques, organe de la plante , aussi les conditions environnementales influent sur la teneur en tannins des plantes : un ensoleillement important et un sol peu fertile favorisent la synthèse des tannins par les plantes.La pression de pâturage des herbivores a également été mise en évidence comme facteur agissant positivement sur leur synthèse (Zimmer et Cordesse , 1996).

## **II.2 Turbidité des mélanges extrait de *Eucalyptus globulus* –albumen**

La complexation tannin –protéine est un processus de reconnaissance moléculaire qui semble impliquer principalement des interactions hydrophobes, renforcées par la formation de liaisons hydrogènes. Dans cette théorie, les protéines possédant un grand nombre de prolines constituent de bons modèles pour étudier les mécanismes impliqués tel que l'ovalbumine qui est la protéine majeure dans le blanc d'œuf (54%).

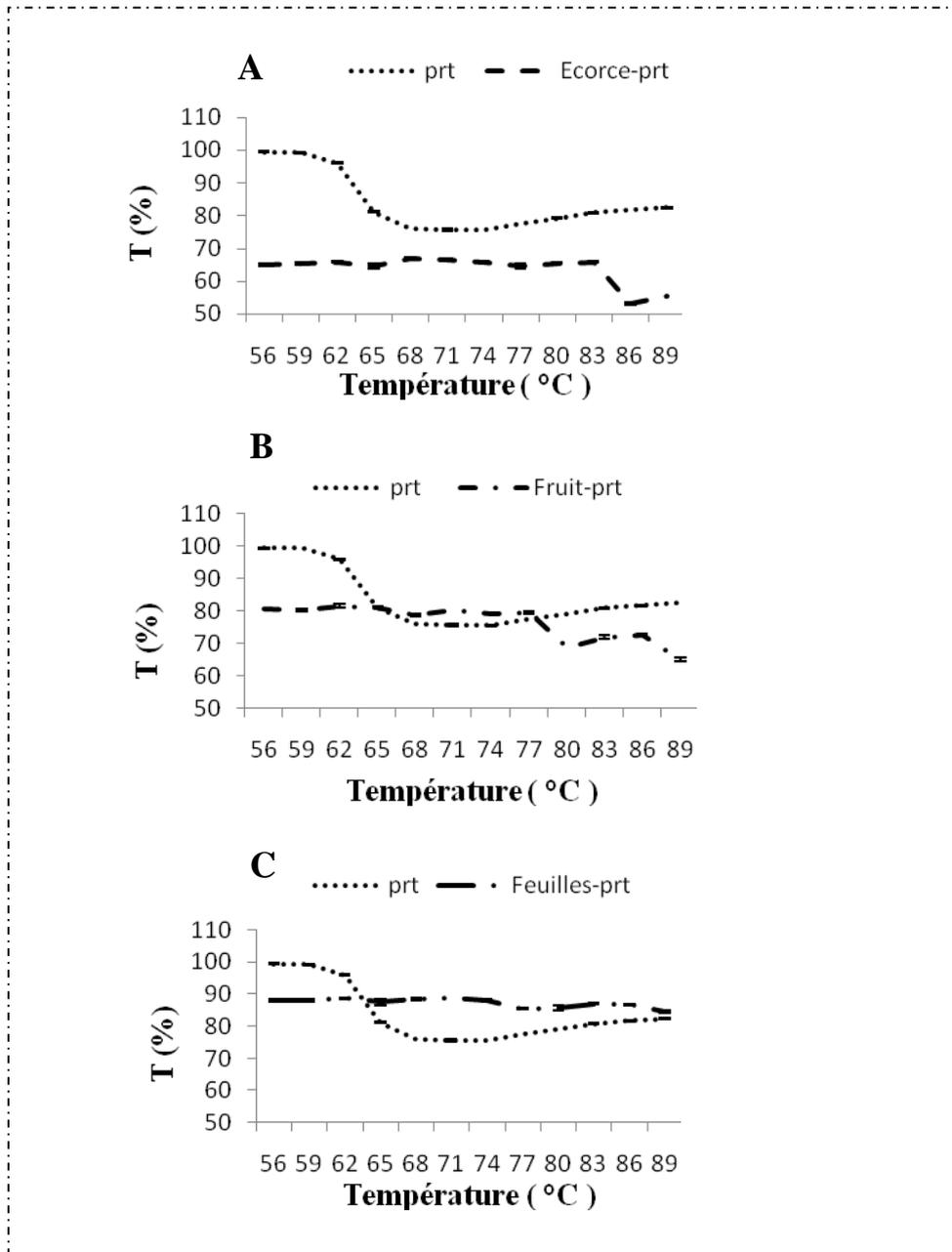
La mise en contact des extraits de *Eucalyptus globulus* (fruits, feuilles et écorce) à 1mg/ml avec une solution d'albumen avant de subir un traitement thermique à différentes températures pendant 20 min, conduit à l'apparition d'un trouble issu de la formation des complexes polyphénols-protéines. Ce trouble est évalué en mesurant le % de la transmittance à 650 nm. Les résultats obtenus sont rapportés en annexe 9. L'évolution de la transmittance en fonction des températures de dénaturation est illustrée dans la figure 31.



**Figure N° 31 :** Effet des extraits de *Eucalyptus globulus* sur la turbidité des protéines du blanc d'œuf sous l'effet de la température.

La forme sigmoïdale à pente négative obtenue en première partie de l'analyse avec l'albumen seule (figures 17 et 18) n'a pas été retrouvée dans la figure 31 (voir les courbes de comparaison sur la figure 32).

L'analyse statistique révèle des différences significatives ( $P < 0,05$ ) de transmittance en fonction de la température, le trouble le plus intense est signalé à 89°C pour les trois mélanges. Des différences significatives ( $P < 0,05$ ) en fonction de l'extrait utilisé ( $P < 0,05$ ) sont aussi à noter. La turbidité du complexe écorce-albumen est plus importante que celle des complexes fruits-albumen et feuilles-albumen respectivement. Il n'existe pas d'interaction entre le type d'extrait et la température ( $F_{obs}=176,91$  ;  $P=0$ ).



**Figure N° 32 :** Courbes de comparaison entre la turbidité des protéines d’albumen seules et celle des complexes protéine-extrait de *Eucalyptus globulus* sous l’effet de la chaleur. **A :** écorce, **B :** fruits, **C :** feuilles.

Il est à constaté sur les courbes de comparaison de la figure 32, que l’addition des extraits a provoqué une diminution de la transmittance de  $(99,43 \pm 0,19) \%$  à  $(65 \pm 0,51) \%$  pour l’extrait d’écorce, jusqu’à  $(80,76 \pm 0,15) \%$  pour l’extrait des fruits et à  $(88,2 \pm 0,40) \%$  pour l’extrait des feuilles à  $56^\circ\text{C} / 20 \text{ min}$ . Donc une augmentation de la turbidité qui pourrait être expliquée par des interactions entre les protéines d’albumen et les polyphénols des extraits ajoutés.

Aussi une stabilisation des protéines d'albumen vis-à-vis de la chaleur notamment avec l'extrait des feuilles a été constatée.

En effet, la dénaturation des protéines sous l'effet de la chaleur provoque un remaniement structural de la protéine laissant apparaître à leurs surfaces des groupements hydrophobes. Ce qui mène à conclure que l'interaction entre les extraits étudiés et l'albumen est de type hydrophobes.

Ce qui est à remarqué est aussi une prolongation de la phase stationnaire 1 correspondante à la phase de dénaturation des protéines (pour les trois extraits étudiés) au profit de la phase d'agrégation (phase descendante), comparé à celle d'albumen sans extrait de plante. Cette prolongation est notée dans l'intervalle de température allant de 56 à 83°C/20 min pour l'extrait d'écorce, de 56 à 77°C / 20 min et de 56 à 74°C/ 20 min pour ceux des fruits et feuilles respectivement.

La prolongation de la phase de dénaturation au profit de la phase d'agrégation pourrait être due à la formation de complexes protéines-polyphénols liés essentiellement par des liaisons hydrophobes, ce qui augmente la turbidité comparée à celle de l'albumen seul. Ces complexes gêneraient les interactions protéine-protéine, ce qui retarde la phase d'agrégation. Donc les polyphénols interagissent avec les groupements hydrophobes des protéines dénaturées et les empêche de se liées les unes aux autres.

En présence d'oxygène, plusieurs polyphénols seront oxydés plus rapidement par la chaleur et dégradés .Ce qui conduit à la formation des quinones qui se lient directement aux protéines par des liaisons covalentes, ou s'oligomérisent ou encore se polymérisent pour interagir enfin avec les protéines par des liaisons covalentes pour former des complexes de haut poids moléculaire. Ce qui justifie l'augmentation de la turbidité à partir de 83°C pour l'extrait d'écorce, 77°C pour l'extrait de fruits et 74°C pour l'extrait de feuilles.

D'après les résultats de dosage des polyphénols totaux et tannins totaux, l'extrait d'écorce est la partie la plus riche en ces composés suivi par les fruits et les feuilles respectivement. Cela est confirmé par le fait que l'extrait d'écorce quand il est ajouté à l'albumen, forme des solutions plus turbides comparées à celles formées avec les extraits de fruits et feuilles respectivement.

Les tannins sont responsables en majeure partie des complexes polyphénols-protéines, en effet plusieurs travaux ont démontré que ces derniers se lient aux protéines principalement par des liaisons hydrophobes.

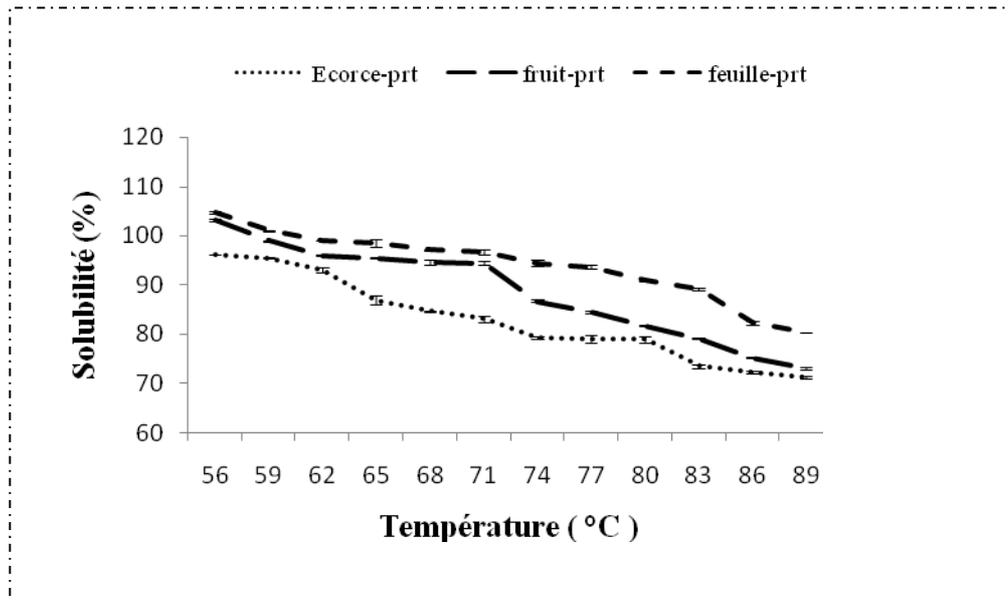
L'augmentation de la température cause la diminution des liaisons de type hydrogène par contre, elle augmente les interactions de type hydrophobe (Prigent, 2005). A de hautes températures, il se créera des interactions covalentes entre les protéines globulaires et les polyphénols (Cooper *et al* , 2001).

Abi Azar (2007) rapporte que, des solutions de caséine  $\beta$  et de  $\beta$ -lactoglobuline sont mises en présence de polyphénols de caroube pour un rapport polyphénol/protéine de 100. Le trouble entraîné par la réaction est suivi au spectrophotomètre à 600 nm. L'extrait de caroube provoque un trouble beaucoup plus important que la catéchine ou l'acide gallique. Ce qui est expliqué par le fait que les monomères, les dimères et quelques oligomères ne peuvent pas former assez de ponts croisés et de forts complexes avec les protéines. Or l'extrait de caroube présente une composition en polyphénols complexe et comprenant de grosses molécules polyphénoliques pouvant complexer les protéines à la différence des monomères que sont la catéchine et l'acide gallique.

Cheynier et ses collaborateurs (1988) ; Forget et ses collaborateurs (1992) suggèrent que, les hautes températures causent l'oxydation des polyphénols, qui forment ainsi des quinones instables, et réagissent soit en se condensant avec d'autres molécules phénoliques non oxydées ; ce qui aboutirait à des produits finaux (polyphénols) de hauts poids moléculaires qui rentreraient en interactions covalentes avec les protéines selon un mécanisme multidentellé pour former des complexes de haut poids moléculaires qui précipitent. Soit se condensent directement avec les protéines par des liaisons covalentes.

### II.3 Solubilité des mélanges extrait de *Eucalyptus globulus* –protéines d’albumen

Les résultats obtenus sont rapportés en annexe 10. L'évolution de la solubilité des extraits d'écorces, fruits et feuilles de *Eucalyptus globulus* à 1mg/ml mélangés avec des protéines du blanc d'œuf (1/1) avant le traitement thermique à différentes températures pendant 20 min , est illustrée dans la figure suivante :



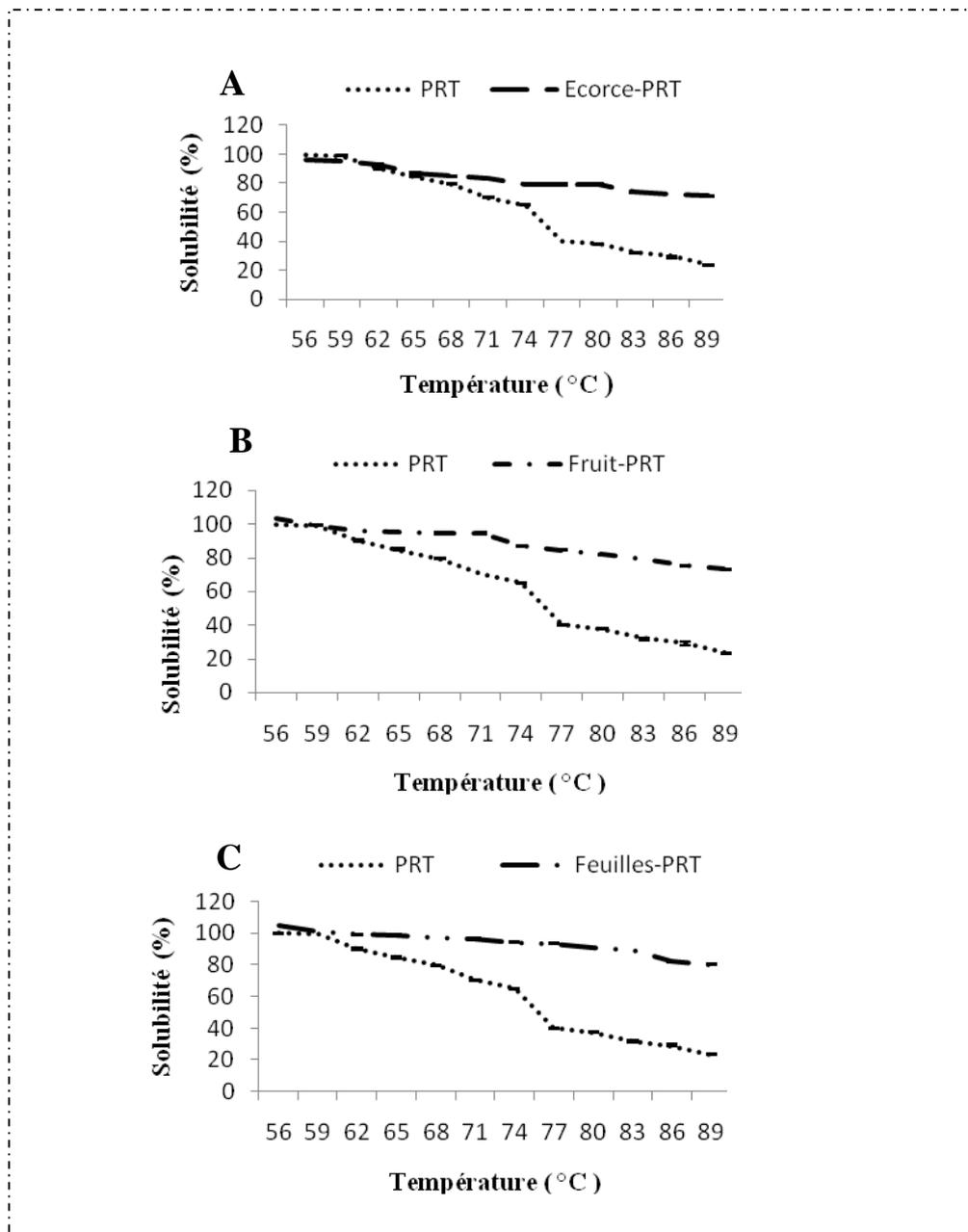
**Figure N° 33 :** Effet des extraits de *Eucalyptus globulus* sur la solubilité des protéines du blanc d’œuf.

D’après ces résultats, nous constatons que la perte de solubilité de l’albumen chauffé à différentes températures en présence d’extraits de plante de *Eucalyptus globulus* est moins importante comparée aux résultats obtenus sans extrait de plante (courbes de comparaison sur la figure 34) et cela pour les trois extraits utilisés notamment avec l’extrait des feuilles.

L’analyse statistique révèle une diminution significative ( $P < 0,05$ ) de solubilité des complexes extrait-albumen en fonction de l’extrait ajouté, et que cette perte est plus importante avec l’extrait d’écorce comparée à celle des extraits des fruits et feuilles respectivement. En augmentant la température la perte de solubilité est significative ( $P < 0,05$ ). De plus, il n’existe pas d’interaction entre les facteurs extrait et température ( $F_{obs}=96,960 ; P=0$ ).

Selon la figure 34, l’addition des extraits d’écorce, fruits et feuilles de *Eucalyptus globulus* avant le traitement thermique au blanc d’œuf a provoqué une diminution de la perte de solubilité des protéines comparée à celle observée lors d’un traitement thermique de

l'albumen seul sans extrait de plante ; les polyphénols et plus précisément les tannins des extraits induiraient une diminution de la vitesse d'agrégation des protéines suite à leur complexation avec les protéines de l'albumen , ce qui gênerait les interactions protéine – protéine.



**Figure N° 34** : Courbes de comparaison entre la solubilité des protéines d'albumen seules et celle des complexes protéines-extrait de différentes parties de *Eucalyptus globulus* sous l'effet de la température . **A** : écorce, **B** : fruits, **C** : feuilles.

Comme l'écorce est l'extrait le plus riche en polyphénols totaux et tannins totaux comparé à ceux des fruits et feuilles respectivement, il forme plus de complexe tannins-protéines. Cela explique la perte importante de solubilité des protéines lors de l'ajout de l'extrait d'écorce par rapport à celle notée lors de l'addition des extraits de fruit et feuilles respectivement à l'albumen.

Selon Abi Azar, (2007); Haslam et ses collaborateurs, (2002); Simon, (2003), la précipitation des protéines par les tannins augmente généralement avec la température, ce qui induit la diminution de leur solubilité. L'augmentation de la température rompt les liaisons hydrogène, déroule les protéines, permettant aux sites hydrophobes concentrés à l'intérieur des protéines d'être exposés aux interactions hydrophobes qui peuvent les lier aux polyphénols. D'ailleurs plusieurs études ont mis en évidence un effet hydrophobe dans les interactions tannin-protéines. Mais une augmentation excessive de la température conduit à inactiver les tannins.

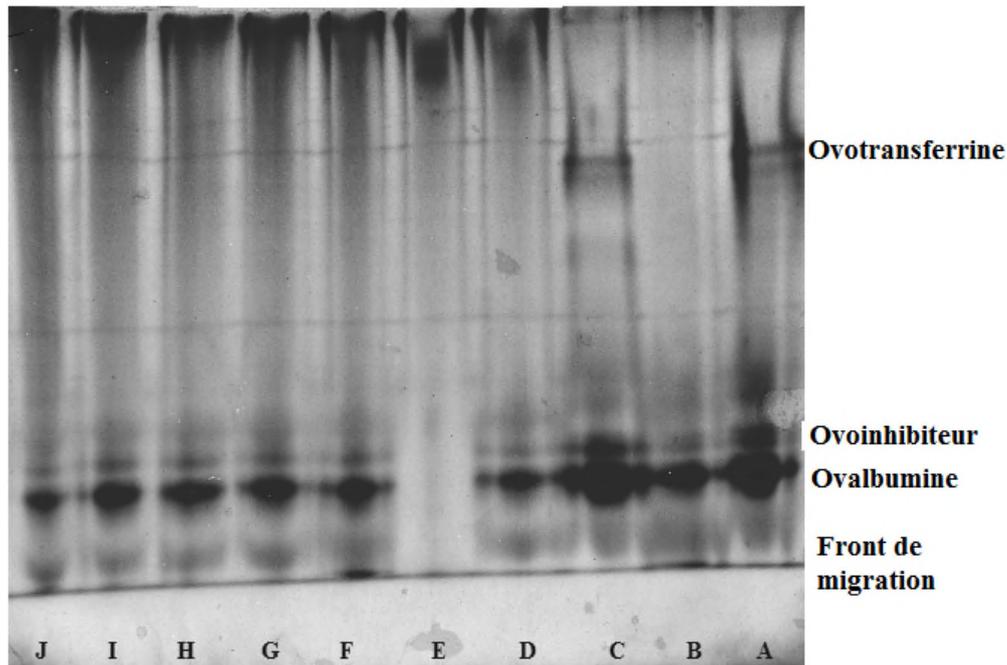
Les polyphénols forment par oxydation, des ortho-quinones qui sont des molécules hautement réactives pouvant permettre des liaisons covalentes tannin-protéine, mais, à l'heure actuelle, il n'y a que peu d'arguments pour l'existence de liaisons covalentes entre tannins et protéines (Abi Azar, 2007).

Les interactions protéine-tannins peuvent modifier les propriétés fonctionnelles des aliments, elles provoquent souvent une diminution de la solubilité des protéines (Prigent *et al.*, 2009). Alors nous pouvons conclure que, plus il y a de tannins présent et moins l'albumen est soluble car les polyphénols vont s'associer aux protéines et les isoler des molécules d'eau, tout en favorisant les interactions hydrophobiques.

#### **II.4 NATIVE-PAGE des mélanges extrait d'écorce – protéines d'albumen sous l'effet de la température**

Les figures 35 et 36 montrent les profils électrophorétiques en conditions natives des mélanges extrait d'écorce-albumen (1 /1) sous l'effet du traitement thermique à différentes températures (respectivement de 56°C à 68°C et de 71°C à 89°C), pendant 20 min sur un gel de polyacrylamide (7,5%). L'extrait phénolique est ajouté avant le traitement thermique.

Complexes protéines-polyphénols



**Figure N° 35** : Profil électrophorétique native des protéines du blanc d’œuf mélangé avec l’extrait d’écorce de *Eucalyptus globulus* sous l’effet du traitement thermique pendant 20 min. **A**: témoin (Oval, Ovot, Lys) à 1mg/ml, **B**: témoin – extrait (1/1), **C**: albumen sans traitement thermique, **D** : albumen non traité –extrait (1/1), **E** : extrait d’écorce à 1mg/ml , **F**: E-A traité à 56°C, **G**: E-A traité à 59°C, **H**: E-A traité à 62°C, **I**: E-A traité à 65°C, **J**: E-A traité à 68°C .

- E-A : écorce-albumen

La piste A est le témoin, sur laquelle nous constatons trois bandes, Ces trois bandes devraient être l’ovotransferrine en haut, l’ovalbumine en bas et l’ovoinhibiteur juste au dessus de cette dernière (solution contaminées par l’ovoinhibiteur).

La piste B représente le complexe témoin-écorce, sur laquelle nous observons que deux bandes, qui sont l’ovalbumine et l’ovoinhibiteur dont l’intensité a diminuée par apport à celle de la piste A (sans addition d’écorce). La disparitions de l’ovotransferrine en haut du gel est à noter.

La piste C est le blanc d'œuf non-traité, sur laquelle trois bandes sont observées. Ces trois bandes devraient être, l'ovotransferrine en haut, l'ovalbumine en bas, et l'ovoïnhibiteur juste au dessus de cette dernière.

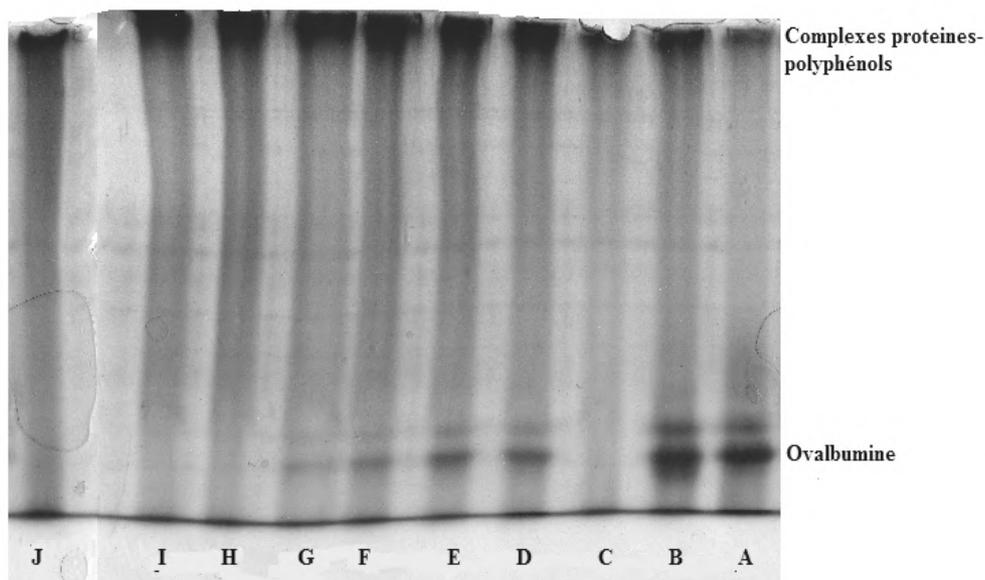
La piste D représente le mélange albumen non traité- écorce, sur laquelle deux bandes sont visibles, qui devraient correspondre à l'ovalbumine et l'ovoïnhibiteur, dont l'intensité est plus faible comparée à celle de la piste C. Là aussi, une disparitions de l'ovotransferrine est à noter.

La piste E représente la migration de l'extrait d'écorce. Les molécules de ce dernier restent à l'interface entre le gel de concentration et le gel de séparation.

Sur les pistes F, G, H, I et J, deux bandes similaires à celles observées sur la piste D (albumen non traité-écorce) sont observées et qui devraient correspondre à l'ovalbumine et l'ovoïnhibiteur. Une couleur bleu foncé à l'interface du gel de séparation et du gel de concentration apparait en fonction de la température. Elle est plus remarquable comparée à celle de la piste D.

La diminution de l'intensité de l'ovalbumine et d'ovoïnhibiteur pourraient être expliquée par leurs interaction partielle avec les polyphénols et la disparition de l'ovotransferrine par son interaction complète pour former des complexes de poids moléculaire élevés , qui ne peuvent migrer dans le gel .La couleur bleu foncée qui apparait à l'interface des deux gels correspond probablement aux complexes protéines-polyphénols dont la taille augmente avec le traitement thermique suite à la dénaturation des protéines qui expose leurs groupement hydrophobes .

Sur les pistes D, E, F et G de la figure 36, l'intensité des deux bandes (ovalbumine et ovoïnhibiteur) diminue à partir de 71°C par apport au gel de la figure 35 jusqu'à disparition complète à partir de la piste H (83°C). L'intensité de couleur bleu foncée à l'interface des deux gels est proportionnelle à la disparition des deux bandes. Plusieurs travaux ont montré que les polyphénols essentiellement les tannins fixent les protéines et forment des complexes insolubles qui ne peuvent pas migrer dans les gel d'électrophorèse (Vergé et *al.* , 2002).



**Figure N° 36:** Profil électrophorétique native des protéines du blanc d'œuf mélangé avec l'extrait d'écorce de *Eucalyptus globulus* sous l'effet du traitement thermique pendant 20 min. **A** : témoin (Oval, Ovot ,Lys ) à 1mg/ml – extrait d'écorce (1mg/ml), **B** : albumen non traité – extrait d'écorce (1/1), **C** : extrait d'écorce à 1mg/ml, **D** : E-A traité à 71°C, **E** : E-A traité à 74°C, **F** : E-A traité à 77°C, **G** : E-A traité à 80°C, **H** : E-A traité à 83°C, **I** : E-A traité à 86°C, **J** : E-A traité à 89°C.

- E-A : écorce-albumen

Les tannins jouent un rôle de ligand polydenté, ils s'associent avec les protéines par des interactions hydrophobiques et par des liaisons hydrogènes (Hagerman et Butler, 1978).

Les interactions de type hydrophobe peuvent se produire entre les groupements galloyls des polyphénols et les acides aminés tels que l'alanine, la valine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, la cystéine et la glycine (Annexe 11). Alors que les liaisons de type hydrogène impliquent les interactions entre le groupement hydroxyle des composés phénoliques et l'azote et/ou l'oxygène de certains acides aminés tel que : la lysine, l'arginine, l'histidine, l'asparagine, le glutamate, la serine, la thréonine, la cystéine et le tryptophane de la protéine (Annexe 11) (Yan et Bennic, 1995) .

Prigent (2005) rapporte, qu'en présence de polyphénols avec un degré de polymérisation élevé (les tannins), la température renforce les interactions hydrophobes, contrairement aux liaisons hydrogènes qui diminuent avec l'augmentation de la température.

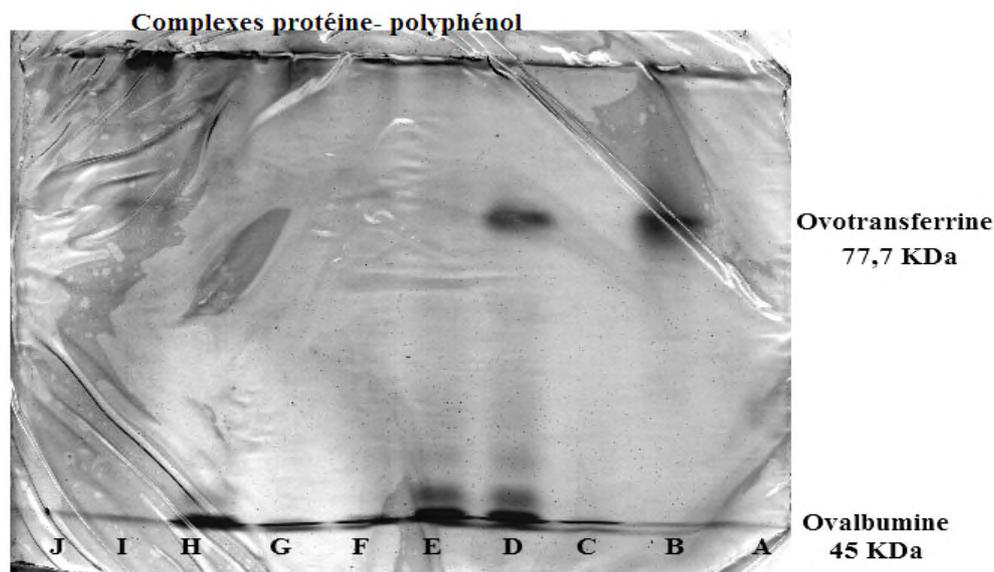
Aucune interaction n'a été observée entre tannins et protéines à des valeurs de pH où les groupements hydroxyles phénoliques du tannin sont ionisés, ce qui indique que les interactions ioniques avec les protéines ont peu d'importance (Hagerman et Butler, 1978). A noter que lorsque les groupements hydroxyles sont ionisés, des répulsions électrostatiques empêchent la complexation (Abi Azar , 2007).

Donc les complexes polyphénols-protéines analysés sont probablement dus aux interactions hydrophobes.

Abi Azar (2007) a montré, en effectuant une électrophorèse sur gel native de polyacrylamide (Phast-system) qu'avec l'extrait de caroube, une diminution nette des protéines lactières majeures (caséine  $\beta$ , caséine  $\alpha_1$ ,  $\beta$ -lactoglobuline et  $\alpha$ -lactalbumine) a été constaté, diminution qui est accentuée quand la quantité d'extrait est augmentée. Cette diminution se traduit même par une disparition complète de certaines bandes protéiques, plus particulièrement celles qui correspondent aux protéines lactières sériques. Ce résultat confirme donc que l'ensemble des protéines lactières est complexé par l'extrait de caroube.

## II.5 NATIVE-PAGE des mélanges extrait d'écorce – protéines d'albumen sans traitement thermique

La figure 37 montre le profil électrophorétique en conditions natives des mélanges protéines d'albumen – écorce (1 /1) sur un gel de polyacrylamide (7,5%).



**Figure N° 37 :** Profil électrophorétique native des protéines d'albumen mélangées avec l'acide tannique et avec l'extrait d'écorce de *Eucalyptus globulus* . **A:** Lys à 0,5 mg/ml , **B:** Ovotr à 0,5 mg/ml , **C:** Oval à 0,5 mg/ml, **D:** albumen , **E:** albumen-écorce , **F:** Oval-écorce , **G:** Oval – acide tannique , **H:** albumen-acide tannique , **I :** Ovotr – écorce, **J :** Lys – écorce.

La piste A devrait contenir le lysozyme mais selon le  $pH_i$  de cette dernière, elle devrait rester à l'interface des deux gels, ce qui justifie son absence sur le gel de séparation. La piste B contient une seule bande qui correspond à l'ovotransferrine à 0,5 mg/ml. Sur la piste C, il s'agit de l'ovalbumine à 0,5 mg/ml.

La piste D présent les bandes du blanc d'œuf entier, qui renferme plusieurs protéines mais les plus visibles sur ce gel sont : l'ovotransferrine en haut, l'ovalbumine (bande la plus intense) en bas du gel et l'ovo-inhibiteur juste au-dessus de cette dernière.

Sur la piste E, la migration du complexe albumen entier et extrait d'écorce a été réalisée. L'absence de l'ovotransferrine est à noter, qui devrait être complexé aux polyphénols

d'écorce et reste alors à la limite des deux gels. Ce qui est à remarquer est aussi que les bandes d'ovalbumine et d'ovoïnhibiteur n'ont pas été modifiées.

La piste F représente l'ovalbumine –écorce, comparé à la piste C (ovalbumine seule), aucune différence n'est à noter.

Sur la piste G, le mélange ovalbumine-acide tannique a été analysé. Aucune différence n'a également été notée en comparaison à la piste C (ovalbumine seule).

Alors pour le cas de l'ovalbumine, deux hypothèses peuvent être émises :

- Soit elle n'interagit ni avec les polyphénols d'extrait d'écorce ni avec l'acide tannique.
- Soit elle interagit avec ces composés par des interactions très faibles, ce qui explique la même distance de migration soit en présence ou pas d'extrait de plante sur le gel de la native-page et qu'elle a une faible affinité vis-à-vis des polyphénols.

Cette protéine présente un poids moléculaire de 45KDa, la moitié de ces acides aminés sont hydrophobes et un tiers sont des résidus chargés, en majorité acides, lui conférant un  $pH_i$  de 4,5. Elle contient une grande proportion de résidus proline (15 pro/mole) comparée au reste des protéines de l'albumen. Elle possède donc toutes les conditions nécessaires pour interagir avec les polyphénols, soit par des liaisons hydrophobes, ioniques ou hydrogènes ce qui contredit la première hypothèse.

L'ovalbumine est la seule protéine du blanc d'œuf qui possède des groupements -SH libres. Alors, il est probable qu'elle interagisse avec l'oxygène des -OH des polyphénols par ses groupes -SH libres (entre l'hydrogène d'un groupe -SH de l'ovalbumine et l'oxygène du groupe -OH des polyphénols) en formant des liaisons hydrogènes faibles ou avec ses groupements amines libres, groupements carboxyliques ou aminé des liaisons peptidiques.

Yon (1969) rapporte que, le groupe -SH est susceptible de former des liaisons hydrogène et que l'aptitude à former de telles liaisons dépend du caractère attracteur d'électrons, c'est -à-dire de l'électronégativité des deux atomes reliés par liaison hydrogène. Le soufre est beaucoup moins électronégatif que l'oxygène et ne contractera que des liaisons hydrogène de faible énergie.

Zimmer et Cordesse (1996), ont classé l'ovalbumine comme une protéine ayant une faible affinité vis-à-vis des tannins condensés de sorgho, en utilisant la BSA marquée à l'iode radioactif comme molécule compétitrice.

Mais en traitant thermiquement la solution d'ovalbumine à 83°C ou plus, en présence d'extrait d'écorce sur le gel de la figure 36, une disparition complète de sa bande et l'apparition des complexes Oval-polyphénols à la limite des deux gels ont été notées. Alors que cette bande reste sur le gel de la figure 24 à cette même température quand la solution d'albumen sans extrait d'écorce est traitée thermiquement à la même température.

Sur la piste H de la dernière figure, l'ovotransferrine de l'albumen interagit complètement avec l'acide tannique et forme un complexe lourd qui reste à la limite des deux gels, ce qui justifie l'absence de la bande correspondant à cette protéine. Une diminution de l'intensité de la bande correspondant à l'ovoinhibiteur due à son interaction partielle avec l'acide tannique est à constater, alors que l'ovalbumine reste inchangée sur les pistes D et E.

La piste I renferme l'ovotransferrine complexée avec l'extrait d'écorce, nous remarquons une diminution importante de l'intensité de sa bande comparée à celle de la piste B. Cela est expliqué par l'interaction forte de l'ovotransferrine avec les polyphénols d'écorce et le complexe reste en haut du gel due à son poids moléculaire élevé.

D'après ces expériences, nous pouvons conclure que les protéines du blanc d'œuf interagissent avec l'extrait d'écorce par des interactions hydrophobes (renforcées par la chaleur), essentiellement l'ovotransferrine due à son poids moléculaire élevé et sa richesse en acide aminés hydrophobes (28 pro/mole). Celle-ci forme alors des complexes protéines-polyphénols de poids moléculaire élevé qui ne peuvent migrer sur le gel de la native-page.

Une exception est notée pour l'ovalbumine native, qui interagit avec les polyphénols probablement via des interactions hydrogènes formées entre les fonctions hydroxyles des groupements phénols et ses groupements sulfhydriles libres ou les groupements amines libres, groupements carboxyliques ou aminé des liaisons peptidiques. Ainsi que sa faible affinité vis-à-vis des polyphénols, cela explique la migration de sa bande à la même distance en présence ou en absence de l'extrait d'écorce. Alors que l'ovalbumine dénaturée (température  $\geq 83^\circ\text{C}$ )

interagit avec l'extrait d'écorce par des interactions hydrophobes pour former des complexes protéines-polyphénols visualisables par la disparition de sa bande sur le gel de la native-page.

# *Conclusion*

## Conclusion

Les ovoproduits sont utilisés comme ingrédients dans de nombreux secteurs agroalimentaires pour leur techno-fonctionnalité unique.

Les traitements de stabilisation appliqués au blanc d'œuf permettent une bonne maîtrise de l'hygiène mais aussi induisent une altération des propriétés fonctionnelles. En effet, lorsque le blanc d'œuf est soumis à un traitement thermique, ses protéines globulaires sont sujettes à des modifications de structure et de conformation. Selon l'étendue de la température et de la durée du traitement appliqué, ces modifications peuvent aller de la dénaturation à la gélification ou à la coagulation.

Le présent travail a été réalisé pour étudier et évaluer l'effet du traitement thermique sur certaines propriétés physico-chimiques du blanc d'œuf. Les paramètres suivants ont été utilisés : dilution du blanc d'œuf à 1/200<sup>ème</sup>, tampon Tris-HCl à 0,02M, pH 8,2. Enfin, l'addition d'un agent de précipitation (extraits d'écorce, fruit et feuilles de *Eucalyptus globulus*) pendant le traitement thermique a été réalisée afin d'évaluer son effet sur la dénaturation thermique de ces protéines ; après une caractérisation phytochimique des différents extraits.

Les résultats de l'analyse de l'effet du traitement thermique de 56°C jusqu'à 89°C pendant 3,10 et 20 min sur certaines propriétés physico-chimiques des protéines de l'albumen révèlent, une évolution sigmoïdale de la transmittance. Cette sigmoïde comporte quatre parties distinctes :

Phase stationnaire 1 : La transmittance est stable en fonction de la température. Il s'agit de la phase de dénaturation des protéines ;

Phase descendante : Correspond à une évolution négative de la transmittance en fonction de la température. Elle pourrait être considérée comme la phase de transition entre l'étape de dénaturation et l'étape d'agrégation, sa pente nous renseigne sur la vitesse de cette transition ;

Phase stationnaire 2 : Elle correspond à la phase d'agrégation des protéines ;

Phase ascendante : La diminution du trouble à partir de 86°C, pourrait être expliquée par la sédimentation des agrégats formés.

La dénaturation des protéines du blanc d'œuf est un phénomène irréversible. En effet, l'analyse des propriétés physico- chimiques tel que la turbidité et solubilité réalisée après 24 heures de stockage à 4°C n'a révélé aucun changement supplémentaire considérable dans ces propriétés.

Des modifications de la densité ainsi que de la viscosité ont été constatées suite au traitement thermique de l'albumen.

L'analyse des profils électrophorétiques des protéines natives de l'albumen traitées à différentes températures pendant 20 min, montre l'apparition de plusieurs bandes, ce qui dénote une diversité des protéines du blanc d'œuf. La comparaison de ces profils avec ceux n'ayant subi aucun traitement thermique, montre l'apparition de nouvelles bandes et des mobilités relatives différentes dues à la formation d'agrégats protéiques.

L'ovotransferrine commence à se gélifier au environ de 65°C /20 min.

Une coagulation et/ou une précipitation aux environs de 74°C/20 min a été observée.

Les agrégats du blanc d'œuf comportent des liaisons non covalentes ( hydrophobes et électrostatique) et covalentes de type ponts disulfures. Ceci a été démontré par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS- PAGE (10%) sous des conditions non réductrices (absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol) et réductrices (présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol).

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et tannins de différentes parties de *Eucalyptus globulus* (fruits, écorce et feuilles) indiquent que : l'extrait d'écorce est le plus riche en polyphénols totaux et en tannins respectivement de ((518,88 $\pm$ 0,41) mg EAG /g ES, (280,4 $\pm$ 3,23) mg EAT/g ES), suivi par l'extrait de fruits ((464,71 $\pm$ 0,47) mg EAG/g ES, (215,96  $\pm$ 3,98) mg EAT/g ES ) et de l'extrait des feuilles qui en contient ((432,63 $\pm$ 4,59) mg EAG/g ES ,(118,6  $\pm$ 4,7)mg EAT/g ES) respectivement .

Les solutions d'extraits de *Eucalyptus globulus* (fruits, feuilles et écorce) à 1mg/ml sont mélangées à la solution d'albumen puis traitées thermiquement aux mêmes températures que celles énoncées en première partie du travail. La durée du traitement est de 20 min pour chaque température.

Le traitement thermique de l'albumen, en présence des extraits de plantes, conduit à une prolongation de la phase de dénaturation des protéines pour les trois extraits étudiés au profit

de la phase d'agrégation et une perte de solubilité moins importante comparée aux résultats obtenus sans extrait de plante, notamment avec l'extrait des feuilles. Par conséquent, l'extrait de plante augmenterait la stabilité de l'albumen vis-à-vis de la chaleur.

La NATIVE-PAGE des mélanges extrait d'écorce-albumen (1/1) traités à différentes températures pendant 20 min, a confirmé la formation des complexes protéines-polyphénols qui restent en haut du gel de séparation. Une complexation totale de l'extrait d'écorce avec l'ovotransferrine à 56°C/20 min a été constatée, alors que cela ne se produit avec l'ovalbumine qu'à partir de 83°C/20 min.

La NATIVE-PAGE des protéines pures non traitées, confirme une forte affinité de l'ovotransferrine vis-à-vis de l'extrait d'écorce probablement via des interactions hydrophobes et une faible affinité de l'ovalbumine vis-à-vis de ce même extrait.

L'ovalbumine native interagit avec les polyphénols probablement via des interactions hydrogènes faibles formées entre les fonctions hydroxyles des groupements phénols et ses groupements sulfhydriles libres ou les groupements amines libres, groupements carboxyliques ou aminés des liaisons peptidiques. Mais lorsque celle-ci est dénaturée (température  $\geq 83^\circ\text{C}$ ), elle interagit avec l'extrait d'écorce par des interactions plus fortes probablement de type hydrophobes pour former des complexes protéines-polyphénols qui restent en haut de gel de séparation.

Une étude plus large pourrait permettre d'évaluer l'effet de la chaleur sur les propriétés des protéines du blanc d'œuf, notamment, par l'utilisation des méthodes calorimétriques telle la calorimétrie différentielle à balayage (DSC).

Afin de mieux caractériser les protéines du blanc d'œuf, il serait souhaitable d'approfondir cette étude par d'autres techniques d'investigation, notamment en utilisant l'électrophorèse bidimensionnelle et d'effectuer des répétitions afin d'appuyer les résultats du traitement thermique.

Les résultats de l'étude interactionnelle des extraits de *Eucalyptus globulus* (fruits, feuilles et écorce) avec les protéines du blanc d'œuf vis-à-vis de la chaleur sont obtenus à partir d'extraits qui contiennent plusieurs composés, donc la purification de ces substances par HPLC, CCM, GC-MS ainsi que la RMN sont nécessaires pour l'étude interactionnelle protéines-polyphénols.

Des investigations plus fines tout comme la détermination du nombre de site de liaisons des polyphenols avec les protéines, mais aussi la mise en évidence de la nature de l'interaction, ou encore l'étude de l'aspect thermodynamique du complexe seront des approches complémentaires à la compréhension de l'interaction protéines-polyphénols.

# *Références bibliographique*

- **Abi Azar. R. (2007).** Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus. Thèse de doctorat.
- **Adrian. J, Potus .J, Poiffait. A. (1998).** Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Ed. Tech. Et Doc. Lavoisier. Paris, 254 p.
- **Alais .C, Linden. G. (1997).** Abrégé de biochimie alimentaire. Ed. Masson. Paris, 248 p.
- **Allemeersch . C. (1983).** Les ovoproduits en France. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire D'Aflort, **70** :1-151.
- **Appavou. M-S. (2005).** Etude de l'influence de la température et de la pression sur la structure et la dynamique de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine. Une étude par diffusion de neutrons .Thèse de doctorat. Université de Paris XI Orsay. Spécialité : Biophysique .1-228.
- **Baxter.N.J, Lilley.T.H, Haslam.E, Williamson.MP. (1997).** Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein .Repeat Result in Complexation and Precipitation .*Biochemistry* , **36**: 5566-5577.
- **Bennick .A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med.* **13**(2):184-196.
- **Berrada. S. (2009).** Les protéines : structure, propriétés et applications technologiques .Biochimie appliquée dans les filières SBSSA. Lycée Simone WEIL. PLP Biotechnologies. 1-13.
- **Bradford .M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye biding. *Analytical Biochemistry*, **72** : 248–254.
- **Cai.K, Bennick.A . (2006)** .Effect of salivary proteins on the transport of tannin and quercetin across intestinal epithelial cells in culture. *Biochemical pharmacology* **72**: 974 – 980.
- **Campbell. L, Raikos. V, Euston. S.R. (2003).** Modification of functional properties of egg-white proteins, *Nahrung/Food* **47**(6): 369-376.
- **Cheftel .J.C, Cuq. J.L, Lorient. D. (1985).** Protéines alimentaires : biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle. Ed. Tec et Doc. Lavoisier. Paris, 306 p.
- **Cheyrier.V,Osse .C,Rigaud.J.(1988).**Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions.*J.Food Sci.***53**:1729-1732 .
- **Coimbra.J.S.R,Gabas.A.L,Minim.L.A,Rojas.E.E.G,Telis.V.R.N,Telis-Romero.J.(2006).**Density, heat capacity and thermal conductivity of liquid egg products.*Journal of Food Engineering* **74**:186-190.

- **Cooper. A, Nutley. M. A, Wadood. A. (2001).** Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. A practical approach; Harding, S.E.; Chowdhry, B.Z., Ed. Oxford University Press: Oxford, England, 287-318.
- **Cowan .M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev*, **12** (4): 564-582.
- **Croguennec.T,Nau.F,Brulé.G.(2002).**Influence of pH and salts on egg white gelation. *Journal of Food Science*. (67):608-614.
- **Cunningham .F. E. (1976).** Propriétés du drainage de mousse de blanc d'œuf. *La Science De Volaille*, (55):738-743.
- **Davis.C,Reeves.R. (2002).** High Value opportunities from the chicken egg. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. ISBN: 0642 58493 1; ISSN 1440-6845.
- **Desert.C, Guérin-Dubiard. C, Nau. F, Jan. G, Val. F , Mallard. J. (2001).** Comparison of Different Electrophoretic Separation of Hen Egg White Proteins., *Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Food Chem.* (49):4553-4561.
- **Donato. L. (2004).** Gélification et séparation de phase dans les mélanges protéines globulaires/pectines faiblement méthylées selon les conditions ioniques. Thèse de doctorat. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires.
- **Ferreira .M, Fernauda. R. T , Oliveira. R. (1999).** Application de la microfiltration au blanc d'œuf épuisé dans l'ovomucine. *Journal international de science et de la technologie Alimentaire*, **34** (1) :1365-1373.
- **Filion. M-M. (2006).** Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction .Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation .Université Laval Québec.
- **Gauthier.F. (2000).** Contribution à l'étude de l'absorption de protéines aux interfaces. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. Discipline physique.
- **Groguennec. T. (2000).**Influence de l'environnement ionique sur la structure et la fonctionnalité des protéines du blanc d'œuf. *Ecole national supérieure agronomique de Rennes. Diplôme de doctorat de physico-chimie et qualité des bioproduits.* 1-165.
- **Gueye .P-M. (2007).** Phénotypes majeurs de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge .Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur.
- **Hagerman .A. E, Butler. L. G. (1981).** The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. *The Journal of Biological Mistry*, **256** (9): 4444-4497.

- **Hagerman.E,Butler.L .G.(1978).**Protein precipitation Method for the Quantitative Determination of tannins .Journal of Agriculture . Food Chemistry. **26(4)**: 809-812.
- **Hagolle. N. (1997).**Modification de structure de protéines du blanc d'œuf sous l'effet de traitements thermiques. Influence sur quelques propriétés fonctionnelles. Universités de Paris VII, Paris XI et ENSIA. 229 p.
- **Hatta. H, Hagi.T ,Hirano.K.(1997).**Chemical and physicochemical properties of hen eggs and their application in foods. Their basic and applied science.CRC Press. Boca Raton. 117-133.
- **Hirose. M. (2003).** Globular proteins. *Progress in Biotechnology, Volume 23*.ISSN 0921-0423. Published by Elsevier Science B.V.
- **Huntington. J, Stein. A. P. E. (2001).** Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B*. 756, 189–198.
- **Huopalahti.R,Lopez-Fandino.R,Anton.M,Schade .R.(2007).**BioactiveEgg Compounds.ISBN-13 :978-3-540-37883-9 .Springer Berlin Heidelberg New York.
- **Ibrahim .H. R, Higashiguchi .S, Juneja. L. R, Kim .M, Yamamoto .T. (1996).** A structural phase of heat denatured lysozyme with Novel Antimicrobial Action. Journal of agricultural Food Chemistry, **44**:1416-1423.
- **Ibrahim.H. R, Aoki. T, Pellegrini. A. (2002).** Stratigies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and Aprotinin as model molecules. Current pharmaceutical design.**8**: 671-693.
- **Ibrahim.H.R,Iwamori.E,Sugimoto.Y,Aoki .T.(1998).**Identification of a distinct antibacterial domain within the N-lobe of ovotransferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1401**: 289–303.
- **Jeantet.R,Croguennec.T,Schuck.P,Brulé.G .(2007) .**Technologie des produits alimentaires. Edition : Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-0888-8.
- **Laemmli. U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227(259)**: 680–685.
- **Lafon. Ph, Lafon. F. (2009).** L'œuf et les ovoproduits. Technique de l'ingénieur. F7010. 1-21.
- **Lechevalier.V. (2005).**Ciaisaillement, création d'interfaces et traitement thermique. Thèse de Doctorat de physico-chimie et qualité des bioproduits .Ecole de doctorat vie-Agro-Santé.

- **Leinmüller .E, Steingass. H, Henke .K.H. (1991).** Tannins in ruminant feedsutuffs. *Animal Research and Developpement*, **33**: 9-56.
- **Linden,G. Lorient,D. (1994).** Ovoproduits : In biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Edition : Masson, **6** : 121-137.
- **Lorient. D. (2009).** Modifications biochimiques des constituants alimentaires. *Techniques d'Ingénieur* **3400** : 1-20.
- **Lorient.D,Matringe.E,Vey.F,Bourgeois-Adragna.O .(1994).** Propriétés fonctionnelles , sensorielles et nutritionnelles des ovoproduits .In : L'œuf et ovoproduits. Paris : Tec et Doc .Lavoisier .ISBN : 2-85206-903-2 .368 p.
- **Ma. C, Holme. J. (1982).** Effect of chemicalmodification on some physicochemical properties and heat coagulation of egg albumen. *Journal Food Science*.**47**:1454-1459.
- **Machado. F. F, Coimbra. J. S. R, Rojas. E.E.G, Minim. L.A, Oliveira. F.C, Soussa. R.C.S. (2007).** Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration.Science direct. *LWT* **40**:1304–1307.
- **Marchiex .J.J,Fleuiet.A,Jay-Allemand.C.(2005).** Les composés phénoliques des végétaux , un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires Romandes. 87-149.
- **Marotte. P, Garcia. L, Estorc. V. (2000).** L'œuf en cuisine, ses différents états physiques. Science et Aliment.
- **McMurry.J,Simanek.E.(2007).** Chimie organique .Les grandes principes. Dunod ,Paris. ISBN : 978-2-10-050547-0.
- **Mine .Y. (2008).** Egg Bioscience and Biotechnology. Department of Food Science. University of Guelph. Willy –Interscience. ISBN: 978-0-470-03998-4.
- **Mine. Y. (1995).** Recent advances in the undestanding of egg white protein fonctionality. *Trends in Food Science and Technologie*, **6**: 225-232.
- **Nathier-Dufair.N.(2005).** Les œufs et les ovoproduits.Collection j'apprends.Coordination pédagogique CNPR .Educagri éditions .ISBN :2-84444-384-2.
- **Nau. F, Marc.A, Yves. N. (2003).**L'œuf de poule : une mine de molécules à activité biologique. Cinquième Journée de la Recherche Avicole, Tours.
- **Nau. F,Gestin.L,Protais. J,Awade. A,Thapon.J.L.(1995).** Etude comparée des propriétés fonctionnelles et de la composition des fractions épaisse et liquide du blanc d'œuf de poule. ENSAR Département Agro-alimentaire, Renne. 113p.
- **Navizet.I .S.L. (2004).** Modélisation et analyse des propriétés mécaniques des protéines. Thèse de doctorat. Université Paris 6 Pierre & Marie Curie.

- **Neurath.H,Bull.H.B.(1936).**The denaturation and hydration of proteins. From the Division of Agricultural Biochemistry, University of Minnesota,St. Paul.519-527.
- **Ngarise. S, Adams. A, Howell. N. K. (2005).**Comparative study of heat and high pressure induced gels of whey and egg albumen proteins and their binary mixtures.Food hydrocolloids.**19**:984-996.
- **Ngarise.S, Adams.A , Howell.N.K.(2004).**Studies on egg albumen and whey protein interaction by F.T-Raman spectroscopy and rheology.Food hydrocolloids .**18**:49-59.
- **Nys. Y, Sauveur. B. (2004).**Valeur nutritionnelle des œufs. *INRA Prod. Anim* ,**17 (5)** : 385-393.
- **Othman .A ,Ismail.A ,Abdul Ghani.N,Adenan.I.(2007).**Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* , **100**: 1523-1530.
- **Papadopoulou.A,Frazier.R.A.(2004).**Characterization of protein-polyphenol interactions.Trends in Food Science & Technology ,**15**:186-190.
- **Paris.M,Hurabeille.M.(1981).**Abrégé de matière médicale. Pharma Cognosie. Edition: Masson.99-215.
- **Prigent, S. (2005).** Interactions of phenolic compounds with globular proteins and their effects on food-related functional properties .Thèse de doctorat. ISBN: 90-8504-267-4.
- **Prigent.S.V.E,Voragen.A.G.J.Vankoningsveld .G.A,Baron.A,Renard.C.M.G.C,Gruppen.H.(2009).**Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization.American Dairy Science Association .**92** :5843-5853.
- **Réhault. S, Anton.M, Nau. F, Gautron. J, Nys.Y. (2007).** Les activités biologiques de l'œuf. *INRA Prod. Anim* , **20 (4)** : 337-348.
- **Relkin. P, Launay. B. (1990).** Concentration effects on the kinetics of -lactoglobulin heat denaturation: a differential scanning calorimetric study. *Food Hydrocolloids* , **4**:19-32.
- **Ribéreau-Gayon .J,Sudraud .E ,Ribéreau-Gayon .P.(1982)** .Composés phénoliques. *In* « Sciences et technique du vin : Analyse et contrôle des vins traité d'œnologie ».Tom I, 2ème Ed .Dunod. Paris .477-511.
- **Ribéreau-Gayon .P. (1968)** .Notion générale sur les composés phénoliques. *In* : Les composés phénoliques des végétaux. Dunod. Paris.
- **Richard-Forget.F.C, Rouet-Mayer.M-,Goupy.P.M,Philippon.J,Nicolas.J.J. (1992).**Oxidation of chlorogenic acid ,catechins,and 4-methylcatechol in model solutions by apple polyphenol oxidase.*J.Agric.Food Chem.***40**:2114-2122.

- **Sanchez. C, Frémont. S. (2003).** Conséquences des traitements thermiques et de la formulation sur la structure et l'allergénicité des protéines alimentaires, *Science Direct* **43** :13-20.
- **Sauveur. B. (1988).** Structure, composition et valeur nutritionnelle de l'œuf. In *Reproduction des volailles et production d'œuf*. Edition : INRA. ISBN : 2853409619. 347-436.
- **Scher. J. (2006).** Rhéologie, texture et texturation des produits alimentaires. *Technique de l'ingénieur*. F 3300v2 .1-16.
- **Shahidi. I, Bhanger. M.I. (2006).** Effect of Season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves growing in Pakistan. *Journal of Food Composition and Analysis*. **19**:544-551.
- **Simon. C. (2003).** Structure et dynamique de protéines de la salive humaine en interaction avec les tannins du vin de Bordeaux .Thèse de doctorat.
- **Siret. C. (2009).** Les composants chimiques des produits alimentaires. *Technique de l'ingénieur*. F.1010.
- **Smith. A.H, Zoetendal .E, Mackie .R.I. (2005).** Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology*, **50**:197-205.
- **Sundar Ghosh .K, Ketan Sahoo .B, Dasgupta .S. (2008).** Spectrophotometric studies on the interaction between (-)-epigallocatechin gallate and lysozyme. *Chemical Physics Letters*. Article in press.
- **Thapon .J.L, Bourgeois. J.C. (1994).** L'œuf et les ovoproduits .In : collection science et techniques agroalimentaires. Edition : technique et documentation, Lavoisier. ISBN : 2852069032. 1-344.
- **Tiziani .S, Schwartz. S.J, Vodovotz .Y. (2008).** Intermolecular interactions in phytochemical model systems studied by NMR diffusion measurements. *Food Chemistry*, **107**: 962-969.
- **Van der Plancken. I, Van Loey. A, Hendrickx. M.E. ( 2006).** Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study. *Journal of Food Engineering*. **75**: 316-326.
- **Van der Plancken. I, Van Loey. A, Hendrickx. M.E. ( 2005).** Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins. *Innovate Food Science and Ennerging Technologie*. **6**: 11-20.
- **Vázquez .G, González-Alvarez .J, Santos .J, Freire. M.S, Antorrena .G.(2009).** Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *industrial crops and products* , **29** :364-370.

- **Verge. S, Richard .T, Moreau .S, Nurich . A, Merillon .J-M, Vercauteren . J, Monti.J-P. (2002).** First observation of solution structures of bradykinin–penta-O-galloyl-d-glucopyranose complexes as determined by NMR and simulated annealing. *Biochimica et Biophysica Acta* ,**1571** : 89– 101.
- **Walker. G.M. (2002).** The Protein Protocols Handbook (second edition). SDS Polyacrylmide Gel Electrophoresis of proteins. University of Hertfordshire, Hatfield, UK. 1-1103.
- **Wang.w. (2005).** Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International Journal of Pharmaceutics* , **289** : 1-30.
- **Weil. J-H. (2001).**Biochimie générale. Dunod, Paris. ISBN : 2100055739. 1-34.
- **Yamasaki. M, Takahashi. N, Hirose. M. (2003).** Crystal Structure of S-ovalbumin as a Non-loop-inserted Thermostabilized Serpin Form. *The journal of molecular biology*, **278**: 35524-35530.
- **Yan .Q, Bennick . A. (1995).**Identification of histatins as tannins –binding proteins in human saliva .*Biochemical Journal*, **311**: 341-347.
- **Yon .J. (1969).**Structure et dynamique conformationnelle des protéines .Editions : Herman, Paris. 1-313.
- **Zimmer .N, Cordesse . R. (1996).** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants.*INRA Prod.Anim*, **9(3)** :167-179.

# *Annexes*

## *Annexe N° 1*

### ❖ **Méthode de Bradford**

#### ➤ **Principe**

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode colorimétrique de Bradford. Le réactif de Bradford contient du chromophore (le bleu de coomassie G-250) qui existe sous deux formes selon son état d'ionisation, la forme libre du chromophore est cationique de couleur rouge et verte et absorbe un maximum à 465-470 nm. La forme liée du chromophore est anionique de couleur bleu et absorbe à 595 nm. En milieu acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un changement de couleur du rouge au bleu. Le bleu de coomassie réagit avec les protéines en se complexant aux résidus arginine et aux résidus lysine. La variation d'absorbance à 595nm indique la quantité de chromophore complexé qui est proportionnel à la concentration en protéines dans l'échantillon (Walker, 2002).

C'est une méthode rapide car la fixation est complète après 5 minutes et l'absorbance du complexe colorant-protéine est relativement stable, elle est encore plus sensible que celle de Lowry (0,2 — 20 ug de protéines) (Gueye, 2007).

#### **Coloration Bradford pour dosage des protéines :**

##### **1- Préparation du réactif bleu de Coomassie G250**

- Dissoudre 100 mg de G250 dans 50 ml d'éthanol 95% ;
- Mixer la solution avec 100 ml d'acide phosphorique 85% ;
- Ajuster à 1L avec de l'eau distillée ;
- Filtrer à l'aide de papier Whatman n°1 ;

La solution est conservable plusieurs semaines à l'abri de la lumière et à température ambiante (Walker, 2002).

##### **2- Préparation de la courbe d'étalonnage avec la BSA :**

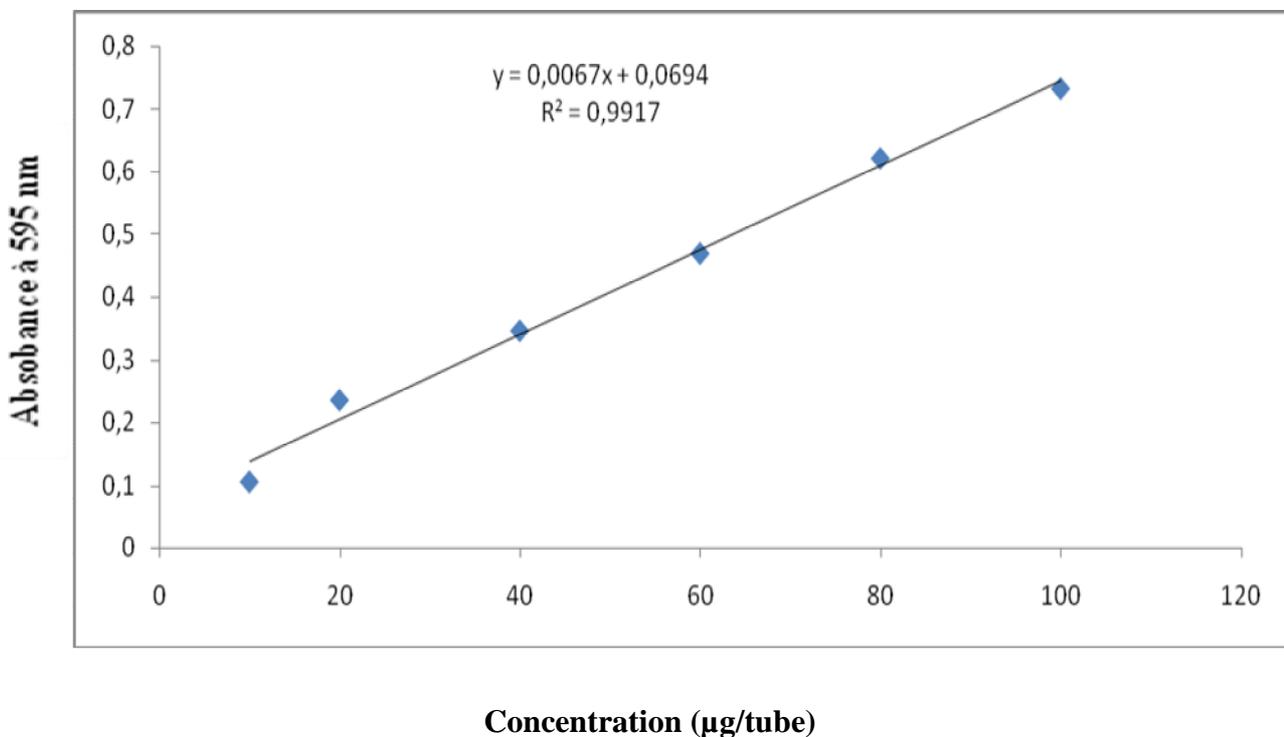
La solution mère de la protéine de référence (BSA à 1mg/ml)

- Répartir dans des tubes à essai : 10µl ,20 µl ,40 µl ,60 µl, 80 µl, 100 µl de la solution mère .Préparer trois tubes par dilution ;
- Ajuster à 100 µl avec de l'eau distillée +3tubes contenant 100 µl d'eau distillée (blanc) ;

- Ajouter 5ml du réactif dans chaque tube +agitation légère au vortex en évitant de mousser la solution ;
- Après 2 min à 1 heure de contact, mesurer l'absorbance  $A_{595}$  (Walker, 2002).

### 3- Dosage

On ajoute 100  $\mu$ l de l'échantillon à 5 ml du réactif de Bradford et on mélange bien avec le vortex. On laisse incuber entre 2 min à 1 heure à l'obscurité puis on mesure l'absorbance à 595 nm. Les concentrations des protéines sont déterminées en référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec la BSA dans les mêmes conditions réactionnelles.



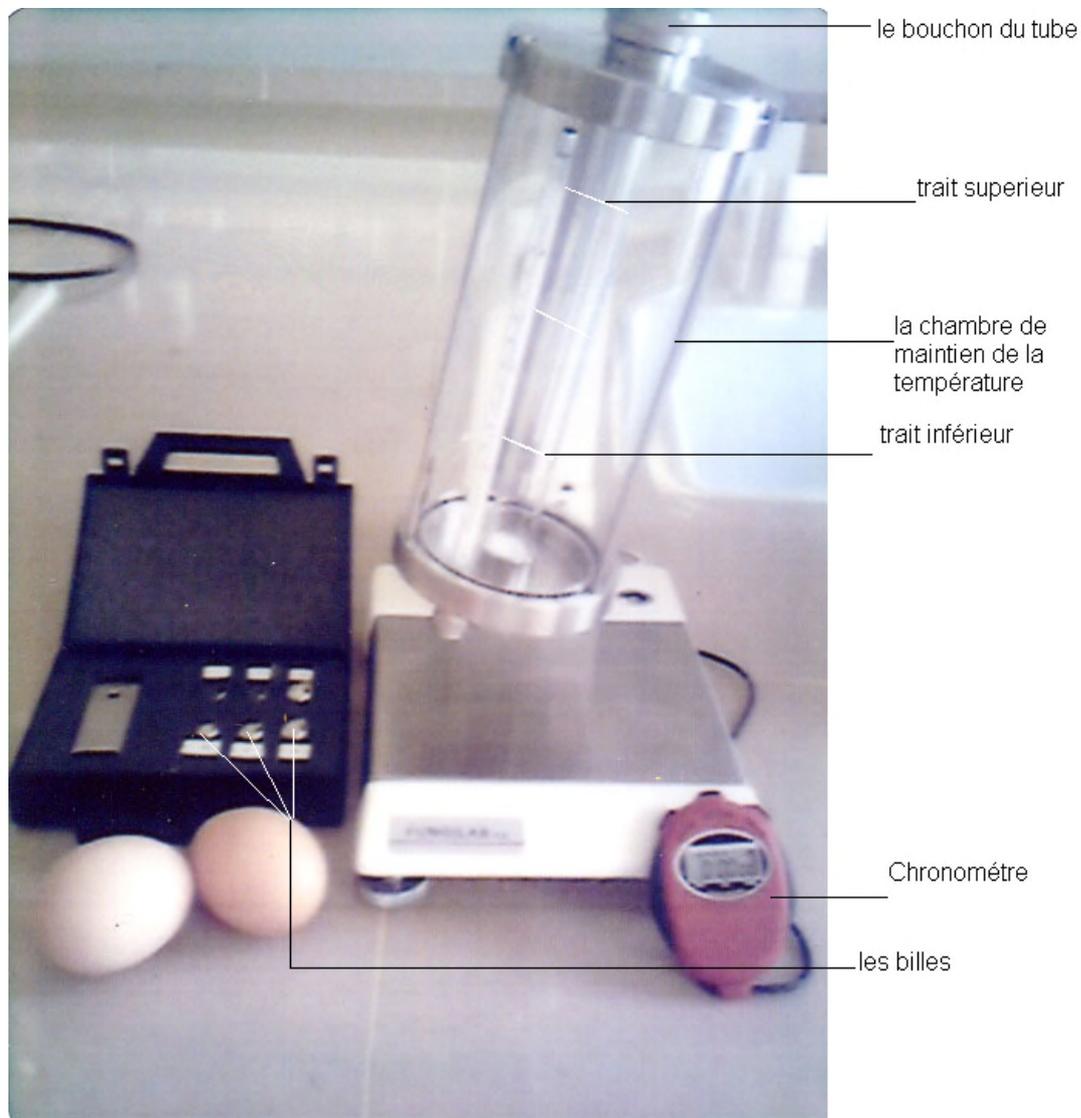
**Figure N°1 :** Courbe étalon avec la BSA pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford.

## Annexe N°2

### Le viscosimètre FANGILAB. SA

Ce viscosimètre contient 6 billes de caractéristiques différentes (Tableau I), qui servent à mesurer le temps de chute de la bille dans le tube rempli de liquide visqueux. Le tube de viscosimètre a un diamètre de  $15,94 \pm 0,01\text{mm}$ , incliné d'un angle de  $10^\circ$  et enchâssé dans une chambre qui contient un thermomètre. On peut fixer la température de  $-20$  jusqu'à  $120^\circ\text{C}$  dans la chambre en utilisant de l'eau.

Le viscosimètre utilisé est de type FANGILAB .SA présenté dans la figure ci-dessous :



**Figure N°1 :** Le viscosimètre FANGILAB SA utilisé pour déterminer la viscosité des échantillons du blanc d'œuf.

**Tableau I** : les différentes caractéristiques des billes de viscosimètre.

Référence	N° de la bille	Densité en g/cm <sup>3</sup>	Diamètre en mm	La constante K en mPa.cm <sup>3</sup> /g.S	L'intervalle de viscosité
V91101	1	2,2	15,81	0,007	0,6...10
V91102	2	2,2	15,6	0,09	7...130
V91103	3	8,1	15,6	0,09	30...700
V91104	4	8,1	15,2	0,7	200...4800
V91105	5	7,7-8,1	14,0	4,5	800...10000
V91106	6	7,7-8,1	11,0	33	6000...75000

Nous avons utilisé la bille N°2 pour la mesure de la viscosité des échantillons du blanc d'œuf, dont la constante est déjà donnée en tableau I.

## *Annexe N° 3*

### ❖ Solutions utilisées pour la NATIVE-PAGE

1. Solution stock à 7,5 % d'acrylamide: 30 g acrylamide, 0,8 g bis-acrylamide. Compléter jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée et filtrer. Conservation à 4°C.
2. Tampon du gel de séparation: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.
3. Tampon du gel de concentration : Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8.
4. Persulfate d'ammonium (10%).
5. N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED).
6. Tampon de l'échantillon (5x) en mélangeant :
  - ✓ 15,5 ml de Tris-HCl, 1 M, pH 6,8;
  - ✓ 2.5 ml d'une solution de bleu du bromophenol (1%);
  - ✓ 7 ml d'eau; et 25 ml de glycérol.

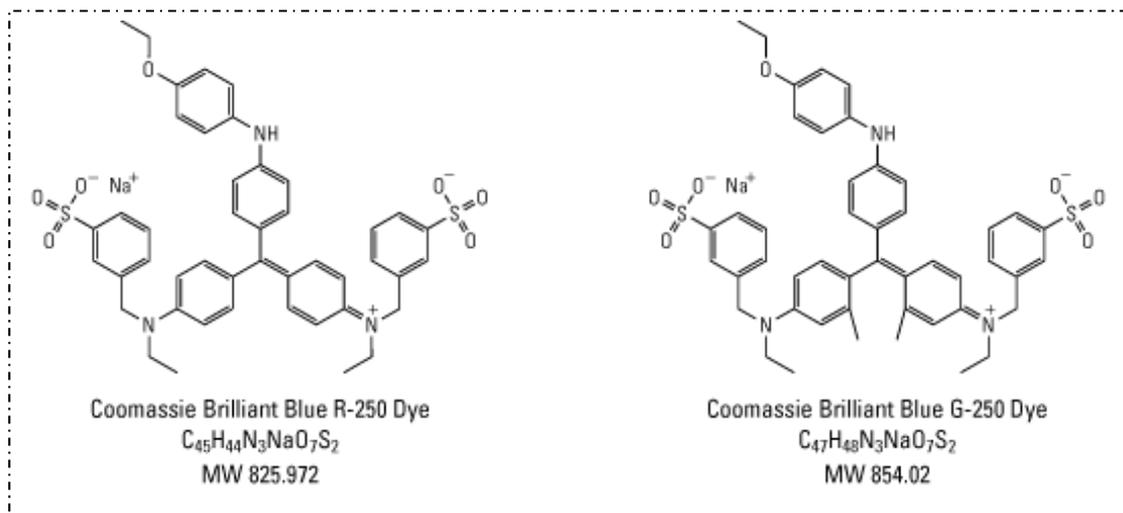
Les échantillons solides peuvent être dissous directement dans le tampon de l'échantillon 1x, alors que les échantillons déjà en solution devraient être dilués avec le tampon de l'échantillon 5x pour donner une solution à 1x.

7. Tampon d'électrophorèse : dissoudre 3 g de la base Tris et 14,4 g de la glycine dans l'eau et ajuster le volume à 1 L. Le pH devrait être 8,3.
8. Solution de coloration des protéines: mélanger 0,25 g de bleu de Coomassie (R-250), 125 ml de méthanol, 25 ml d'acide acétique glacial et 100 ml d'eau distillée. Dissoudre le colorant dans du méthanol en premier, puis ajouter l'acide et l'eau.
9. Solution de décoloration des protéines: mélanger 100 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique glacial et 800 ml d'eau distillée. Laisser les gels dans cette solution sous agitation continue jusqu'à apparition de bandes protéiques.

### ❖ Solutions utilisées pour la SDS-PAGE

1. Solution stock à (7,5 %) d'acrylamide composée de 30% acrylamide, 0,8% bis-acrylamide. Filtrez à travers du papier Whatman N° 1 et conserver à 4°C.
2. Tampons:  
Tris-HCl 1,875 M, pH 8,8.  
Tris-HCl 0,6 M, pH 6,8.

3. persulfate d'ammonium (10%).
4. SDS (10%).
5. TEMED.
6. Tampon d'électrophorèse: Tris (12 g), glycine (57,6 g), et SDS (2,0 g) ont été mélangés puis on complète jusqu'à 2 L avec de l'eau distillée.
7. Tampon de l'échantillon : 5 ml de Tris-HCl (0,6 M, pH 6,8), 0,5 g d' SDS, 5 g du Saccharose, 0,25 ml de  $\beta$  - Mercaptoethanol, et 5 ml de bleu de Bromophenol (0,5%) ont été mélangés puis le volume est ajusté à 50 ml avec l'eau distillée.
8. Coloration des protéines: 0,1% bleu Coomassie (R-250) dans 50% de méthanol, 10% acide acétique glacial. Dissoudre en premier le colorant dans le méthanol et l'eau distillée, puis ajouter l'acide acétique glacial.
9. Décoloration des protéines: 10% méthanol, 7% acide acétique glacial.



**Figure N° 1** : Différences structurales entre bleu de coomassie R-250 et G-250 (Walker, 2002).

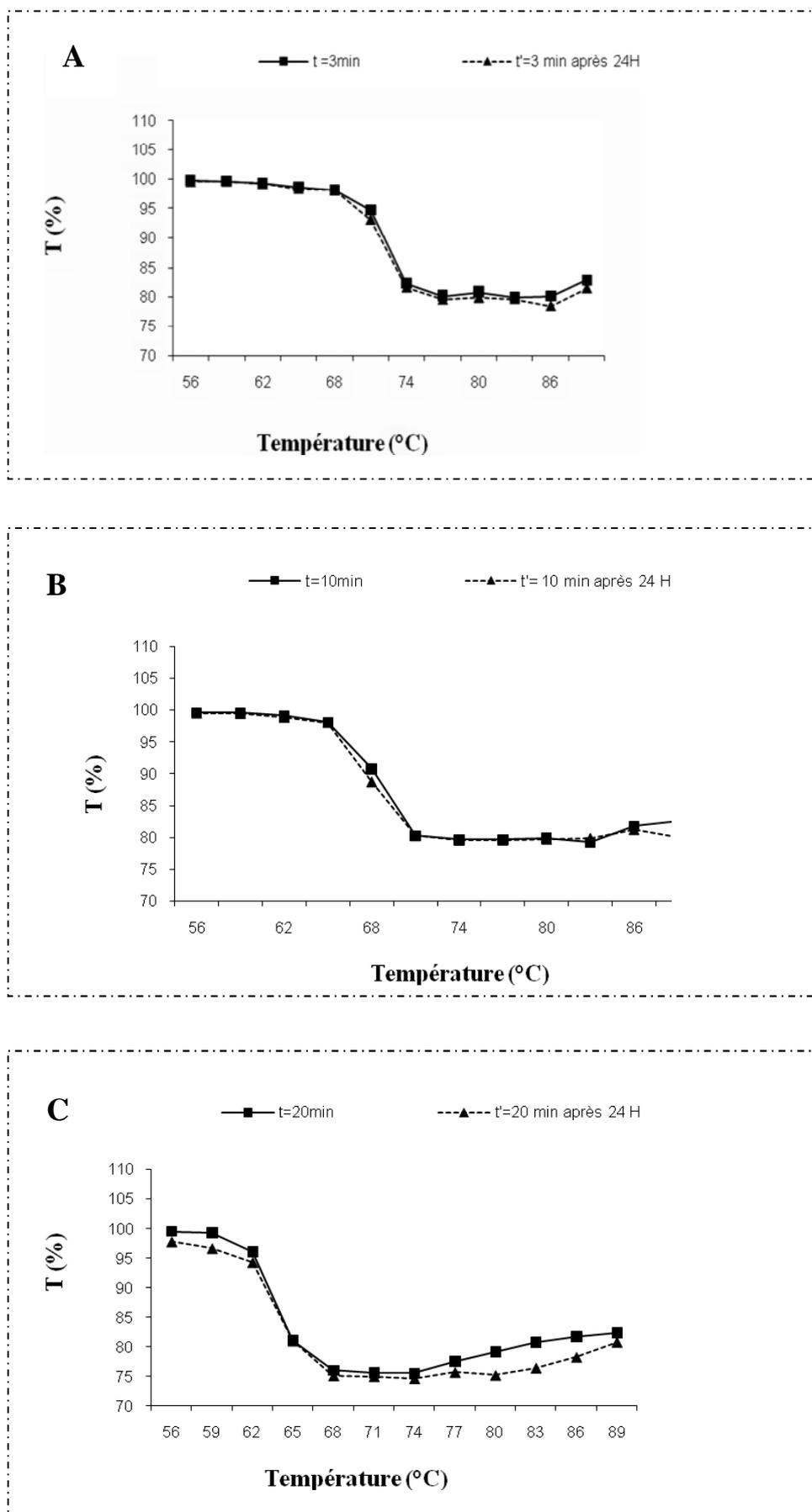
*Annexe N° 4*

**Tableau I** : Résultats du % de transmittance mesurée immédiatement après traitement thermique.

<b>T (°C)</b>	<b>3min</b>	<b>10min</b>	<b>20min</b>
<b>56</b>	99,83 ± 0,03	99,59 ± 0,31	99,43 ± 0,19
<b>59</b>	99,71 ± 0,08	99,54 ± 0,09	99,25 ± 0,13
<b>62</b>	99,38 ± 0,09	99,09 ± 0,15	96,04 ± 0,13
<b>65</b>	98,68 ± 0,1	98,13 ± 0,4	81,15 ± 0,2
<b>68</b>	98,15 ± 0,1	90,76 ± 0,58	76,07 ± 0,12
<b>71</b>	94,79 ± 0,05	80,18 ± 0,67	75,7 ± 0,33
<b>74</b>	82,33 ± 0,04	79,6 ± 0,52	75,66 ± 0,12
<b>77</b>	80,2 ± 0,04	79,62 ± 0,2	75,64 ± 0,09
<b>80</b>	80,83 ± 0,04	79,82 ± 0,31	75,76 ± 0,06
<b>83</b>	79,97 ± 0,09	79,16 ± 0,27	75,79 ± 0,09
<b>86</b>	80,11 ± 0,21	80,7 ± 0,19	80,75 ± 0,12
<b>89</b>	81,85 ± 0,2	81,42 ± 0,62	81,39 ± 0,05

**Tableau II:** Résultats du % de transmittance mesurée après 24 heures de conservation à 4°C du traitement thermique.

<b>T (°C)</b>	<b>3min</b>	<b>10min</b>	<b>20min</b>
<b>56</b>	99,65 ± 0,08	99,54 ± 0,07	97,76 ± 0,1
<b>59</b>	99,67 ± 0,1	99,49 ± 0,11	96,62 ± 0,2
<b>62</b>	99,26 ± 0,07	98,87 ± 0,16	94,27 ± 0,09
<b>65</b>	98,39 ± 0,14	98,07 ± 0,25	81 ± 0,03
<b>68</b>	98,25 ± 0,09	88,73 ± 0,1	75,11 ± 0,33
<b>71</b>	93,15 ± 0,19	80,25 ± 0,09	74,98 ± 0,12
<b>74</b>	81,59 ± 0,13	79,53 ± 0,06	74,61 ± 0,19
<b>77</b>	79,56 ± 0,12	79,58 ± 0,18	75,68 ± 0,04
<b>80</b>	79,87 ± 0,58	79,75 ± 0,07	75,41 ± 0,09
<b>83</b>	79,7 ± 0,07	79,87 ± 0,06	75,19 ± 0,04
<b>86</b>	80,47 ± 0,14	81,24 ± 0,13	80,10 ± 0,23
<b>89</b>	81,47 ± 0,1	81,76 ± 0,02	80,72 ± ,09



**Figure N°1** : Courbes de comparaison entre la transmittance d'albumen traité, mesurée immédiatement et celle réalisée après 24 heures de stockage à 4 C°. **A** : traitement / 3 min, **B** : traitement / 10 min, **C** : traitement / 20 min.

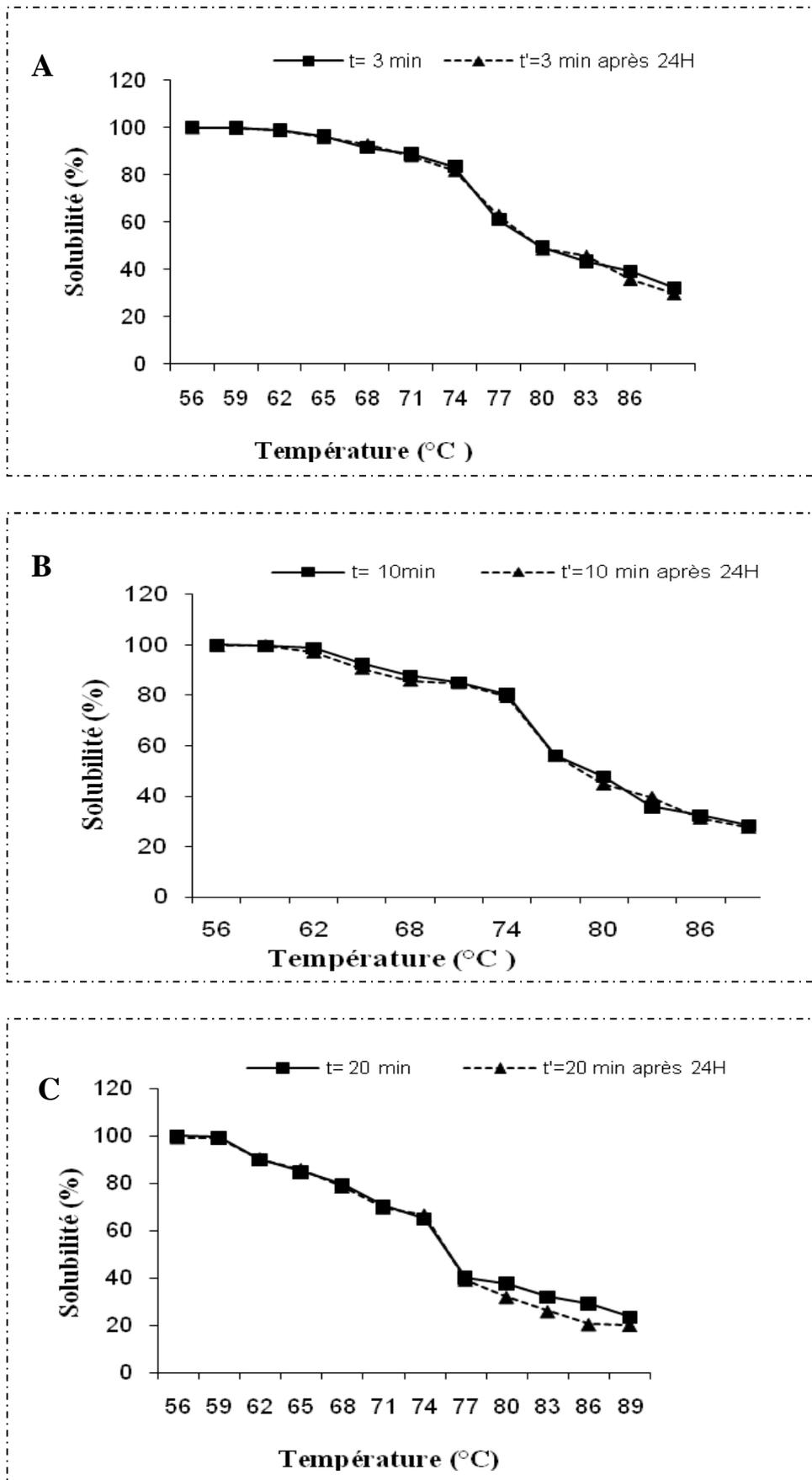
*Annexe N° 5*

**Tableau I :** Résultats du % de la solubilité mesuré immédiatement après traitement thermique.

<b>T (°C)</b>	<b>3 min</b>	<b>10min</b>	<b>20 min</b>
<b>56</b>	99,98 ± 0,5	99,95 ± 0,14	99,83 ± 0,1
<b>59</b>	99,79 ± 0,62	99,71 ± 0,33	99,24 ± 0,18
<b>62</b>	98,85 ± 0,25	98,77 ± 0,34	89,98 ± 0,57
<b>65</b>	96,66 ± 0,49	92,52 ± 0,45	84,71 ± 0,72
<b>68</b>	91,58 ± 0,34	87,64 ± 0,4	79,51 ± 0,46
<b>71</b>	88,77 ± 0,34	85,02 ± 0,22	70,17 ± 0,14
<b>74</b>	83,65 ± 0,35	80,45 ± 0,17	65,02 ± 0,34
<b>77</b>	61,11 ± 0,38	56,3 ± 0,24	40,05 ± 0,21
<b>80</b>	49,66 ± 0,2	47,86 ± 0,66	37,63 ± 0,31
<b>83</b>	43,64 ± 0,55	35,87 ± 0,27	31,92 ± 0,84
<b>86</b>	39,31 ± 0,54	32,55 ± 0,2	9,15 ± 0,82
<b>89</b>	32,43 ± 0,27	28,64 ± 0,4	23,44 ± 0,21

**Tableau II** : Résultats du % de la solubilité mesuré après 24 heures de conservation à 4°C du traitement thermique.

<b>T (°C)</b>	<b>3 min</b>	<b>10min</b>	<b>20 min</b>
<b>56</b>	99,87 ± 0,33	99,54 ± 0,21	99,22 ± 0,25
<b>59</b>	99,67 ± 0,14	99,71 ± 0,23	99,18 ± 0,41
<b>62</b>	98,65 ± 0,74	97,01 ± 0,18	90,27 ± 0,55
<b>65</b>	95,83 ± 0,33	90,53 ± 0,33	85,75 ± 0,38
<b>68</b>	92,61 ± 0,36	85,84 ± 0,44	78,5 ± 0,21
<b>71</b>	88,04 ± 0,18	84,86 ± 0,44	69,65 ± 0,23
<b>74</b>	81,76 ± 0,15	79,37 ± 0,1	66,55 ± 0,59
<b>77</b>	62,76 ± 0,23	56,11 ± 0,11	39,07 ± 0,19
<b>80</b>	48,61 ± 0,43	44,86 ± 0,32	31,77 ± 0,25
<b>83</b>	45,55 ± 0,14	39,72 ± 0,18	25,77 ± 0,21
<b>86</b>	35,76 ± 0,11	31,4 ± 0,21	20,31 ± 0,37
<b>89</b>	29,65 ± 0,18	27,69 ± 0,25	19,94 ± 0,29



**Figure N°1** : Courbes de comparaison entre la solubilité des protéines d'albumen traité, mesurée immédiatement et celle réalisée après 24 heures de stockage à 4 °C.

**A** : traitement /3 min, **B** : traitement /10 min, **C** : traitement /20 min.

*Annexe N° 6*

**Tableau I** : Résultats de la mesure de la masse des échantillons du blanc d'œuf en gramme (g).

<b>T (°C)</b>	<b>3 min</b>	<b>10 min</b>	<b>20 min</b>
<b>56</b>	28,638 ± 0,002	28,655 ± 0,005	28,657 ± 0,001
<b>59</b>	28,666 ± 0,002	28,681 ± 0,001	28,698 ± 0,003
<b>62</b>	28,693 ± 0,003	28,701 ± 0,002	28,743 ± 0,003
<b>65</b>	28,709 ± 0,004	28,737 ± 0,003	28,751 ± 0,002
<b>68</b>	28,712 ± 0,003	28,741 ± 0,003	28,78 ± 0,002
<b>71</b>	28,743 ± 0,003	28,776 ± 0,002	28,79 ± 0,001
<b>74</b>	28,776 ± 0,005	28,789 ± 0,001	28,804 ± 0,002
<b>77</b>	28,78 ± 0,004	28,791 ± 0,001	28,829 ± 0,001
<b>80</b>	28,805 ± 0,004	28,816 ± 0,002	28,835 ± 0,003
<b>83</b>	28,869 ± 0,003	28,889 ± 0,001	28,914 ± 0,002
<b>86</b>	28,839 ± 0,004	28,855 ± 0,001	28,866 ± 0,002
<b>89</b>	28,808 ± 0,003	28,813 ± 0,003	28,833 ± 0,003

**Tableau II** : Résultats de la mesure de densité en utilisant un pycnomètre de 10 ml (g/ml).

<b>T (°C)</b>	<b>3 min</b>	<b>10 min</b>	<b>20 min</b>
<b>56</b>	0,09998 ± 0,0002	0,10015 ± 0,0005	0,10017 ± 0,0001
<b>59</b>	0,10027 ± 0,0002	0,10042 ± 0,0001	0,1006 ± 0,0003
<b>62</b>	0,10055 ± 0,0003	0,10063 ± 0,0002	0,10106 ± 0,0003
<b>65</b>	0,10071 ± 0,0004	0,101 ± 0,0003	0,10114 ± 0,0002
<b>68</b>	0,10071 ± 0,0003	0,10104 ± 0,0003	0,10143 ± 0,0002
<b>71</b>	0,10073 ± 0,0003	0,1014 ± 0,0002	0,10154 ± 0,0001
<b>74</b>	0,1014 ± 0,0005	0,10155 ± 0,0001	0,10168 ± 0,0002
<b>77</b>	0,10144 ± 0,0004	0,10155 ± 0,0001	0,10194 ± 0,0001
<b>80</b>	0,10169 ± 0,0004	0,10181 ± 0,0002	0,102 ± 0,0003
<b>83</b>	0,10235 ± 0,0003	0,10256 ± 0,0001	0,10281 ± 0,0002
<b>86</b>	0,10204 ± 0,0004	0,10221 ± 0,0001	0,10232 ± 0,0002
<b>89</b>	0,10172 ± 0,0003	0,10178 ± 0,0003	0,10198 ± 0,0003

- La densité du blanc d'œuf non traité = (0,1004 ± 0,08) g/ml.

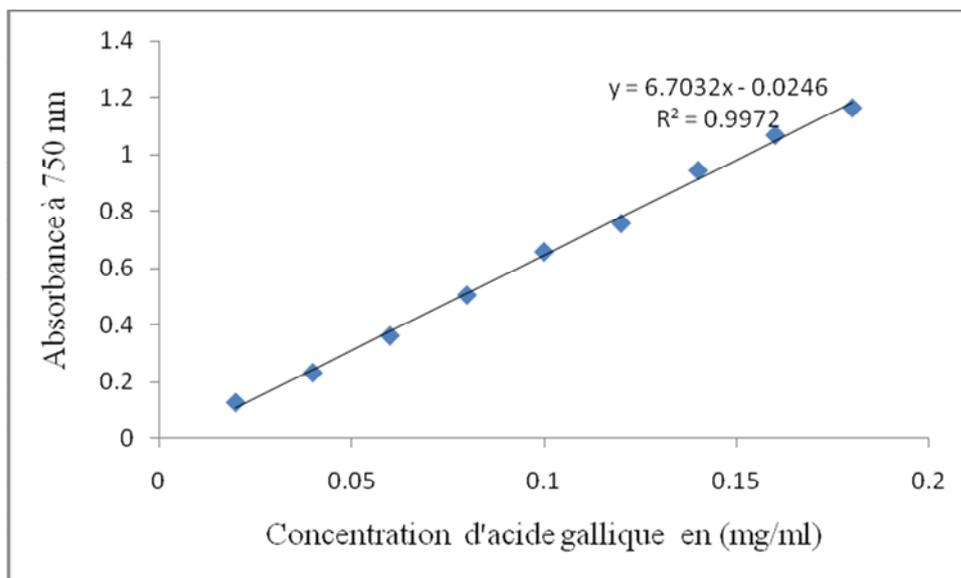
*Annexe N° 7*

**Tableau I** : Résultats de la viscosité en mPI des échantillons du blanc d'œuf traités à différents barèmes.

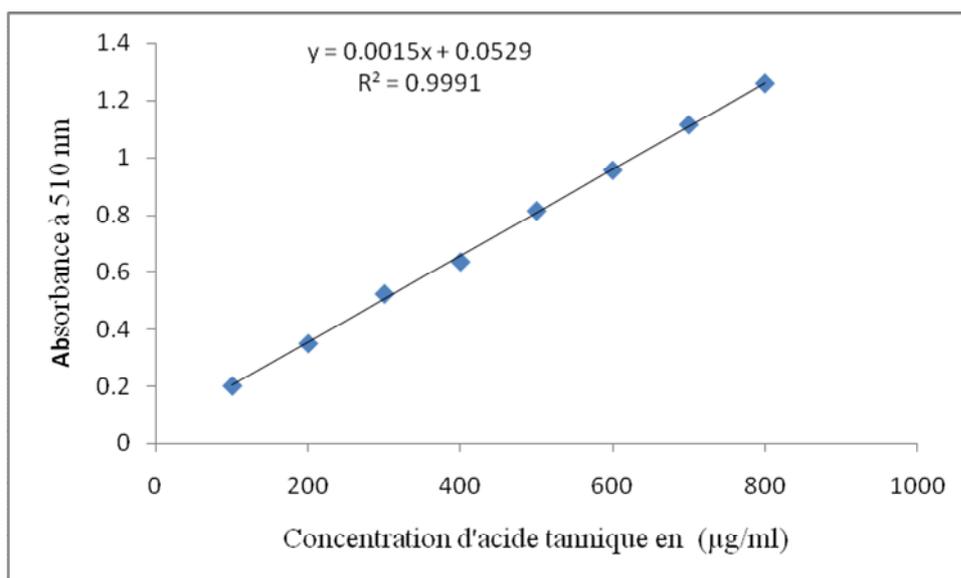
<b>T (°C)</b>	<b>3 min</b>	<b>10 min</b>	<b>20 min</b>
<b>56</b>	7,182 ± 0,11	7,748 ± 0,11	7,937 ± 0,11
<b>59</b>	7,748 ± 0,11	7,936 ± 0,28	8,125 ± 0,29
<b>62</b>	8,125 ± 0,11	8,251 ± 0,12	8,375 ± 0,06
<b>65</b>	8,502 ± 0,11	8,690 ± 0,28	8,878 ± 0,11
<b>68</b>	8,691 ± 0,19	8,879 ± 0,28	9,066 ± 0,11
<b>71</b>	8,942 ± 0,27	9,066 ± 0,11	9,254 ± 0,11
<b>74</b>	9,067 ± 0,32	9,254 ± 0,11	9,379 ± 0,22
<b>77</b>	8,067 ± 0,28	8,121 ± 0,28	8,308 ± 0,11
<b>80</b>	7,995 ± 0,07	7,931 ± 0,11	8,119 ± 0,11
<b>83</b>	7,930 ± 0,09	7,865 ± 0,12	7,927 ± 0,28
<b>86</b>	7,175 ± 0,19	7,363 ± 0,11	7,552 ± 0,11
<b>89</b>	7,365 ± 0,1	7,554 ± 0,11	7,742 ± 0,21

## Annexe N° 8

- ❖ Courbes d'étalonnages utilisées pour le dosage des polyphénols totaux et tannins.



**Figure N° 1** : Courbe étalon pour le dosage des polyphénols totaux.



**Figure N° 2** : Courbe étalon pour le dosage des tannins totaux.

**Annexe N° 9**

**Tableau I :** Résultats du % de la transmittance des mélanges extraits de *Eucalyptus globulus* et protéines du blanc d'œuf.

<b>T (°C)</b>	<b>Ecorce-PRT</b>	<b>Fruit-PRT</b>	<b>Feuilles-PRT</b>
<b>56</b>	65,00 ± 0,51	80,76 ± 0,16	88,2 ± 0,40
<b>59</b>	65,37 ± 0,49	80,43 ± 0,27	88,09 ± 0,34
<b>62</b>	65,93 ± 0,06	81,60 ± 0,59	88,71 ± 0,07
<b>65</b>	64,64 ± 0,60	81,27 ± 0,32	87,53 ± 0,83
<b>68</b>	66,90 ± 0,48	78,87 ± 0,51	88,36 ± 0,43
<b>71</b>	66,65 ± 0,39	80,36 ± 0,01	88,78 ± 0,11
<b>74</b>	65,76 ± 0,22	79,43 ± 0,10	88,08 ± 0,29
<b>77</b>	64,60 ± 0,77	79,54 ± 0,43	85,50 ± 0,29
<b>80</b>	65,51 ± 0,07	68,81 ± 0,08	85,69 ± 0,82
<b>83</b>	65,91 ± 0,11	71,92 ± 0,58	87,00 ± 0,14
<b>86</b>	53,28 ± 0,37	72,91 ± 0,09	86,83 ± 0,14
<b>89</b>	55,49 ± 0,14	65,12 ± 0,52	84,71 ± 0,36

*Annexe N° 10*

**Tableau I** : Résultats du % de la solubilité des mélanges extraits de *Eucalyptus globulus* et protéines du blanc d'œuf.

<b>T (°C)</b>	<b>Ecorce-PRT</b>	<b>Fruit-PRT</b>	<b>Feuilles-PRT</b>
<b>56</b>	96 ,16 ± 0,1	103,19 ± 0,20	104,71 ± 0,21
<b>59</b>	95,45 ± 0,18	98,93 ± 0,07	100,95 ± 0,08
<b>62</b>	93,03 ± 0,55	96,00 ± 0 ,10	99,01 ± 0,12
<b>65</b>	86,90 ± 0,98	95,41 ± 0,14	98,43 ± 0,79
<b>68</b>	84,63 ± 0,14	94,55 ± 0,51	97,09 ± 0,16
<b>71</b>	83,11 ± 0,65	94,48 ± 0,45	96,59 ± 0,51
<b>74</b>	79,28 ± 0,21	86,74 ± 0,28	94,36 ± 0,65
<b>77</b>	79,00 ± 0,86	84,51 ± 0,27	93,62 ± 0,33
<b>80</b>	78,85 ± 0 ,72	81,74 ± 0,22	90,92 ± 0,23
<b>83</b>	73,42 ± 0,31	79,20 ± 0,21	89,16 ± 0,22
<b>86</b>	72,24 ± 0,20	75,21± 0,14	82,28 ± 0,37
<b>89</b>	71,15 ± 0,24	73,18 ± 0,26	80,33 ± 0,10

## Annexe N° 11

**Tableau I:** Les 20 acides aminés protéinogènes (McMurry et Simanek, 2007).

aliphatiques					Contenant du soufre	
Glycine (Gly, G)	Alanine (Ala, A)	Valine (Val, V)	Leucine (Leu, L)	Isoleucine (Ile, I)	Cystéine (Cys, C)	Méthionine (Met, M)
aromatiques			iminoacide	neutre		
Phénylalanine (Phe, F)	Tyrosine (Tyr, Y)	Tryptophane (Try, W)	Proline (Pro, P)	Sérine (Ser, S)	Thréonine (Thr, T)	
neutres		acides		basiques		
Asparagine (Asn, N)	Glutamine (Gln, Q)	Aspartate (Asp, D)	Glutamate (Glu, E)	Histidine (His, H)	Lysine (Lys, K)	Arginine (Arg, R)

## Résumé

Les traitements thermiques appliqués au blanc d'œuf causent des modifications indésirables de leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles. Le but de ce projet était d'acquérir des connaissances sur l'effet de la chaleur sur certaines propriétés physico-chimiques de l'albumen en appliquant différents barèmes (température /temps). Les résultats montrent : une évolution sigmoïdale de la transmittance, une perte irréversible de la solubilité, une augmentation de la densité de 56°C à 83°C puis une diminution jusqu'à 89°C et une augmentation de la viscosité de 56°C à 74°C puis une diminution jusqu'à 89°C. La Native-PAGE des protéines de l'albumen montre l'apparition de plusieurs bandes, ce qui dénote une diversité des protéines du blanc d'œuf. La comparaison de ces profils traités à différentes températures durant 20 min avec ceux non traités, montre l'apparition de nouvelles bandes et des mobilités relatives différentes due à la formation des agrégats protéiques, une coagulation et/ou de la précipitation aux environs de 74°C/20 min a été observée. Ces agrégats comportent des ponts disulfures, ces derniers ont été démontrés par SDS-PAGE sous des conditions non réductrices (absence de  $\beta$ -mercaptoéthanol) et réductrices (présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol).

La mise en contact des extraits de *Eucalyptus globulus* (fruits, feuilles et écorce) à 1mg/ml avec la solution d'albumen avant de subir un traitement thermique pendant 20 min, conduit à l'apparition d'un trouble issu de la formation des complexes polyphénols-protéines liés par des interactions hydrophobes, par conséquent une prolongation de la phase de dénaturation des protéines au profit de la phase d'agrégation a été constatée, une perte de solubilité est moins importante comparée aux résultats obtenus sans extrait de plante, ce qui augmente la stabilité de l'albumen vis-à-vis de la chaleur notamment avec l'extrait de feuilles. La Native-PAGE des mélanges polyphénols-albumen traités ont confirmé la formation de ces complexes, qui restent en haut de gel. Une complexation totale des polyphénols de l'extrait d'écorce avec l'ovotransferrine à 56°C a été constatée, alors que cela ne se produit avec l'ovalbumine qu'à partir de 83°C. La Native-Page des protéines purifiées non traitées révèle, une forte affinité de l'ovotransferrine aux polyphénols d'écorce probablement via des interactions hydrophobes et une faible affinité de l'ovalbumine. Alors que l'ovalbumine dénaturée (température  $\geq$  83°C/20min) a plus d'affinité vis-à-vis de cet extrait.

**Mots clés :** Protéines, blanc d'œuf, dénaturation, polyphénols, interactions protéines-polyphénols.

## Abstract

The thermal treatments applied to the egg white cause undesirable modifications of their physico-chemical and functional properties. The goal of this project was to acquire some knowledge on the effect of the heat on some physico-chemical properties of the albumen while applying different scales (temperature /time). The results show: a sigmoidal evolution with negative slope of the transmittance, an irreversible loss of the solubility, an increase of the density of 56°C to 83°C then it decreases until 89°C, an increase of the viscosity of 56°C to 74°C then it decreases until 89°C. Native-Page of the proteins of the albumen shows the apparition of several bands what denotes a diversity of the proteins of the egg white. The comparison of these profiles dealt to different temperatures /20 min with those unprocessed, show the apparition of new bands and mobilities relative different due to the formation of the aggregates, coagulation and/or of the precipitation around 74°C/20 min has been observed. Do these aggregations include some bridges disulfides, have these last been demonstrated by SD-PAGE under non reducing and reducing conditions.

The setting in contact of the extracts of *Eucalyptus globulus* (fruits, leaves and peel) to 1mg/ml with the solution of albumen before undergoing a thermal treatment during 20 min, driven to the apparition of a trouble descended of the formation of the complex polyphénols-proteins bound by hydrophobic interactions, an overtime of the phase of denaturation of the proteins to the profit of the aggregation phase has been noted, a loss of solubility is less important compared to the results gotten without extract of plant, what increases the stability of the albumen opposite the heat. The Native-Page of the miscellanies polyphénols-albumen treaties confirmed the formation of these complexes that remains in top of gel. A total complexation of the polyphénols of the peel extract with the ovotransferrine to 56°C has been noted, whereas it doesn't occur with the ovalbumine that from 83°C. Done the Native-Page of the proteins purify non treated reveals, a strong affinity of the ovotransferrine to the polyphénols of peel by hydrophobic interactions and a weak affinity of the ovalbumine. Whereas the altered ovalbumine (temperature  $\geq$  83°C/20min) has more affinity opposite this extract.

**Key words:** Proteins, egg white, denaturation, polyphénols, proteins-polyphénols interactions.

## المقدمة

العلاج الحراري المطبق على أح البيض يسبب تغيرات غير مرغوبة على الخصائص الفيزيوكيميائية والوظيفية، وكان الهدف من هذه الدراسة التعرف على تأثير الحرارة على بعض خصائصه باستخدام مقاييس مختلفة (درجة حرارة| زمن). النتائج تظهر تطور ( sigmoidal ) سلبى، وخسارة لا رجعية في خصبة الذوبان، زيادة الكثافة من 56 م° إلى 59 م°، ثم تنخفض إلى 89 م°، زيادة اللزوجة من 56 م° إلى 74 م°، ثم تنخفض إلى 89 م°. ( Native-page ) تظهر أشرطة عدة، ما يبين غنى أح البيض بالبروتينات. مقارنة ( les profils électrophorétiques ) المعالجة مع غير المعالجة حرارياً تبين ظهور أشرطة جديدة ذات تنقلات مختلفة، والتي تسببها تكون تجمعات بروتينية، تخثر أو ترسب في حدود 74 م°/20 د. هذه التجمعات تحوي على جسور ديسولفوروية والتي أظهرتها ( SDS-page ). دمج مستخلصات ( *Eucalyptus globulus* ) ( ثمار ، أوراق ، قشور ) مع محلول الأح قبل المعالجة الحرارية تظهر تعكر سببه تكون مركبات فينولات \_ بروتين بروابط غير محبة للماء، والنتيجة امتداد لمرحلة التخريب ( dénaturation ) على حساب مرحلة التجمع، خسارة في خصبة الذوبان أقل أهمية مقارنة مع التي لوحظت بدون هذه المستخلصات، ما يزيد من استقرارية الأح ضد الحرارة. هذه المركبات قد لوحظت ب ( Native-page ). اندماج تام بين الفينولات و مستخلصات القشرة مع ( l'ovotransferrine ) في حدود 56 م°، أما ( l'ovalbumine ) ففي حدود 83 م°.

( Native-page ) للبروتينات الصافية غير المعالجة، تبين انجذاب قوي بين ( l'ovotransferrine ) وفينولات القشرة، وانجذاب ضعيف مع ( l'ovalbumine )، ولكن هذا الأخير المخرب يظهر أكثر انجذابية مع هذه المستخلصات.

**كلمات المفاتيح :** بروتينات، أح البيض، تخرب البروتينات، انجذاب بروتينات \_ فينولات