



HAL
open science

Dosage de l'azote aminé libre (NH₂) par la méthode à l'OPA sur des digestats

Ilona Delanoue, Martine Morzel

► **To cite this version:**

Ilona Delanoue, Martine Morzel. Dosage de l'azote aminé libre (NH₂) par la méthode à l'OPA sur des digestats. Alimentation et Nutrition. 2024. hal-04513288

HAL Id: hal-04513288

<https://hal.inrae.fr/hal-04513288>

Submitted on 20 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Dosage de l'azote aminé libre (NH_2) par la méthode à l'OPA sur des digestats



Stage de deuxième année de BUT GB parcours BMB

Du : 22 janvier 2024 au : 15 mars 2024

Lieu de stage : UMR STLO, INRAE, Rennes

Nom du maître de stage : Mme Martine MORZEL

Nom du tuteur : M. Lionel ULMANN

Confidentiel : Non

Remerciements

En préambule de ce rapport, je souhaite exprimer mes sincères remerciements, à toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de mon stage.

Je souhaite tout d'abord remercier ma maîtresse de stage, Martine MORZEL, chargée de recherche, pour ses conseils et sa disponibilité tout au long de mon stage. Elle m'a accordée du temps pour me faire découvrir le laboratoire et m'expliquer les techniques que j'allais mettre en œuvre. Elle m'a également guidée dans la réflexion et la rédaction de mon rapport d'activité.

J'aimerais ensuite remercier Anaïs LAVOISIER, post-doctorante, qui m'a formée sur les techniques que j'ai appliquées au cours du stage. Cela a contribué à me faire gagner en assurance dans les manipulations.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Gwenaële HENRY, assistante ingénieure, qui m'a conseillée pour la rédaction de ce rapport.

Je remercie aussi Séverine CHEVALIER, assistante ingénieure, et Jordane OSSEMOND, ingénieur d'études, qui m'ont présenté leur travail et plusieurs techniques d'analyse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble de l'équipe enseignante de l'IUT qui m'a transmis les connaissances indispensables à la réalisation de mes missions de stage, et plus particulièrement à Lucile TIGER, responsable des stages de BUT2 et Lionel ULMANN, mon tuteur de stage, pour leur aide dans la recherche et le suivi de mon stage.

Plus largement, je tiens à remercier INRAE et toute l'équipe du STLO pour m'avoir permis de réaliser mon stage dans d'aussi bonnes conditions.

Liste des abréviations

BN : Bioactivité et Nutrition

DH : Degré d'hydrolyse

DiDGI : Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal

Dig : Digestion

DTT : Dithiothréitol

Fd : Facteur de dilution

INRAE : Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

INRA : Institut National de la Recherche Agronomique

IRSTEA : Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture

MicroBio : Microbiologie des filières Lait et Œuf

NERD-T : NEar Real Digestive Tract

OPA : O-phthaldialdéhyde

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

UMR STLO : Unité Mixte de Recherche – Sciences et Technologies du Lait et de l'Œuf

PS : Protéines sériques

PSF : Procédé, Structure, Fonctionnalité

WP : Work package(s)

Sommaire

I. Introduction.....	1
A. Présentation du laboratoire.....	1
B. Contexte du stage.....	1
1. Les protéines du lait.....	2
2. La digestion des aliments.....	3
3. Les approches et modèles d'étude de la digestion.....	3
C. Objectifs du stage.....	5
II. Activité.....	5
A. Principe du dosage.....	5
B. Matériel et méthodes.....	6
1. Matériel.....	6
2. Réactifs.....	6
3. Échantillons.....	6
C. Mise en œuvre technique.....	7
1. Préparation des réactifs.....	7
2. Préparation des échantillons.....	8
3. Réalisation du dosage.....	9
III. Résultats.....	9
A. Exploitation des résultats.....	9
B. Interprétation et conclusion.....	13
IV. Conclusion.....	15

Index des tableaux et figures

Figure 1 : Missions de l'équipe BN au sein du STLO.....	2
Figure 2 : Photographie du NERD-T.....	5
Figure 3 : Réaction de l'OPA et du β -mercaptoéthanol ou DTT.....	6
Tableau 1 : Gamme d'étalonnage de la méthionine pour le dosage par l'OPA.....	8
Tableau 2 : Densités optiques de la gamme d'étalonnage de la méthionine.....	9
Figure 4 : Courbes d'étalonnage de la méthionine pour le dosage par l'OPA.....	10
Tableau 3 : Résultats de l'analyse de digestions 6, 7, 8, 9, 10 et 11.....	12
Figure 5 : Évolution du degré d'hydrolyse au cours du temps.....	13

I. Introduction

A. Présentation du laboratoire

L'institut INRAE, ou Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement a été créé le 1^{er} janvier 2020, lors de la fusion entre l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et l'IRSTEA (Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture) (1).

Selon son décret fondateur (2), l'institut a pour missions « de réaliser, d'organiser et de coordonner, à son initiative ou à la demande de l'État, tous travaux de recherche scientifique et technologique dans les domaines de l'agriculture, de l'alimentation, de la forêt, de l'environnement, de l'eau, de la biodiversité, de la bioéconomie, de l'économie circulaire, de la gestion durable des territoires et des risques dans les champs de compétence précités. ».

Les thématiques de recherche d'INRAE sont : l'agroécologie, l'alimentation et la santé globale, la biodiversité, la bioéconomie, le changement climatique et ses risques, ainsi que les sociétés et les territoires. Il comporte 14 départements scientifiques répartis dans 18 centres régionaux, en métropole et dans les territoires d'outre-mer, ainsi qu'un siège réparti sur 2 sites en région parisienne. Au total, INRAE regroupe plus de 10 000 agents, répartis dans 268 unités de recherche, de service ou expérimentales (1).

Le stage a été effectué au sein de l'UMR STLO (Unité Mixte de Recherche - Science et Technologie du Lait et de l'Œuf), une unité de recherche d'INRAE, située au 85 rue de Saint-Brieuc à Rennes. Elle est composée de 78 permanents (dont 35 scientifiques) et accueille actuellement 13 doctorants. L'unité est formée de trois équipes de recherche faisant appel à plusieurs domaines comme la biochimie, la physico-chimie, les procédés, la bio-informatique et la microbiologie. Ces équipes sont : l'équipe PSF (Procédé, Structure, Fonctionnalité), l'équipe MicroBio (Microbiologie des filières Lait et Œuf), et l'équipe BN (Bioactivité et Nutrition).

L'objectif de l'UMR STLO est de produire des connaissances sur les constituants du lait et de l'œuf, ainsi que sur leurs transformations en ingrédients ou produits finis pour l'alimentation humaine (3).

B. Contexte du stage

Les deux mois de stage ont été effectués au sein de l'équipe BN (Bioactivité et Nutrition) qui s'intéresse aux mécanismes de la digestion des aliments grâce à une approche *in vitro*, par la

réalisation de digestions statiques et semi-dynamiques, par l'utilisation de modèles cellulaires de la paroi intestinale et de digesteurs dynamiques tels que le DiDGI (Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal) et le NERD-T (NEar Real Digestive Tract).

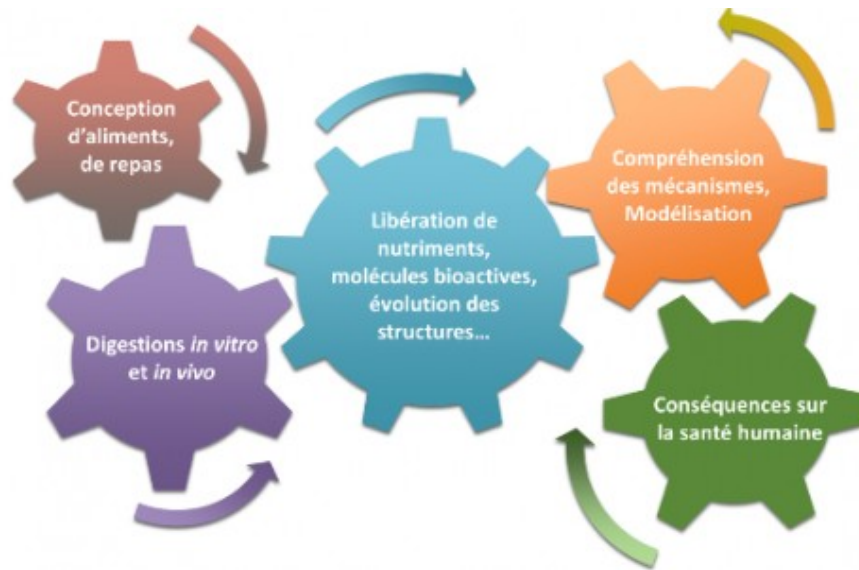


Figure 1 : Missions de l'équipe BN au sein du STLO

(Source : stlo.rennes.hub.inrae.fr (3))

L'équipe BN est composée d'un technicien de recherche, de deux assistantes ingénieures, de quatre ingénieurs, huit scientifiques, trois doctorants, deux post-doctorants et trois ingénieurs en CDD.

Lors de ce stage, les missions réalisées s'inscrivent dans le projet européen EAT4AGE, regroupant 6 pays. L'objectif de ce projet est de prévenir la dénutrition et d'éviter l'altération de la fonction musculaire en étudiant comment surmonter les changements liés à l'âge. EAT4AGE est découpé en plusieurs groupes de travail appelés work packages (WP) : la conception de produits adaptés à l'âge, l'expérience de consommation, la digestion et le métabolisme. INRAE est responsable du WP3 sur la digestion *in vitro* des produits développés (cf. Annexe 1) (4).

1. Les protéines du lait

Le lait est composé de deux fractions de protéines, qui se distinguent par leur solubilité à un pH de 4,6.

Les caséines sont des protéines synthétisées par la glande mammaire. Elles sont insolubles à un pH de 4,6. Il en existe quatre types (α_{s1} , α_{s2} , β et κ), qui représentent 80 % des protéines du lait de vache.

Les protéines du lactosérum ou protéines sériques, sont solubles à pH 4,6 et représentent 20 % de la composition du lait. Cette fraction contient des protéines synthétisées par la cellule mammaire, les principales étant la β -lactoglobuline (50 % des PS) et l' α -lactalbumine (25-30 % des PS), des protéines sanguines comme les immunoglobulines et des produits de l'hydrolyse de caséines (protéoses peptones). Les protéines solubles du lait ont une taille inférieure à 5 nm. Elles sont riches en leucine, un acide aminé intéressant pour les personnes âgées, puisqu'il stimule la synthèse musculaire.

Lors de la consommation d'un produit laitier, un effet synergique est observé entre la caséine et les protéines sériques : tandis que les protéines sériques stimulent la synthèse musculaire, la caséine maintient cette synthèse (5). Dans le cadre de EAT4AGE, le but est donc de développer des produits enrichis en protéines sériques pour maximiser la synthèse musculaire.

2. La digestion des aliments

La digestion est composée d'un ensemble de processus chimiques et physiques. L'activité mécanique a principalement lieu dans la bouche, au cours de la mastication et également dans l'estomac. Les processus chimiques débutent aussi en bouche, par la sécrétion de salive, qui contient une enzyme permettant de catalyser l'hydrolyse des glucides, l' α -amylase salivaire.

Dans l'estomac, les sécrétions gastriques établissent un pH acide et apportent des enzymes digestives comme la pepsine, qui catalyse l'hydrolyse des protéines en produisant des polypeptides, ou encore la lipase gastrique, qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides et produit des diglycérides et acides gras libres.

Dans l'intestin grêle, le pH augmente progressivement pour retourner à un pH neutre. Les sécrétions biliaires et pancréatiques apportent la bile ainsi que des enzymes pancréatiques, qui permettent l'hydrolyse des protéines (trypsine, chymotrypsine), l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides (lipase pancréatique, colipase pancréatique) et la transformation des phospholipides en lysophospholipides (phospholipases pancréatiques) (6).

La digestion se poursuit dans le côlon avec l'intervention du microbiote intestinal.

3. Les approches et modèles d'étude de la digestion

Plusieurs approches *in vitro*, *in vivo* et *in silico* sont utilisées au STLO pour étudier la digestion, en considérant plusieurs populations (nourrissons, adultes sains et personnes âgées). Les approches *in vivo* sont constituées d'études précliniques et cliniques et les approches *in silico* de modélisations mathématiques des phénomènes. En ce qui concerne les approches *in vitro*,

trois modèles de digestion ont été mis en place : la digestion statique, la digestion semi-dynamique et la digestion dynamique (3).

La digestion statique est un modèle de digestion *in vitro* qui consiste à recréer les conditions auxquelles sont soumis les aliments lors de leur passage dans le tube digestif. Les aliments sont incubés à 37 °C et mélangés à des fluides salivaires, gastriques puis intestinaux pendant un temps défini. À chaque étape, le pH est adapté et maintenu à une valeur fixe. De plus, les enzymes sont ajoutées en même temps, à dose constante (7).

C'est une digestion statique car les compartiments sont indépendants les uns des autres et leurs pH sont constants. Un article décrit en détails ce modèle de référence (6). C'est un modèle relativement simple à mettre en œuvre et peu onéreux. Au STLO, il est utilisé pour cribler différentes formulations, étudier des mécanismes enzymatiques, estimer la digestibilité finale et réaliser des suivis *in situ* par IRM (3).

Cependant, lors de la digestion *in vivo*, les paramètres (ex : pH, dilution de l'aliment par les fluides) ne sont pas constants. En effet, dans l'estomac, les bols alimentaires entrent à une fréquence régulière, les sécrétions gastriques arrivent petit à petit et le contenu de l'estomac arrive progressivement dans le duodénum. Le modèle de digestion statique présente donc des limites pour mimer le fonctionnement du tube digestif.

Un second modèle de digestion, semi-dynamique cette fois, a été développé. Celui-ci prend en compte l'ajout progressif de plusieurs solutions : une solution gastrique contenant des électrolytes, une solution d'acide chlorhydrique permettant la régulation du pH, et une solution d'enzymes gastriques (6).

Enfin, la digestion dynamique, quant à elle, tient compte de l'évolution des phénomènes biochimiques et mécaniques qui ont lieu dans le tube digestif au cours de la digestion, et notamment des passages progressifs d'un compartiment à un autre. Elle est donc plus proche du phénomène physiologique (7). Trois digesteurs dynamiques sont utilisés au STLO : deux DIDGI (dont 1 équipé de filtration membranaire) et un NERD-T (cf. Figure 2) qui mime la biomécanique du tube digestif.



Figure 2 : Photographie du
NERD-T

Une dernière approche *in vitro* est l'utilisation de modèles cellulaires de la paroi intestinale pour étudier l'absorption des nutriments (3).

C. Objectifs du stage

L'objectif de ce stage est de réaliser des analyses biochimiques sur des digestats (produits de digestion), pour déterminer le degré d'hydrolyse des protéines au cours de la digestion, grâce au dosage de l'azote aminé libre par la méthode de l'OPA (8). Cette technique a été réalisée sur des échantillons obtenus par digestion *in vitro* de gels laitiers dans le NERD-T.

II. Activité

A. Principe du dosage

Le dosage de l'azote aminé libre (NH_2) est basé sur la réaction faisant intervenir l'O-phthaldialdéhyde (OPA) avec les amines primaires en présence d'un agent réducteur (β -mercaptoéthanol ou DTT) (cf. Figure 3).

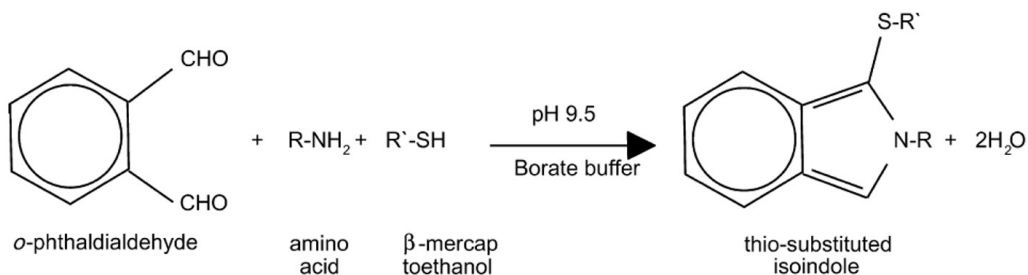


Figure 3 : Réaction de l'OPA et du β-mercaptoéthanol ou DTT

Cette réaction forme un composé détectable à 340 nm. La densité optique à 540 nm est également mesurée pour vérifier la turbidité du mélange.

Un protocole détaillant l'ensemble des opérations (préparation des réactifs, pré-traitement des échantillons, dosage, exploitation des résultats...) est disponible au STLO.

B. Matériel et méthodes

1. Matériel

Lors de ce dosage, différents matériels et appareillages sont utilisés : une balance, un pH-mètre, un spectrophotomètre visible pour plaque 96 puits placé sous hotte, des plaques UV de 96 puits, des tubes Eppendorf et/ou des plaques de dilution (deepwell), des fioles jaugées de 50 mL et 100 mL pour la préparation des réactifs, et des micropipettes.

2. Réactifs

Les réactifs utilisés sont les suivants : l'*o*-phthaldialdéhyde (OPA), le dithiothréitol (DTT), le tétraborate de sodium (Na₂B₄O₇), le sodium dodécyl sulfate (SDS) et la L-méthionine.

3. Échantillons

Des gels laitiers sont préparés à partir d'une solution à 10% de protéines sériques. Cette solution amenée à pH 4,6 ou 6,8 puis chauffée 30 min à 80 °C, donne des gels de structures très différentes, le premier étant moins dense que le second.

Les gels ont été digérés en triplicat et les échantillons prélevés à 4 temps, (37 min, 60 min, 82 min et 105 min) notés ¼, 2/4, 3/4 et 4/4. Les digestions 6, 7 et 8 sont des répliqués de la digestion du gel à pH 6,8 et les digestions 9,10 et 11 des répliqués de la digestion du gel à pH 4,6.

Lors de la digestion des protéines, les liaisons peptidiques sont coupées, avec libération d'un groupement NH_2 par liaison rompue. Le dosage par la méthode de l'OPA permet de quantifier la libération de ces groupements. Ce dosage a été réalisé sur les prélèvements de digestion bruts, et sur les mêmes prélèvements après hydrolyse acide. L'hydrolyse acide (24h d'incubation à 110 °C en présence d'acide chlorhydrique 6N) est la même que celle réalisée pour un dosage d'acides aminés totaux. Elle casse toutes les liaisons peptidiques et permet d'estimer le 100 % d'hydrolyse. Ceci permet ensuite de connaître la quantité totale de NH_2 dans l'échantillon et ainsi de déterminer le pourcentage lié à l'action de la pepsine.

C. Mise en œuvre technique

1. Préparation des réactifs

Certaines solutions peuvent être préparées à l'avance. C'est le cas du tétraborate de sodium, du SDS 20 %, de la solution diluante (à conserver à température ambiante) et de la gamme étalon (à stocker à -20 °C).

Dans un premier temps, une solution de tétraborate de sodium à 100 mmol.L^{-1} est préparée. Pour cela, 19,07 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ sont dilués dans 400 mL d'eau osmosée. Ensuite, le pH est ajusté à 9,5 avec de la soude à 1 mol.L^{-1} . Puis, le volume est complété à 500 mL en fiole jaugée. Cette solution peut être conservée pendant 1 mois à température ambiante. La molarité du tétraborate de sodium n'est pas un facteur influant directement le dosage, il sert à ajuster le pH. Des solutions de concentrations allant de 20 mmol.L^{-1} à 100 mmol.L^{-1} peuvent être utilisées en fonction du pH de l'échantillon à doser. Pour que le dosage se passe correctement, le pH de l'échantillon dilué doit être supérieur à 8,3.

Dans un second temps, la solution de SDS 20 % (p/v) est préparée par la dissolution de 20 g de SDS dans 100 mL d'eau osmosée.

Ces deux solutions permettent de préparer la solution diluante, qui est utilisée pour diluer et tamponner les échantillons. En fiole jaugée de 100 mL, 2,5 mL de SDS 20 % sont ajoutés, puis le volume est complété jusqu'au trait de jauge avec la solution de tétraborate de sodium.

Enfin, la gamme d'étalonnage peut également être préparée à l'avance. Tout d'abord, une solution mère de méthionine à 20 mmol.L^{-1} est préparée. Pour cela, 29,8 mg de L-méthionine doivent être dissous dans 10 mL d'eau osmosée. La gamme d'étalonnage est ensuite préparée comme expliqué dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Gamme d'étalonnage de la méthionine pour le dosage par l'OPA

(Source : Protocole "Dosage de l'azote aminé libre (NH₂) par la méthode à l'OPA", STLO (9))

mM méthionine	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,5	2
µL de solution mère	0	50	100	150	200	250	375	500
µL de solution diluante	100	4950	4900	4850	4800	4750	4625	4500
mg NH₂ libre.L⁻¹	0	3,2	6,4	9,6	12,8	16	24	32

Certaines solutions doivent être préparées extemporanément, comme l'OPA à 10 mg.mL⁻¹ dans l'éthanol et le DTT à 1 mol.L⁻¹, qui permettent la préparation du réactif OPA.

Pour préparer la solution d'OPA, 15 mg d'OPA sont dissous dans 1,5 mL d'éthanol. La dissolution de l'OPA prend du temps et la solution doit être protégée de la lumière.

Pour réaliser la solution de DTT, 61,7 g de DTT sont dissous dans 400 µL d'eau osmosée.

En ce qui concerne le réactif OPA, celui-ci est préparé par le mélange de 1,25 mL de SDS 20 %, de 350 µL de DTT et de 1,25 mL d'OPA, qsp 50 mL par le tétraborate de sodium à 100 mmol.L⁻¹. Ce volume de réactif OPA peut être utilisé pour 4 à 5 plaques de 96 puits et la solution est stable pendant 48 heures, si elle est conservée à 4°C et à l'abri de la lumière.

L'OPA et le DTT doivent être manipulés avec des gants et des lunettes de protection, sous hotte, tout comme les solutions qui en contiennent.

2. Préparation des échantillons

Lors de ce dosage colorimétrique, il est important que la solution analysée soit aussi limpide que possible et sans particules. Si l'échantillon analysé est turbide, il est possible de lui faire subir quelques pré-traitements, comme une centrifugation, une précipitation sélective suivie d'une centrifugation, une filtration ou une sonication. Cependant, si une partie de l'échantillon est éliminée via ce fractionnement, le dosage ne permettra pas de déterminer le degré d'hydrolyse. Les échantillons analysés au cours du stage ont été soniqués pour réduire la taille des particules qui étaient présentes.

Ensuite, pour avoir un pH supérieur à 8,3, les échantillons doivent être dilués dans la solution diluante. Le dosage est réalisé en duplicat (réalisation de deux dilutions indépendantes par échantillon), chaque dilution est analysée en simple.

3. Réalisation du dosage

Les dilutions sont réparties dans les puits d'une plaque UV-STAR® de 96 puits, en duplicat à raison de 25 µL par puits. Puis, le réactif OPA est ajouté, à raison de 50 µL par puits. La plaque est mise à incuber sous agitation et à l'obscurité dans le spectrophotomètre Thermo Scientific Multiskan Go 3.2 pendant 10 min, puis la densité optique est lue à 340 nm et 540 nm. La lecture à 340 nm permet de déterminer ensuite la concentration en NH₂ dans le mélange, tandis que la lecture à 540 nm permet de vérifier l'absence de turbidité.

III. Résultats

Le dosage par la méthode de l'OPA a été réalisé sur des échantillons prélevés au cours de digestions dynamiques dans le NERD-T.

A. Exploitation des résultats

Le dosage de la gamme d'étalonnage permet de tracer une courbe d'étalonnage et sa droite de régression. Une gamme a été réalisée par plaque.

Tableau 2 : Densités optiques de la gamme d'étalonnage de la méthionine

Gamme n°	mg/L de NH ₂ libre	DO ₃₄₀	DO ₃₄₀ -blanc	y = ax + b	
1	0,00	0,1033	0,0000	a	0,0594
	3,20				
	6,40	0,4744	0,3711		
	9,60	0,7295	0,6262		
	12,80	0,8525	0,7492	b	0,0192
	16,00	1,1334	1,0301		
	24,00	1,5692	1,4659		
	32,00	1,9866	1,8833		
2	0,00	0,0644	0,00	a	0,0501
	3,20				
	6,40	0,4406	0,38		
	9,60	0,6050	0,54		
	12,80	0,7677	0,70	b	0,0432
	16,00	0,9284	0,86		
	24,00				
	32,00	1,6847	1,62		

La DO du blanc, qui correspond à la solution diluante sans méthionine, est soustraite à chaque DO, pour éliminer la réponse due à la solution diluante dans la mesure de la densité optique. Les valeurs obtenues permettent de tracer les deux courbes d'étalonnage suivantes :

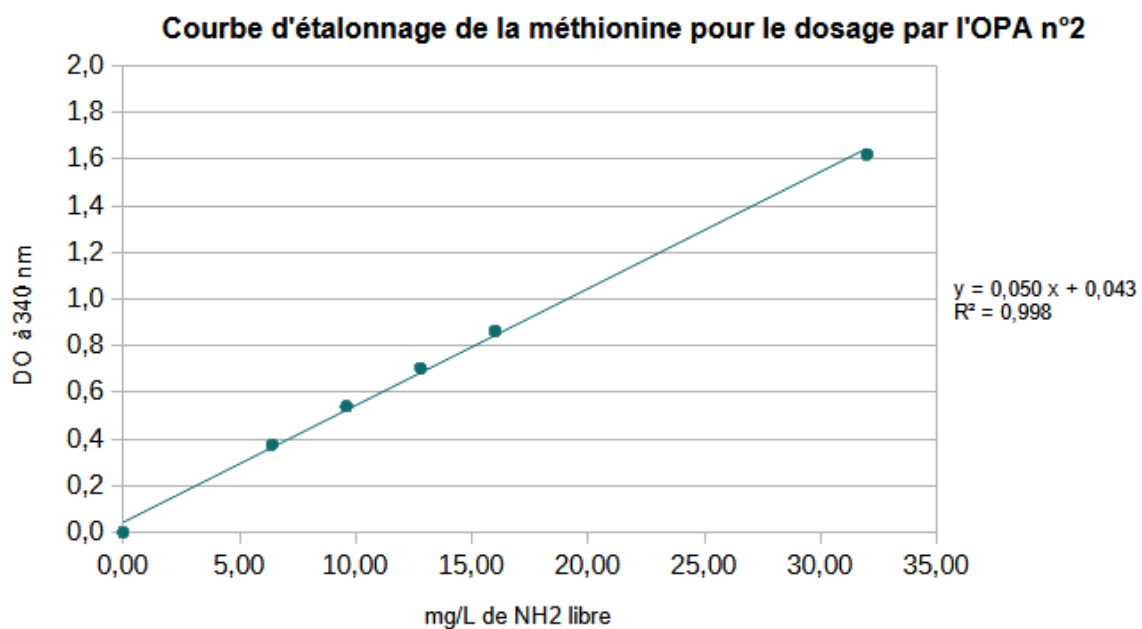
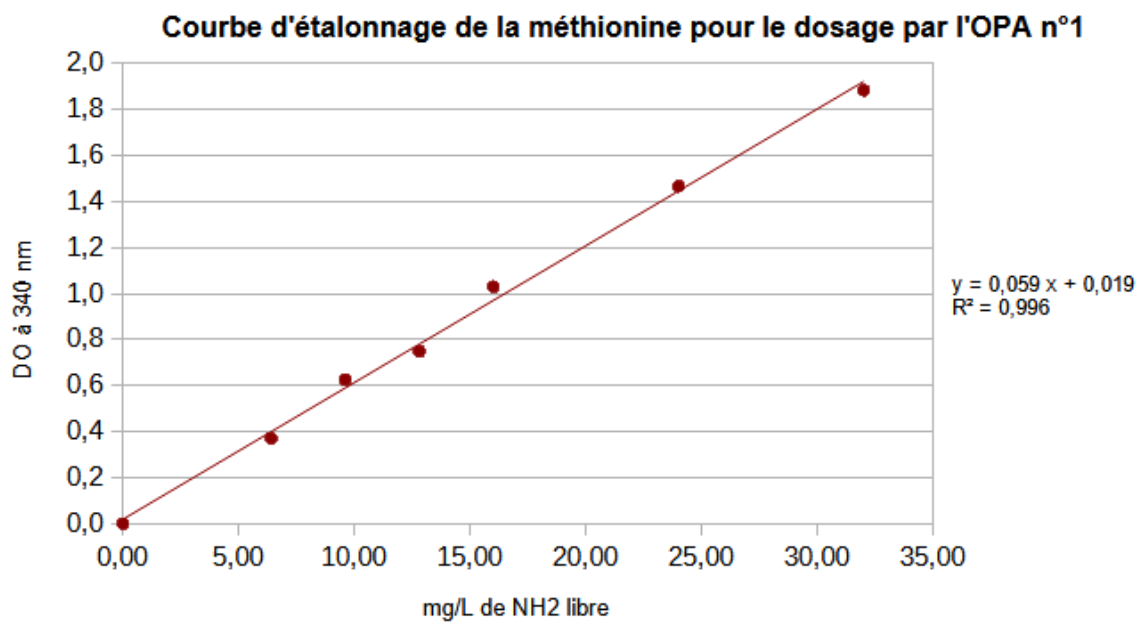


Figure 4 : Courbes d'étalonnage de la méthionine pour le dosage par l'OPA

Certains points aberrants ont été supprimés pour obtenir un meilleur coefficient de corrélation (R^2) de la droite.

La pente et l'ordonnée à l'origine peuvent être déterminées de deux manières : en utilisant directement l'équation de droite, ou en les calculant grâce aux formules PENTE et ORDONNEE.ORIGINE.

La pente et l'ordonnée à l'origine de l'équation de droite permettent ensuite de calculer la concentration en NH_2 . L'équation est sous la forme $y = ax + b$ avec a , la pente et b , l'ordonnée à l'origine.

$$\text{Donc, } A(340) = \frac{[NH_2]}{Fd} \times a + b \quad \text{et} \quad [NH_2] = \frac{A(340) - b}{a} \times Fd$$

a : pente

b : ordonnée à l'origine

A_{340} : réponse de l'échantillon à 340 nm

Fd : facteur de dilution de l'échantillon

$[NH_2]$: concentration en azote aminé libre, exprimée en $mg.L^{-1}$ ou $mmol.L^{-1}$

L'analyse est réalisée en duplicat pour chacun des 24 échantillons.

Avant la réalisation de ce dosage, la concentration en protéines sériques dans l'échantillon ([PS]) a été déterminée par lecture de la densité optique à 280 nm.

La masse en mg de NH_2 libres par g de protéines est ensuite déterminée de la manière suivante : $mg NH_2 libre / g de PS = \frac{Concentration * Fd}{[PS] dans l'échantillon \times 0,001}$.

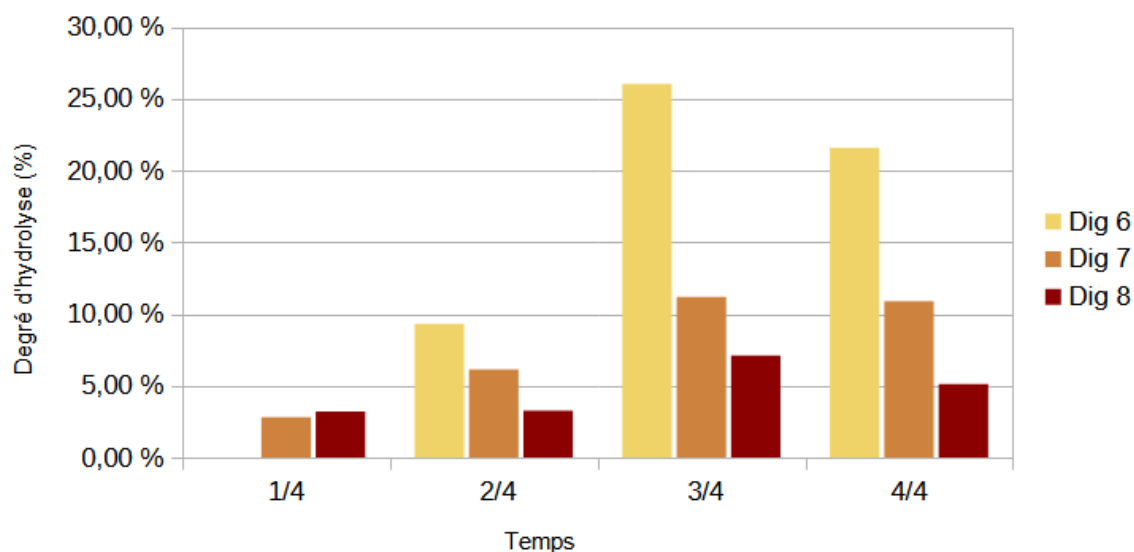
De la même manière, la masse en mg de NH_2 libres par g de protéines pour les échantillons ayant subi l'hydrolyse acide est calculée et la moyenne de ces valeurs est déterminée. Ainsi, en moyenne, après une hydrolyse totale, 24 858 mg de NH_2/g de protéines ont été libérés.

À partir de cette valeur, le degré d'hydrolyse (DH), exprimé en pourcentage, est calculé de la manière suivante : $DH = \frac{mg de NH_2 libre / g de PS}{moyenne mg de NH_2 libre / g de PS après hydrolyse acide} \times 100$.

Tableau 3 : Résultats de l'analyse de digestions 6, 7, 8, 9, 10 et 11

Gel	Dig n°	Temps	Fd	Conc NH ₂ *Fd (mg/L)	[PS] dans l'échantillon (mg/mL)	mg de NH ₂ libre/g de protéines	Moyenne des réplicats	Degré d'hydrolyse
Gel laitier à pH 6,8	6	1/4	20	113,5	-	-	-	-
			20	117,0		-		
		2/4	40	613,7	282,37	2173,31	2312,86	9,30 %
			40	692,5		2452,41		
		3/4	40	826,3	136,42	6057,20	6471,98	26,04 %
			40	939,5		6886,77		
		4/4	40	885,7	179,32	4939,34	5363,29	21,58 %
			40	1037,8		5787,25		
	7	1/4	20	129,4	194,91	664,02	696,42	2,80 %
			20	142,1		728,82		
		2/4	40	367,1	225,14	1630,45	1524,45	6,13 %
			40	319,4		1418,46		
		3/4	20	423,7	148,24	2858,55	2779,43	11,18 %
			20	400,3		2700,33		
		4/4	20	506,3	190,58	2656,78	2707,23	10,89 %
			20	525,6		2757,68		
8	1/4	40	348,7	376,29	926,72	796,18	3,20 %	
		40	250,5		665,63			
	2/4	40	424,0	422,57	1003,38	810,57	3,26 %	
		40	261,0		617,76			
	3/4	20	205,2	112,43	1825,20	1767,80	7,11 %	
		20	192,3		1710,41			
	4/4	20	70,0	54,21	1291,32	1271,59	5,12 %	
		20	67,9		1251,85			
Gel laitier à pH 4,6	9	1/4	20	419,0	186,83	2242,66	2383,21	9,59 %
			20	471,5		2523,46		
		2/4	20	301,7	81,92	3682,46	3601,37	14,49 %
			20	288,4		3520,29		
		3/4	20	236,3	68,04	3472,71	3417,93	13,75 %
			20	228,8		3363,16		
		4/4	20	132,8	45,98	2888,58	2869,07	11,54 %
			20	131,0		2849,55		
	10	1/4	20	485,5	222,68	2180,40	2110,36	8,49 %
			20	454,3		2040,31		
		2/4	20	305,1	119,25	2558,66	2521,34	10,14 %
			20	296,2		2484,01		
		3/4	20	254,1	93,10	2728,82	2657,48	10,69 %
			20	240,8		2586,13		
		4/4	20	178,9	57,84	3093,95	2996,11	12,05 %
			20	167,6		2898,26		
11	1/4	20	479,2	187,87	2550,79	2483,56	9,99 %	
		20	454,0		2416,34			
	2/4	20	280,7	116,09	2418,34	2420,12	9,74 %	
		20	281,1		2421,90			
	3/4	20	229,8	90,75	2532,29	2458,90	9,89 %	
		20	216,5		2385,52			
	4/4	20	232,0	91,51	2534,97	2610,01	10,50 %	
		20	245,7		2685,05			

Évolution des degrés d'hydrolyse des dig 6, 7 et 8 au cours du temps



Évolution des degrés d'hydrolyse des dig 9, 10 et 11 au cours du temps

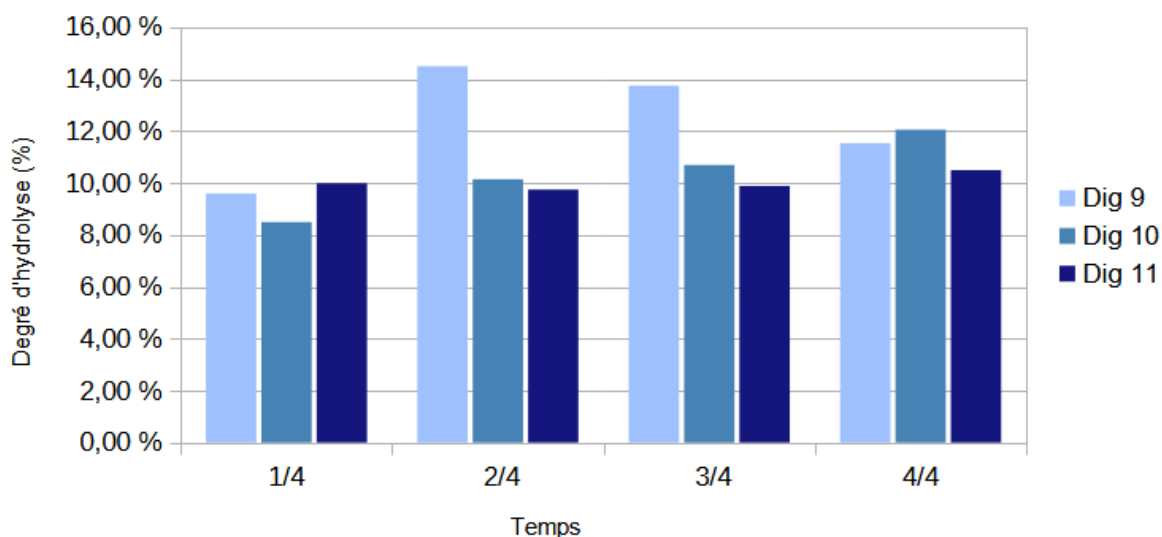


Figure 5 : Évolution du degré d'hydrolyse au cours du temps

Les résultats obtenus pour le temps 1/4 de la dig 6 sont des valeurs aberrantes, ils ont donc été supprimés et ne sont pas pris en compte dans l'interprétation des résultats.

B. Interprétation et conclusion

Les digestions 6, 7 et 8, qui sont des réplicats de la digestion du gel laitier à pH 6,8, présentent une évolution du degré d'hydrolyse très hétérogène. Si les dig 7 et 8 ont des degrés

d'hydrolyse proches, allant pour la dig 7 de 2,80 % à 11,18 % et pour la dig 8 de 3,20 % à 7,11 %, la digestion 6 présente un profil différent. En effet, le degré d'hydrolyse de ses échantillons est beaucoup plus élevé, montant jusqu'à 26,04 % pour le temps $\frac{3}{4}$.

Les digestions 9, 10 et 11 sont des répliqués de la digestion du gel laitier à pH 4,6. L'évolution des degrés d'hydrolyse entre les trois digestions ne présente pas de tendance. En revanche les degrés d'hydrolyse sont assez similaires avec des valeurs entre 9,59 % et 14,49 % d'hydrolyse due à la pepsine pour la dig 9, allant de 8,49 % à 12,05 % pour la dig 10 et d'entre 9,74 % et 10,50 % pour la dig 11.

Ainsi, une plus forte variabilité des résultats est observée entre les dig 6, 7 et 8, par comparaison avec les dig 9, 10 et 11. Ceci suggère que la digestion du gel à pH 4,6 est plus répétable que celle du gel à pH 6,8. La structure des deux gels laitiers peut être à l'origine de cette variabilité. Une analyse de la taille des particules dans les digestats (conduite avant le début du stage) a mis en évidence que les particules sont en moyenne plus grandes dans le gel à pH 6,8 et surtout, que la distribution des tailles est plus étalée (traduisant donc une plus grande hétérogénéité de taille).

Les résultats obtenus ne permettent donc pas de mettre en évidence une tendance dans l'évolution du degré d'hydrolyse lors de la digestion des gels laitiers à pH 6,8. En revanche, les digestions des gels laitiers à pH 4,6 semblent suggérer que tout ce qui sort de l'estomac est hydrolysé environ au même degré au cours du temps. Il faut bien distinguer le degré d'hydrolyse dans les échantillons prélevés en sortie d'estomac, du degré d'hydrolyse global du produit. Il est en effet très probable que les grosses particules (peut-être moins hydrolysées) soient retenues dans l'estomac.

Les résultats anormaux de la digestion 6 ont été observés tout au cours du processus analytique, et ce dès le début de l'expérience. En effet, la digestion 6 est la première expérience à avoir été réalisée. Le comportement du gel digéré au cours de celle-ci était différent de celui observé pour les autres digestions. Les résultats aberrants obtenus peuvent être dû à une mauvaise calibration de la procédure au niveau du NERD-T ou au niveau de l'ajout des inhibiteurs et fluides gastriques.

IV. Conclusion

Le stage que j'ai réalisé au sein du STLO a été une expérience enrichissante, qui m'a permis de découvrir le fonctionnement d'un laboratoire de recherche et de développer mes compétences pratiques et théoriques.

J'ai eu la chance d'évoluer au sein d'une équipe pédagogique, qui m'a accompagnée avec bienveillance tout au long de mon stage. Ainsi, j'ai pu découvrir de nombreux métiers et parcours.

Je me suis familiarisée avec plusieurs techniques qui m'ont permis de développer mes compétences pratiques et de gagner en assurance au laboratoire. Des modifications des protocoles ont parfois été nécessaires, j'ai donc dû m'adapter constamment en fonction des échantillons. J'ai également eu l'occasion de développer mon esprit d'analyse et de raisonnement, en exploitant et interprétant les résultats. De plus, j'ai pris conscience de l'importance d'être organisé pour travailler au laboratoire, en assurant la traçabilité de tous les échantillons et en consignait toutes les analyses réalisées dans un cahier de laboratoire.

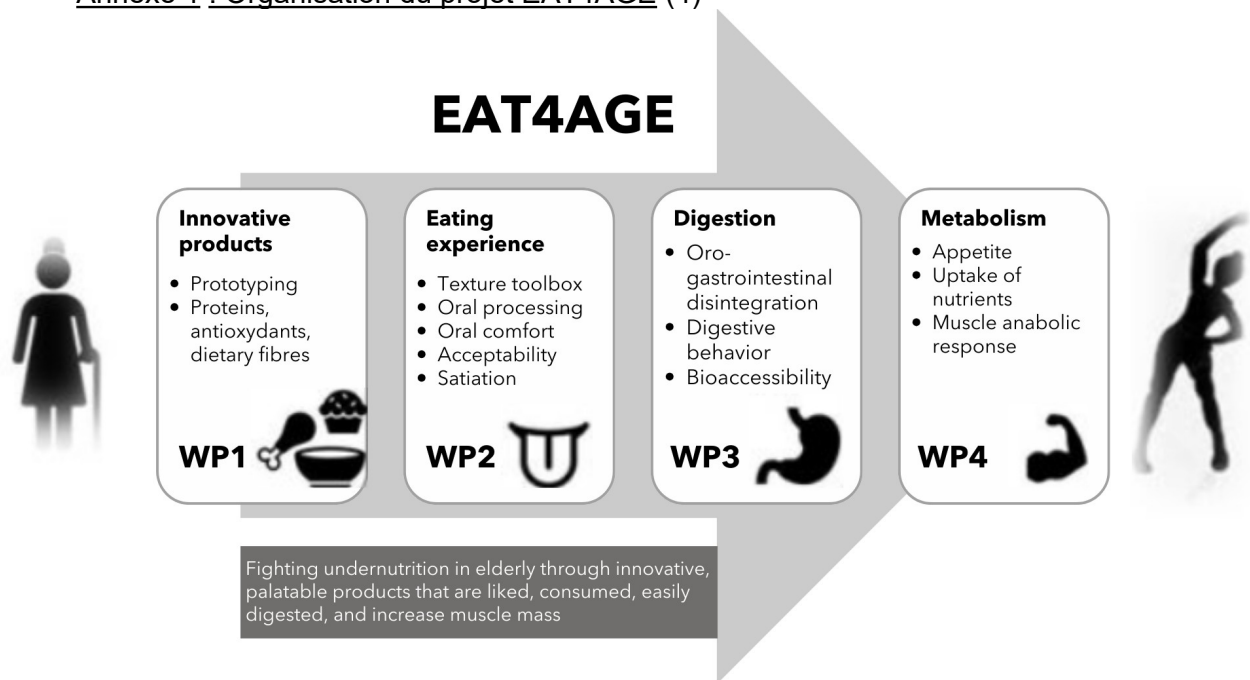
Concernant mon projet professionnel, ce stage a été une première expérience dans le milieu de la recherche. Il m'a permis de confirmer mon projet de m'orienter vers la recherche et de conforter mon envie de poursuivre mes études après le BUT.

Bibliographie

1. INRAE : recherches pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement [Internet]. [cité 29 janv 2024]. Disponible sur: <https://www.inrae.fr/>
2. Décret n° 2019-1046 du 10 octobre 2019 relatif à l'organisation et au fonctionnement de l'Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement. 2019-1046 oct 10, 2019.
3. UMR STLO Site internet de l'unité [Internet]. [cité 29 janv 2024]. Disponible sur: <https://stlo.rennes.hub.inrae.fr/>
4. Nofima [Internet]. 2021 [cité 6 févr 2024]. Palatable, nutritious and digestible foods for prevention of undernutrition in active aging. Disponible sur: <https://nofima.com/projects/eat4age/>
5. Lacroix M, Bos C, Léonil J, Airinei G, Luengo C, Daré S, et al. Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement²³. *Am J Clin Nutr*. 1 nov 2006;84(5):1070-9.
6. Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat Protoc*. avr 2019;14(4):991-1014.
7. Ménard O, Dupont D. Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innov Agron*. 2014;36:27-41.
8. Church FC, Porter DH, Catignani GL, Swaisgood HE. An *o*-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal Biochem*. 1 mai 1985;146(2):343-8.
9. Protocole « Dosage de l'azote aminé libre (NH₂) par la méthode à l'OPA ». STLO (INRAE);

Annexes

Annexe 1 : Organisation du projet EAT4AGE (4)



Résumé

Les protéines sériques du lait sont riches en leucine, un acide aminé favorisant la synthèse musculaire, ce qui le rend très intéressant pour les personnes âgées. Dans le cadre du projet européen EAT4AGE, des produits laitiers riches en protéines sériques ont été conçus et testés à différents niveaux : la consommation, la digestion et le métabolisme. Pour étudier la digestion de ces produits laitiers aux structures différentes, un modèle de digestion *in vitro* dynamique, avec le digesteur dynamique NERD-T, a été utilisé, puis différentes analyses ont été menées. L'objectif de ce stage était de réaliser des analyses biochimiques sur les digestats de ces produits, afin de déterminer le degré d'hydrolyse des protéines au cours de la digestion, grâce au dosage de l'azote aminé libre (NH₂) par la méthode de l'OPA. C'est un dosage colorimétrique basé sur la réaction qui fait intervenir l'O-phthaldialdéhyde (OPA) avec les amines primaires, en présence d'un agent réducteur (β-mercaptoéthanol ou DTT). Elle forme un composé détectable à 340 nm et permet de déterminer la masse de NH₂ libérée en fonction de la masse de protéines sériques, pour ensuite calculer le degré d'hydrolyse. Le rapport de stage présente le principe de ce dosage et une étude de l'évolution du degré d'hydrolyse des protéines sériques en phase gastrique au cours du temps.