

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES

# ÉTUDE DE MÉTABOLITES DU LAIT PAR UN ANALYSEUR À FLUX CONTINU

Réalisé par  
Guillaume BILLE



Ecole Industrielle et Commerciale de la Ville de Namur  
Rue Pépin n°2B  
5000 NAMUR



3eme année de baccalauréat en chimie appliquée  
Année scolaire 2012-2013

Mâîtres de stage: Mr Georges SINNAEVE & Mme Pascale HERTSENS  
Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W)  
Département de valorisation des productions  
Professeur de stage: Mr Jean-Claude VAN HEUGEN (EICVN)

TRAVAIL DE FIN D'ÉTUDES

# ÉTUDE DE MÉTABOLITES DU LAIT PAR UN ANALYSEUR À FLUX CONTINU

Réalisé par  
Guillaume BILLE



Ecole Industrielle et Commerciale de la Ville de Namur  
Rue Pépin n°2B  
5000 NAMUR



3eme année de baccalauréat en chimie appliquée  
Année scolaire 2012-2013

Mâîtres de stage: Mr Georges SINNAEVE & Mme Pascale HERTSENS  
Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W)  
Département de valorisation des productions  
Professeur de stage: Mr Jean-Claude VAN HEUGEN (EICVN)

# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble du département de valorisation des productions du Centre Wallon de Recherches Agronomiques de Gembloux (CRA-W) pour son accueil très sympathique et plus particulièrement :

- ✚ Monsieur Georges SINNAEVE, coordinateur d'unité, grâce à qui j'ai eu l'opportunité de réaliser ce stage ;
- ✚ Madame Pascale HERTSENS, pour sa présence, son aide et ses précieux conseils tout au long de mon stage ;
- ✚ Monsieur Frédéric DEHARENG, responsable du Laboratoire U14\_Macro ;
- ✚ Mademoiselle Claire DARIMONT, technicienne de laboratoire avec qui j'ai travaillé sur l'appareil à flux continu ;
- ✚ Sans oublier toute l'équipe du laboratoire de chimie laitière que j'ai côtoyée durant près de deux mois ;
- ✚ Monsieur Jean-Claude VAN HEUGEN, pour sa visite au CRA-W en tant que professeur de stage ;
- ✚ Mes parents pour leur précieux soutien.

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	3
Table des matières	4
Résumé	6
Introduction générale	7
a. Projets au labo	7
b. Objectifs du TFE	8
1. Partie Théorique	9
1.1. Les produits laitiers	9
1.2. Composition du lait	9
1.3. Importance des produits laitiers pour l'homme	10
2. Partie Pratique	11
2.1. Matériel	11
2.1.1. Appareillage	11
a) Description	11
b) Principe général	11
c) Module du lactose	12
d) Module de l'urée	13
e) Module de l'acétone	15
f) Module de l'acide $\beta$ -hydroxybutyrique (BHBA)	16
g) Module des nitrites-nitrates	17
h) Module du citrate de sodium	18
2.1.2. Echantillons	20
2.2. Méthodes	21
2.2.1. Préparation des solutions	21
2.2.2. Programme informatique : Flow Access	22
2.2.3. La ligne de base	23
2.2.4. La calibration	25
2.3. Sécurité	27
2.4. Rinçages	27
2.4.1. Pour le nettoyage quotidien	27
2.4.2. Pour le nettoyage avant une période d'arrêt	27

### 3. Résultats et Discussion 28

#### 3.1. Dosage de l'urée 28

3.1.1. La calibration de l'urée 28

3.1.2. Analyse de l'urée 31

3.1.3. Analyse des résultats 33

#### 3.2. Dosage du lactose 34

3.2.1. La calibration de lactose 34

3.2.2. Analyse du lactose 36

3.2.3. Analyse des résultats 36

#### 3.3. Nouvelle analyse du lait 37

#### 3.4. Analyse commune 40

3.4.1. Calibration commune 40

3.4.2. Analyse 41

#### 3.5. Analyse de l'acétone 42

#### 3.6. Etude de l'influence du conservateur sur les résultats 46

#### 3.7. Résultats des analyses 50

### 4. Conclusion et Perspectives 55

### Bibliographie 56

### Annexes 57

# RÉSUMÉ

Ce travail de fin d'études est divisé en plusieurs parties :

- La première partie sera théorique. On y retrouvera des informations essentielles sur la composition du lait mais aussi sur l'importance des produits laitiers pour l'homme.

- La deuxième partie sera principalement consacrée à la description d'un appareil d'analyse à flux continu en lui-même avec l'explication des réactions se produisant au cours des divers analyses accompagnées de quelques schémas sur les différents principes de réactions.

Plusieurs étapes des analyses effectuées seront également expliquées ainsi que les détails utiles pour les rinçages de l'appareil.

- Les dernières parties reprendront les résultats de manière générale à savoir comment ils apparaissent sur le logiciel et comment les analyser.

Il y aura également une partie entièrement consacrée à l'interprétation des résultats obtenus dans laquelle on retrouvera les éléments nous permettant de tirer les différentes conclusions qui feront l'objet du dernier point.

# INTRODUCTION GÉNÉRALE :

## LES OBJECTIFS

### a. Projet COMPOMILK

Un projet mené par le Centre de Recherche Agronomique (CRA-W) en collaboration avec l'Unité de zootechnie de l'ULg et Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT) a pour objectif le développement d'outils pratiques destinés aux éleveurs afin de détecter les divers désordres métaboliques des vaches laitières.

Financé par le FNRS, ce projet est appelé COMPOMILK.

Il est divisé en deux parties.

- ✚ La première se base principalement sur le développement de méthodes et de calibrages permettant l'estimation par la spectrométrie Moyen Infrarouge (MIR) de composés du lait choisis pour leur potentiel à refléter un éventuel désordre métabolique. (1) (2)
- ✚ La seconde partie du projet consiste à étudier les variabilités génétiques ou non de différents composés et leurs relations avec les désordres métaboliques ainsi qu'avec les autres composés connus du lait comme le lactose, les matières grasses ou encore l'urée. (3)

Les désordres métaboliques que l'on peut rencontrer chez la vache, et que le projet COMPOMILK essaye de détecter, sont notamment l'acidose et l'acétonémie.

- ✚ L'acidose est caractérisée par une acidité trop élevée dans la panse de l'animal avec abaissement du pH et modification de la flore microbienne. L'origine de ce désordre métabolique est due à la consommation excessive de rations comportant un fort pourcentage de concentrés riches en glucides rapidement fermentescibles favorisant une modification de la population microbienne au profit des lactobacilles « producteurs » d'acide lactique. Elle peut se manifester de façon « chronique » ou « latente » soit de manière bénigne mais peut également être considérée comme « fatale » et conduire à la mort de l'animal. Ce dernier cas peut amener chez la vache les symptômes d'une éventuelle baisse de production laitière accompagnée d'une baisse de la consommation de fourrages grossiers et d'une diminution du taux butyreux.
- ✚ L'acétonémie, connue aussi sous le nom de cétose, est quant à elle une maladie du métabolisme énergétique se caractérisant par une concentration trop élevée en corps cétoniques dans le sang.

Ces corps cétoniques font partie des nutriments énergétiques habituels de l'animal mais, au-delà d'un certain seuil, ils deviennent toxiques.

Généralement, cette maladie touche les vaches laitières fortes productrices entre la 2<sup>e</sup> et la 6<sup>e</sup> semaine de lactation lorsque les besoins énergétiques de l'animal sont maximaux (4).

En effet, après la gestation, il arrive que la vache ait été trop puiser dans ses réserves de graisses. Cela entraînera une accumulation d'acétone dans l'organisme de l'animal et augmentera par conséquent le risque d'acétonémie.

Les symptômes associés à ce type de maladie sont des baisses d'appétit et de production laitière mais aussi l'apparition de troubles nerveux comme des périodes d'excitation et de léthargie ou encore une hyperactivité du rumen(5).

## **b. Objectifs du TFE**

Ce travail de fin d'études est réalisé à partir d'un stage qui s'inscrit dans le cadre de la troisième année de baccalauréat en chimie appliquée que je mène à L'École Industrielle et Commerciale de la Ville de Namur.

Le stage est ancré dans le baccalauréat en chimie appliquée dans le but de plonger l'étudiant directement en immersion afin qu'il découvre, d'une part, le côté professionnel du monde scientifique du travail et, d'autre part, qu'il assure son intégration au sein d'une équipe de travail.

Depuis quelques mois, le Centre de Recherche Agronomiques de Gembloux utilise, dans son laboratoire de chimie laitière, un tout nouvel appareil permettant l'analyse simultanée des différents métabolites présents dans le lait de vache.

Mon but était donc d'utiliser ce nouveau matériel durant mon stage afin d'observer et d'analyser comment l'ensemble de ce matériel réagirait suite à de fréquentes utilisations mais aussi tenter d'apporter des réponses aux éventuelles interrogations découlant de certains résultats d'analyses.

Pour cela, une partie théorique retracera quelques notions essentielles sur le lait tandis que la partie pratique traitera de l'explication complète de l'appareil à flux continu.

Enfin, une partie de ce TFE sera dédiée à l'analyse de résultats obtenus lors de diverses expériences menées avec l'AFC.



# 1. PARTIE THÉORIQUE

## 1.1. Les produits laitiers

Le lait est un liquide blanc sécrété par les glandes mammaires pendant la période de lactation.

Ces glandes refferment un grand nombre de petites alvéoles entourées d'une couche de cellules sécrétrices et toutes connectées par une série de canaux au canal de trayon par lequel s'écoule le lait (6).

De composition complexe, il est un aliment naturel incomparable pour les nouveau-nés et difficilement remplaçable par d'autres aliments.

Si il peut provenir de brebis, de chèvre ou encore de truie, le lait le plus souvent consommé est bien le lait de vache. Ce dernier est employé depuis longtemps dans l'alimentation humaine et plus principalement dans la plupart des produits laitiers comme le beurre, les fromages, la crème ou encore les yaourts (7).

## 1.2. Composition du lait

Le lait est à 87% composé d'eau.

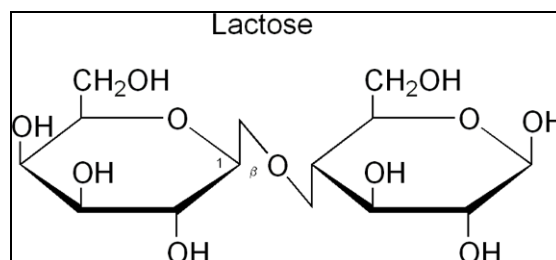
Les produits laitiers contiennent également des lipides, glucides, protéines, du calcium ainsi que des composés mineurs néanmoins importants comme les vitamines ou les enzymes.

Le résidu obtenu après avoir débarrassé le lait de son eau s'appelle l'extrait sec. Il est généralement compris entre 12,5 et 13,0 g par 100 mL de lait de vache séché (8).

Le glucide principal du lait est le lactose. A lui seul, il représente 97% des sucres présents dans le lait (9).

Les proportions des différents composants du lait varient selon l'espèce de l'animal duquel ils proviennent. On peut même parfois relever des variations de compositions chez des vaches de même race.

Voilà pourquoi on ne peut donner la composition des produits laitiers autrement qu'avec des moyennes.



Le lactose est le glucide principal du lait (9).

## 1.3. Importance des produits laitiers pour l'homme

Les produits laitiers ont une importance capitale dans la santé de l'homme. Qu'il s'agisse de lait de vache, de chèvre, d'ânesse ou de brebis, le lait constitue une véritable denrée de base et vitale pour l'homme.

Riches en calcium et en vitamines, les produits laitiers sont consommés sous plusieurs formes et ce, chaque jour, dans le monde entier, et de manière nettement plus accrue depuis le milieu du 20<sup>e</sup> siècle.

Généralement considérés comme étant bons pour la santé, les produits laitiers doivent cependant être fabriqués dans de bonnes conditions en respectant notamment la chaîne du froid afin de rester comestibles pour les consommateurs.

Cela dit, l'homme ne consomme pas toujours un verre de lait comme il consommerait un verre d'eau.

En effet, certaines personnes doivent se méfier de tous les produits laitiers comme c'est le cas par exemple des intolérants au lactose auquel cas des symptômes allergiques ou troubles digestifs peuvent apparaître.

D'autres personnes ont simplement des difficultés à digérer le lait. Une nouvelle fois, c'est le lactose qui en est le plus souvent la cause. Pour cela, certaines marques laitières ont « retravaillé » et diminué la dose de lactose présente dans leurs produits afin de les rendre plus facilement absorbés par l'organisme et ainsi faciliter la digestion du lait.

Autre lait difficilement digeste : le lait cru. Il s'agit d'un lait n'ayant subi aucun traitement de conservation, soit aucune pasteurisation ou stérilisation, et comportant une température n'ayant jamais dépassé celle d'un corps animalier. Ces laits sont donc un milieu parfait au développement des différentes bactéries comme par exemple *Escherichia Coli*.

Responsable de plusieurs maladies, le lait cru serait cependant un excellent adjuvant quant au renforcement du système immunitaire.

Il en est néanmoins interdit à la vente dans certains pays comme au Canada, en Australie ou en Ecosse (10).

## 2. PARTIE PRATIQUE

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Appareillage

##### a) Description

Afin de détecter les éventuels désordres métaboliques dans le lait, le Centre de Recherche Agronomique de Gembloux a fait l'acquisition il y a quelques mois d'un nouvel appareil à flux continu (AFC) permettant d'effectuer plusieurs analyses de référence sur des échantillons de lait.

##### b) Principe général

Le principe d'un appareil fonctionnant à Flux Continu est basé sur des analyses colorimétriques.

Il s'agit d'un circuit indépendant qui permet à l'AFC d'acheminer l'échantillon le long d'un circuit où différentes réactions pourront être réalisées.

La densité optique sera ensuite lue à une longueur d'onde spécifique à la réaction colorimétrique.

Le détecteur doit cependant être étalonné pour chaque analyte.

Le principe du « Skalar SAN ++ » est le suivant :

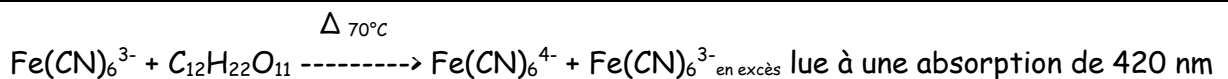
- ✚ Un échantillon de lait est placé dans un tube situé sur le passeur d'échantillon.
- ✚ Il est alors aspiré par le préleveur avant qu'une bulle d'air ne soit insérée entre l'échantillon et l'eau afin d'éviter tout mélange.
- ✚ L'échantillon et les réactifs sont ensuite amenés dans le circuit à l'aide d'une pompe péristaltique.
- ✚ Introduits au fur et à mesure dans le circuit, les réactifs vont provoquer une coloration qui pourra être alors mesurée par spectrophotométrie. En effet, le circuit se termine par une cellule où une mesure continue de la densité optique à une longueur d'onde spécifique est réalisée.
- ✚ Les résultats apparaissent alors sous forme de pics qui s'affichent en temps réel sur le logiciel relié à l'AFC. Ce logiciel permettra de calculer la concentration en analytes de l'échantillon analysé à partir de la courbe d'étalonnage.



Figure n°1 : Les deux blocs principaux de l'AFC :  
le premier permet l'analyse de l'urée et du lactose  
tandis que le reste des analyses se passe sur le deuxième.  
(Photo : G.Bille)

### c) Module du lactose

Le principe de détermination du lactose repose sur la réaction suivante :



- + La solution de tampon citrate, l'échantillon et l'air sont mélangés avant de passer dans la membrane de dialyse.
- + Les molécules de lactose traversent la membrane et sont ramassées par un courant d'eau.
- + Une solution de coloration contenant du carbonate de sodium et du ferricyanide de potassium est alors ajoutée.
- + Le mélange va alors passer dans un système chauffé à 65-70°C où le lactose réduira la ferricyanide alcaline (jaune) en ferrocyanide (jaune clair).
- + L'absorption de la ferricyanide restante sera lue à 420 nm. La quantité de lactose est inversement proportionnelle à l'absorbance.



- ✚ La détermination de l'urée est basée sur la dilution de l'échantillon dans une solution de chlorure de sodium et est dialysée contre un réactif colorant.
- ✚ Un catalyseur acide est ajouté ensuite.
- ✚ Le courant est alors chauffé à 90°C au niveau de la bobine de chauffage ce qui va permettre la formation d'un chromogène entre l'urée et le diacétyl monoxim, ce dernier étant présent dans le réactif colorant tout comme le thiosemicarbazide ( $H_2NNHC(=S)NH_2$ ) qui, quant à lui, intensifiera la couleur.
- ✚ L'absorbance sera mesurée à 520 nm.

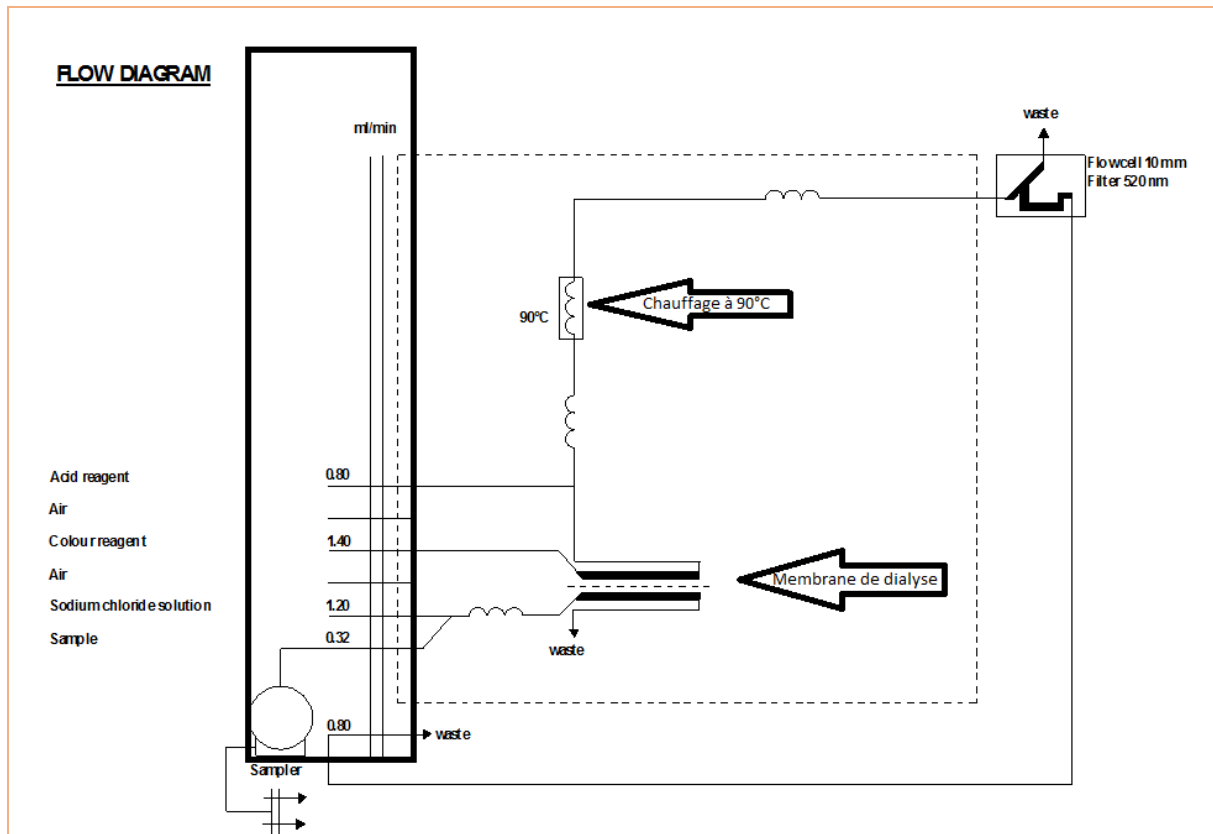


Figure n°3 : Flow sheet de la réaction de l'urée  
(Source : Procédure urée - AFC- Skalar SAN\*\* - (CRA-W) )

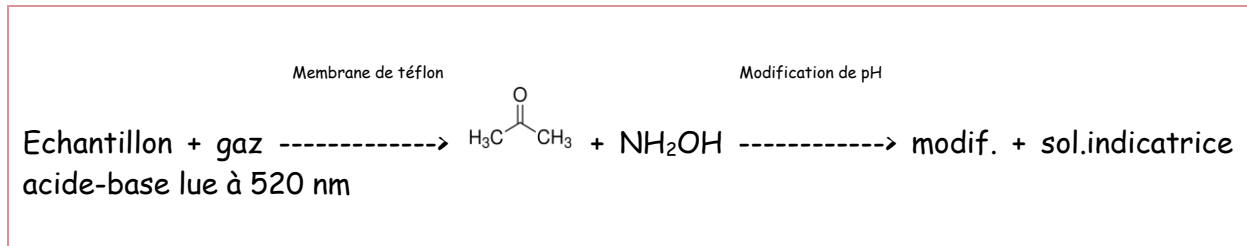
Les solutions permettant les réactions sont au nombre de trois :

- ✚ un réactif acide,
- ✚ une solution de chlorure de sodium,
- ✚ un réactif colorant.

On remarque que le réactif colorant diminue de 1,40 mL par minute ce qui implique que, vu la fréquence élevée des analyses d'urée, cette solution doit être renouvelée souvent.

### e) Module de l'acétone

La réaction suivante résume le principe de détermination de l'acétone :



La détermination de l'acétone est basée sur la séparation de l'acétone à partir de la diffusion de l'échantillon et du gaz sur une membrane de téflon.

L'acétone va donc réagir avec l'hydroxylamine ce qui aura pour conséquence un changement de pH.

En présence d'une solution indicatrice acido-basique composée de méthylorange, on pourra dès lors mesurer ce changement à une absorbance de 520 nm.

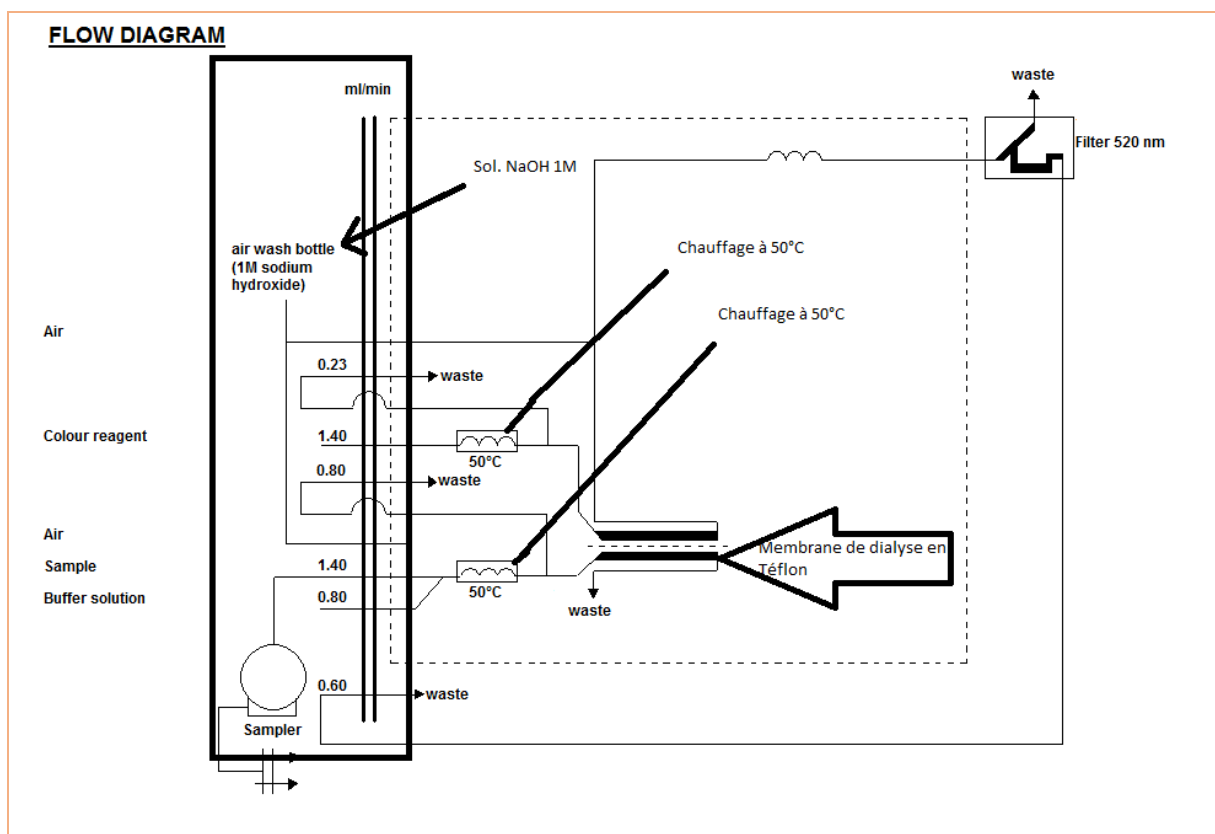


Figure n°4 : Flow sheet de la réaction de l'acétone  
(Source : Procédure acétone - AFC- Skalar SAN<sup>++</sup> - (CRA-W) )

Un réactif de coloration est fabriqué à partir d'une solution d'hydroxylamine et d'une solution stock indicatrice, une solution Tampon pH 7, ainsi qu'une solution d'hydroxyde de sodium 1 mol.L<sup>-1</sup>.

### f) Module de l'acide $\beta$ -hydroxybutyrique (BHBA)

La réaction suivante résume le principe de détermination de l'acétone :

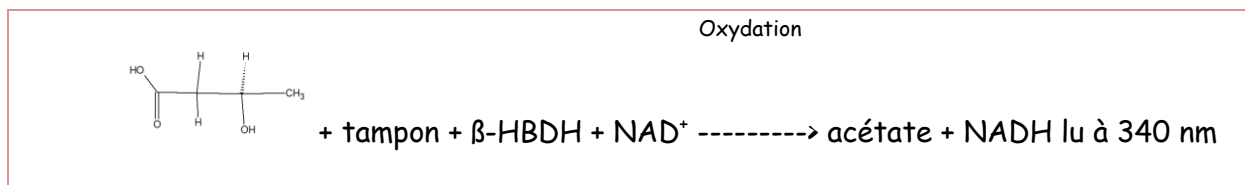


Figure n°5 : Flacons de conservation de l'enzyme 3-Hydroxybutyrate Dehydrogénase.  
La bouteille de droite contient 5 mL de 3-HBDH. Elle est conservée au frais dans la capsule en plastique située à gauche.  
(Photo : G.Bille)

- ✚ La détermination de l'acide béta-hydroxybutyrique est basée sur une réaction enzymatique.
- ✚ L'échantillon est mélangé avec le tampon et est ensuite dialysé.
- ✚ L'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique est oxydé par la nicotiamide-adénine dinucléotique (NAD) en acetoacétate et NADH en présence de l'enzyme beta-hydroxybutyrate dehydrogénase (beta-HBDH).
- ✚ L'absorbance est lue à 340 nm.



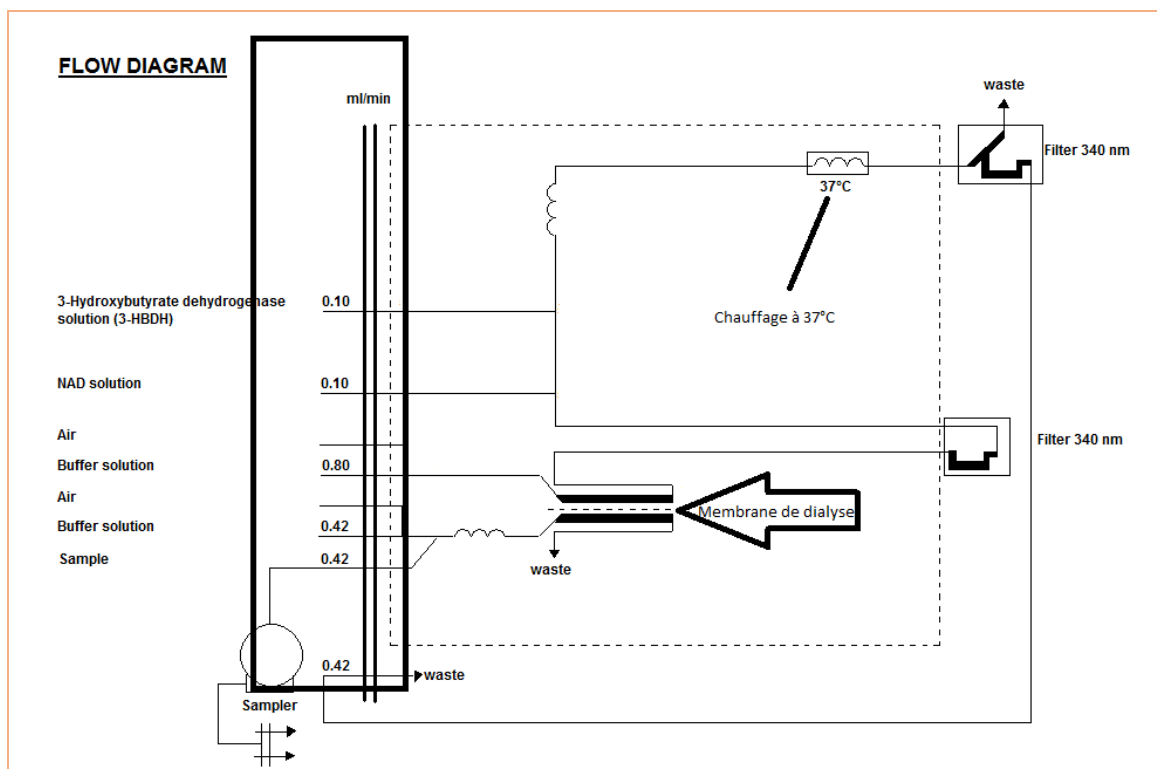


Figure n°6 : Flow sheet de la réaction au BHBA  
Source : Procédure BHBA - AFC- Skalar SAN\*\* - (CRA-W)

Trois solutions vont être utilisées dans pour les analyses du BHBA :

- ✚ une solution Tampon à pH 9,
- ✚ une solution NAD,
- ✚ une solution de beta-hydroxybutyrate dehydrogénase.

Bien que ces deux dernières solutions soient pompées à un rythme de 0,10 mL par minute, elles ne sont néanmoins plus stables au-delà de 24 heures après leur fabrication. Durant l'analyse, ces solutions sont placées dans la glace afin de les conserver à une température proche de 4°C.

### g) Module des nitrites-nitrates

Cette réaction est basée sur une méthode de réduction au Cadmium.

- ✚ Après dialyse de l'échantillon, celui-ci passe à travers une colonne de granules de Cadmium activés où les nitrates sont alors réduits en nitrites.
- ✚ Les nitrites, initialement présents en plus des nitrates réduits, sont déterminés par diazotation avec le sulfamide et le couplage avec N-(1-naphtyl) éthylènediamine dichloride pour former un composé azoïque fortement coloré et mesuré à une absorbance de 550 nm.

Le procédé de diazotation est une transformation d'une amine primaire en un sel de diazonium.

Il est réalisé en plusieurs étapes :

- ✚ L'amine qui est nucléophile attaque l'azote de l'ion nitrosonium.
- ✚ Celui-ci sera alors formé après une élimination d'eau de l'acide nitreux dans une réaction catalysée par un acide.
- ✚ Le produit obtenu par l'attaque nucléophile est stabilisé par élimination d'un proton de l'amine pour donner une nitrosamine.

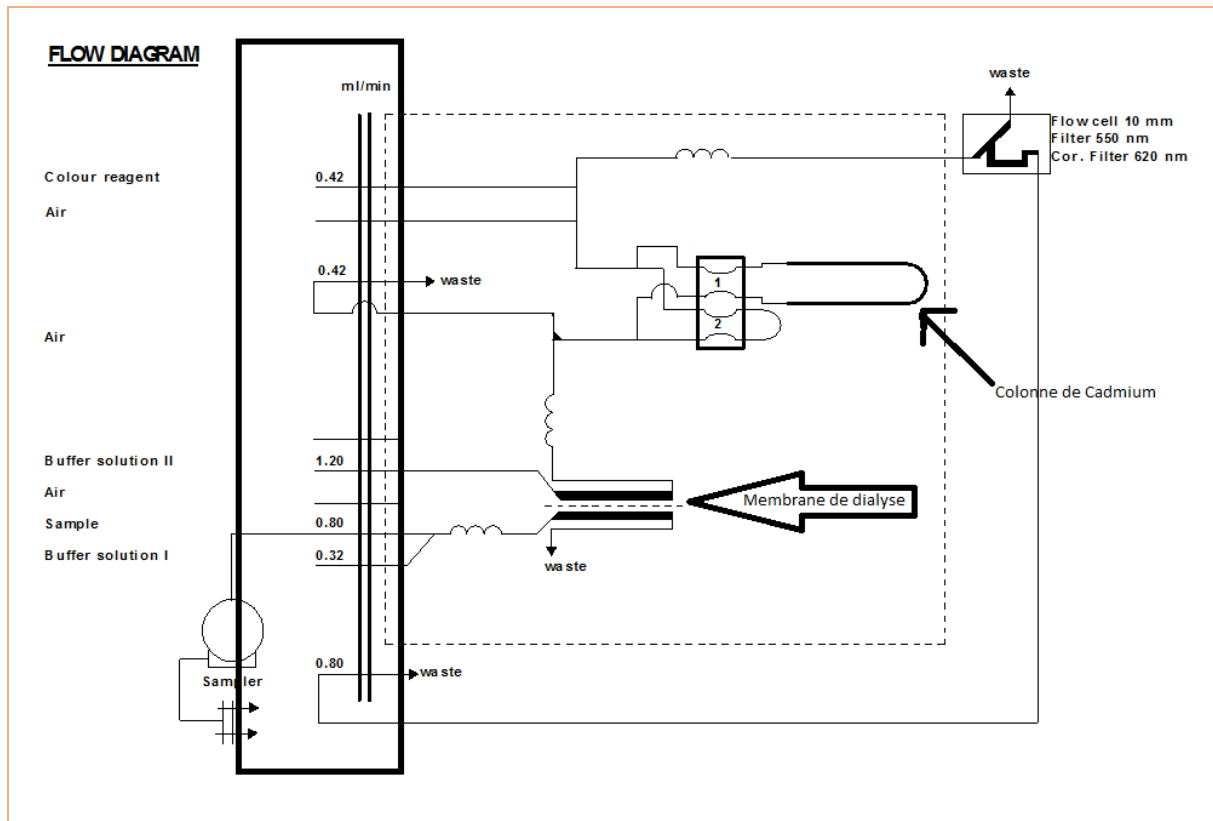


Figure n°7 : Flow sheet de la réaction avec les nitrites-nitrates  
Source : Procédure Nitrites-Nitrates - AFC- Skalar SAN\*\* - (CRA-W)

Pour cette réaction, nous avons besoin de trois solutions : deux solutions tampon (dont une avec de l'EDTA) et un réactif de coloration.

### h) Module Citrate de Sodium ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

La détermination de l'acide citrique est basée sur des réactions catalysées par une enzyme. Le citrate est converti en oxaloacétate et acétate puis catalysé par la citrate lyase. L'oxaloacétate est facilement décarboxylé pour donner du pyruvate. L'oxaloacétate et le pyruvate sont réduits par le NADH et donnent respectivement 1-malate et 1-lactate, qui seront catalysés par une malate déhydrogénase et une lactate déhydrogénase. La diminution de la quantité de NADH est stoechiométrique avec la

quantité de citrate. Le NADH restant est mesuré à 340 nm. La détection de l'interférence de l'échantillon est faite avant l'addition de l'enzyme citrate lyase. Ce résultat est déduit automatiquement de la mesure totale (après action de l'enzyme citrate lyase) par le logiciel de l'appareil à flux continu. Le module permettant le dosage du Citrate de sodium repose sur la réaction suivante (8).

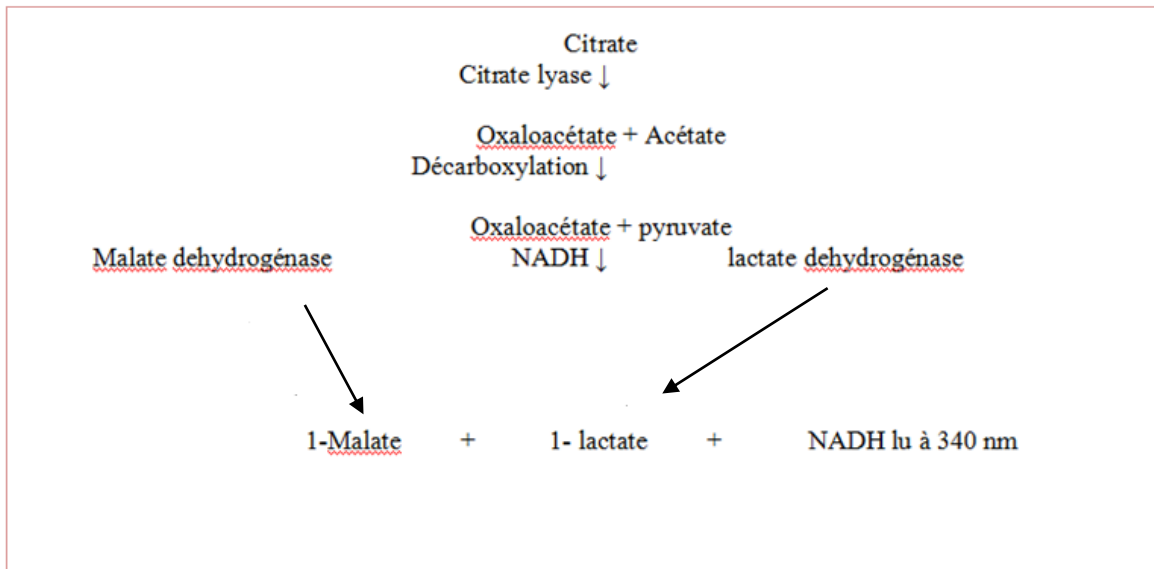


Figure n°8 : Réaction du module Citrate de sodium

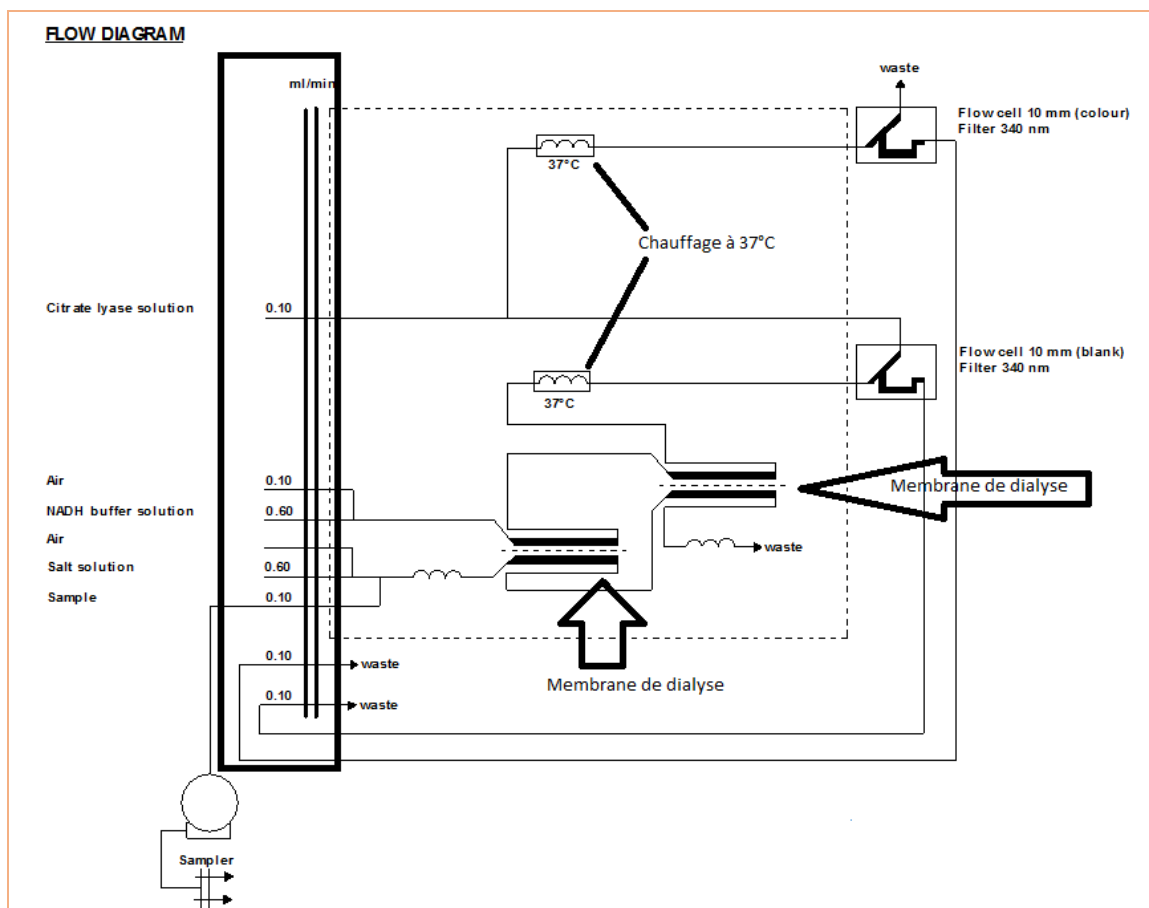


Figure n°9 : Flow sheet de la réaction avec le Sodium Citrate  
 Source : Procédure Sodium Citrate - AFC- Skalar SAN<sup>++</sup> - (CRA-W)

### 2.1.2. Echantillons

Dans le but de mener à bien le projet COMPOMILK, il est nécessaire d'analyser des échantillons de lait cru, c'est-à-dire des laits provenant d'une vache et n'ayant subi aucun procédé de stérilisation.

Etant une des rares entreprises du pays équipée d'un appareil à flux continu (AFC), le Centre de Recherches Agronomiques Wallon analyse également des laits provenant de différents clients.

Arrivé il y a un peu plus d'un an au CRA-W, l'AFC en était encore à un stade de mise au point lors du début de mon stage. Plusieurs tests ont donc été menés sur du lait cru mais aussi des laits UHT.

Des analyses ont été aussi menées sur des laits « tests ». Ces laits sont envoyés à diverses entreprises possédant un appareil à flux continu dans le cadre d'analyses inter-laboratoires. Les résultats de ces analyses permettent de déterminer si l'AFC du laboratoire de chimie laitière rentre dans les normes d'analyses.

## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Préparation des solutions

Le tableau ci-dessous reprend les solutions préparées dans le cadre de chacune des analyses. Le détail de la préparation de ces réactifs est détaillé dans les annexes 1 à 6 de ce TFE.

ANALYSE	REACTIFS/SOLUTIONS	ANNEXES
Urée	S1 : Chlorure de Sodium S2 : Réactif Colorant S3 : Réactif Acide S4 : Sol. Stock 2000 mg. L <sup>-1</sup>	1
Lactose	S1 : Tampon citrate S2 : Dérergent 0,06% S3 : Réactif Colorant S4 : Sol. Stock 12%	2
Acétone	S1 : Sol. Tampon pH 7 S2 : Réactif de coloration S3 : Na OH 1M S4 : Sol. Stock 0,004 mol.	3
Nitrite/Nitrate	S1 : Sol. Tampon I pH 8,5 S2 : Sol. Tampon II pH 8,5 S3 : Réaction Colorant S4 : Sol. Stock 0,004 mol.	4
BHBA	S1 : Sol. Tampon pH 9 S2 : Sol. NAD S3 : Sol BHBA S4 : Sol. Stock 0,006 mol.	5
Citrate de Sodium	S1 : Sol. chlorure de Sodium S2 : Sol. Tampon NADH S3 : Sol. Lyase citrate S4 : Sol. Stock 0,008 mol.	6

## 2.2.2. Programme informatique : Flow Access

Flow Access est le nom du programme informatique sur lequel se tracent les différents graphes d'analyse.

Ce programme complet est indispensable pour l'utilisation de l'AFC.

Il fournit des informations et des résultats essentiels sur les analyses comme des pics en temps réel, des zooms possibles, des chiffres, des droites de calibrations,...

Il y a même la possibilité pour le technicien de corriger lui-même certaines données qu'il estime divergentes.

A l'ouverture de ce logiciel, une page d'accueil s'affiche sur laquelle les fichiers de calibrations et de données sont répertoriés par ordre chronologique.

Il s'agit de la page « Traitement de données ».

Il est possible de consulter une calibration ou une analyse réalisée auparavant en cliquant sur un des fichiers de cette page d'accueil.

En cliquant ensuite sur l'onglet « Système », on voit apparaître un tableau qui constituera la page de travail à partir de laquelle nous rentrerons toutes nos données afin de rendre nos analyses possibles (Figure n° 10).

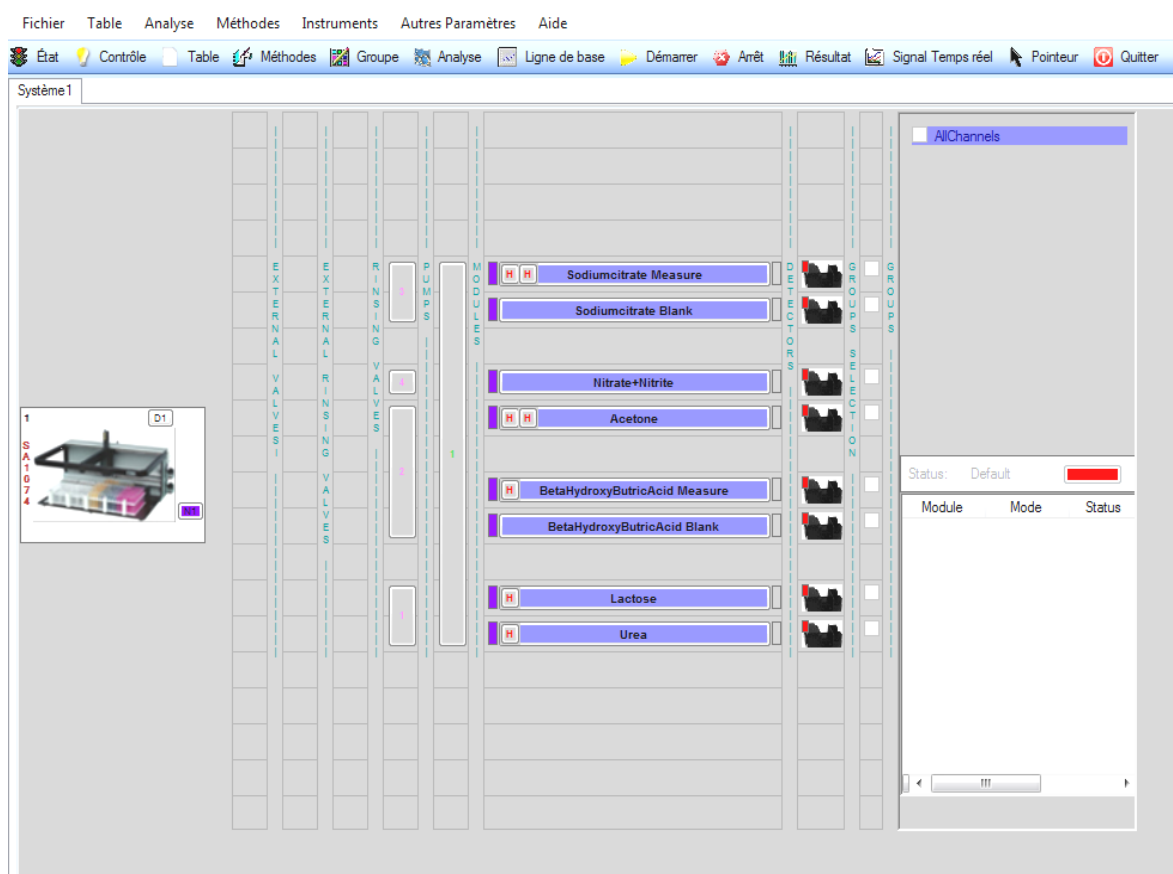


Figure n° 10: Tableau à partir duquel on va « commander » l'AFC.

### 2.2.3. La ligne de base

L'établissement de la ligne de base est obligatoire avant toute utilisation de l'AFC.

Comme son nom l'indique, elle permet d'obtenir une base de graphe parfaitement droite. La ligne de base permet de jouer un rôle de balise.

Si un problème quelconque (fuites, problème de membrane ou encore solution épuisée) survient lors des analyses, la base du graphe n'est plus droite. Il faut alors vérifier que l'appareillage est en mesure de faire les analyses.

Après l'allumage du programme et avant la Ligne de base, les tuyaux sont placés dans un récipient d'eau déminéralisée et dégazée.

Durant chaque analyse liée à l'AFC, l'eau utilisée est en effet déminéralisée et dégazée afin d'éviter les « fausses » bulles d'air pouvant affecter les résultats des graphes.

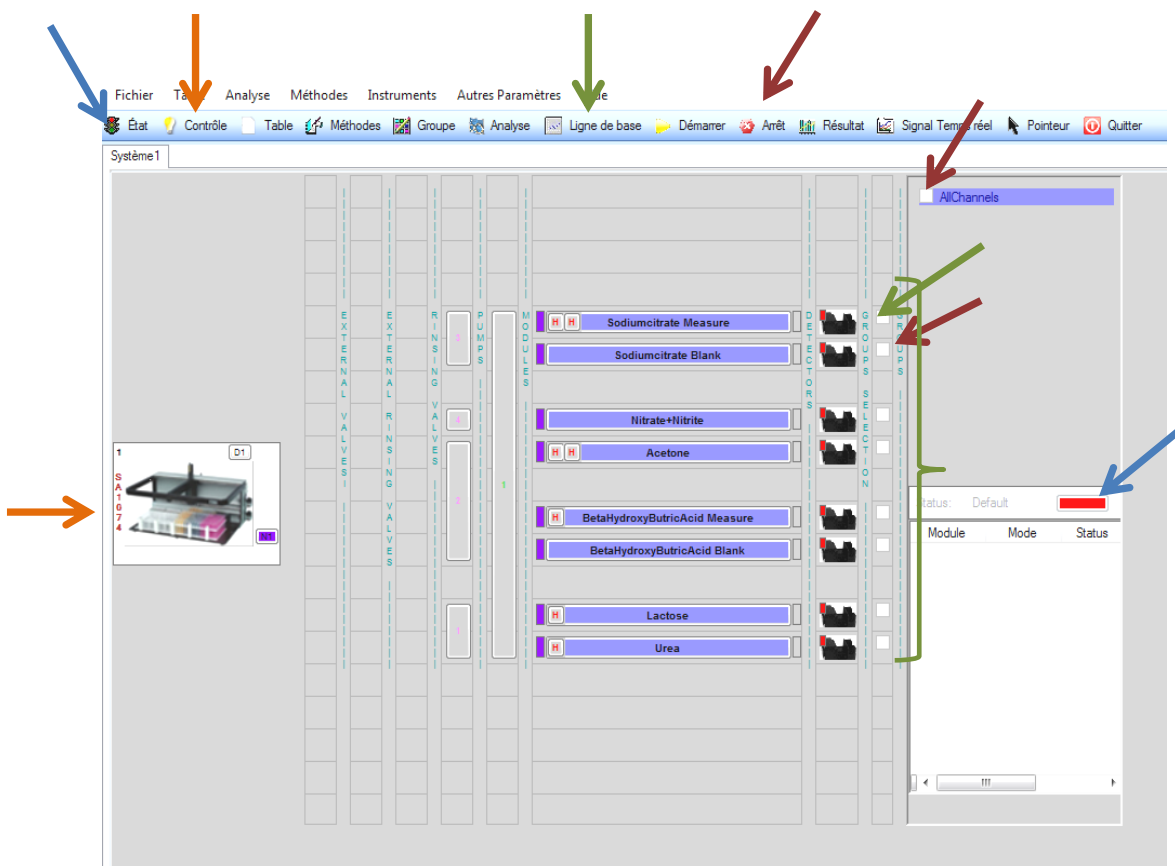


Figure n°11 : Tableau à partir duquel on va « commander » l'AFC avec explications des commandes principales.

Pour la ligne de base, les tuyaux sont placés dans les solutions correspondant aux analyses à mener sur l'échantillon.

Si des analyses ne sont pas effectuées, les tuyaux liés à ces analyses sont laissés dans un berlin d'eau.

Avant l'analyse, l'état de l'appareil est en Hors Ligne (symbolisé en rouge comme indiqué ci-dessus). Il faut ensuite mettre le programme « en ligne » en cliquant sur « Etat » en haut à gauche de la page. Le curseur deviendra alors vert (Figure n°11 : Flèches bleues).

Avant de lancer la ligne de base, il faut cliquer sur l'icône « Contrôle » et sur l'image de l'échantillonneur située à gauche de la page principale (Figure n°11 : Flèches oranges).

Une fenêtre s'ouvrira alors comme montré en Figure n°12 et on effectuera trois rinçages en cliquant sur l'icône « Rinçage » 3 fois avec intervalle soit le temps que l'aiguille aspire et l'eau et se vide (Figure n°12 : Flèche rouge).

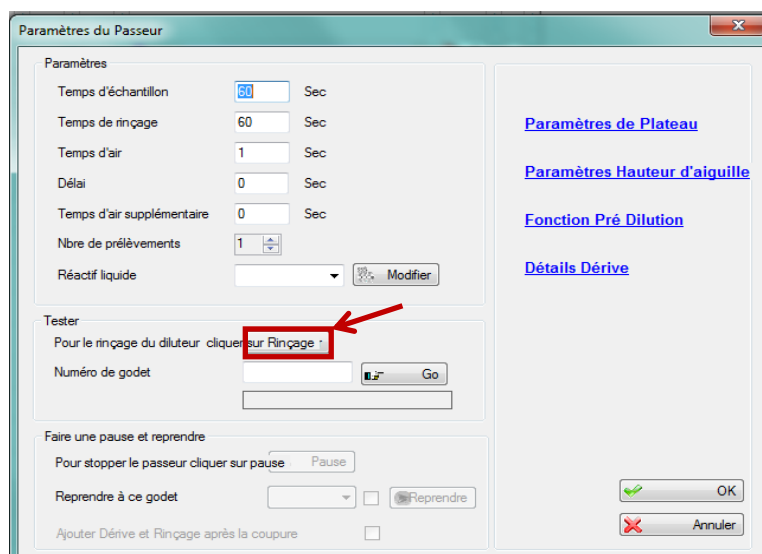


Figure n°12 : Tableau du programme informatique permettant de contrôler l'aiguille du dilueur.

Cette première étape consistera à faire passer dans les tuyaux de l'AFC les solutions de réactions afin de permettre d'avoir une base pour pouvoir mener nos analyses.

Cette opération est obligatoire pour détecter les éventuelles erreurs comme les fuites ou encore vérifier si tous les tuyaux sont correctement branchés et placés dans les bonnes solutions.

Pour lancer les lignes de base, on clique sur « ligne de base », on coche les analyses que l'on souhaite effectuer et on clique sur « démarrer ». L'icône « signal en temps réel » permet d'observer l'évolution du signal. (Figure n°11 : Flèches vertes)



Une fois que les lignes de bases sont stables (environ 25 minutes après le début de l'analyse), on peut arrêter l'opération. Les tolérances de la ligne de base sont respectivement de :

- ✚ 1,00 - 1,10 pour l'Urée
- ✚ 4,60 - 4,75 pour le Lactose
- ✚ 2,50 - 2,90 pour l'Acétone
- ✚ 1,35 - 2,00 pour les Nitrites-Nitrates
- ✚ 3,20 - 3,30 pour le BHBA (Valeur mesure) et 2,95 - 3,05 (Valeur blanc)
- ✚ 3,60 - 3,70 pour le Sodium Citrate (Valeur mesure) et 3,70 - 3,80 (Valeur blanc)

Pour arrêter les lignes de base lorsque celles-ci sont stables, on clique sur l'onglet « Arrêt » et on décoche les analyses effectuées ou on clique sur « All channels » un message d'arrêt s'affiche et on clique sur « oui ». (Figure n°11 : Flèches rouges)

### 2.2.4. La calibration

La première étape d'une calibration consiste à créer une table d'analyse, c'est-à-dire informer le programme sur le nombre d'échantillons que l'on va analyser et à quels emplacements ils se trouvent sur l'échantillonneur.

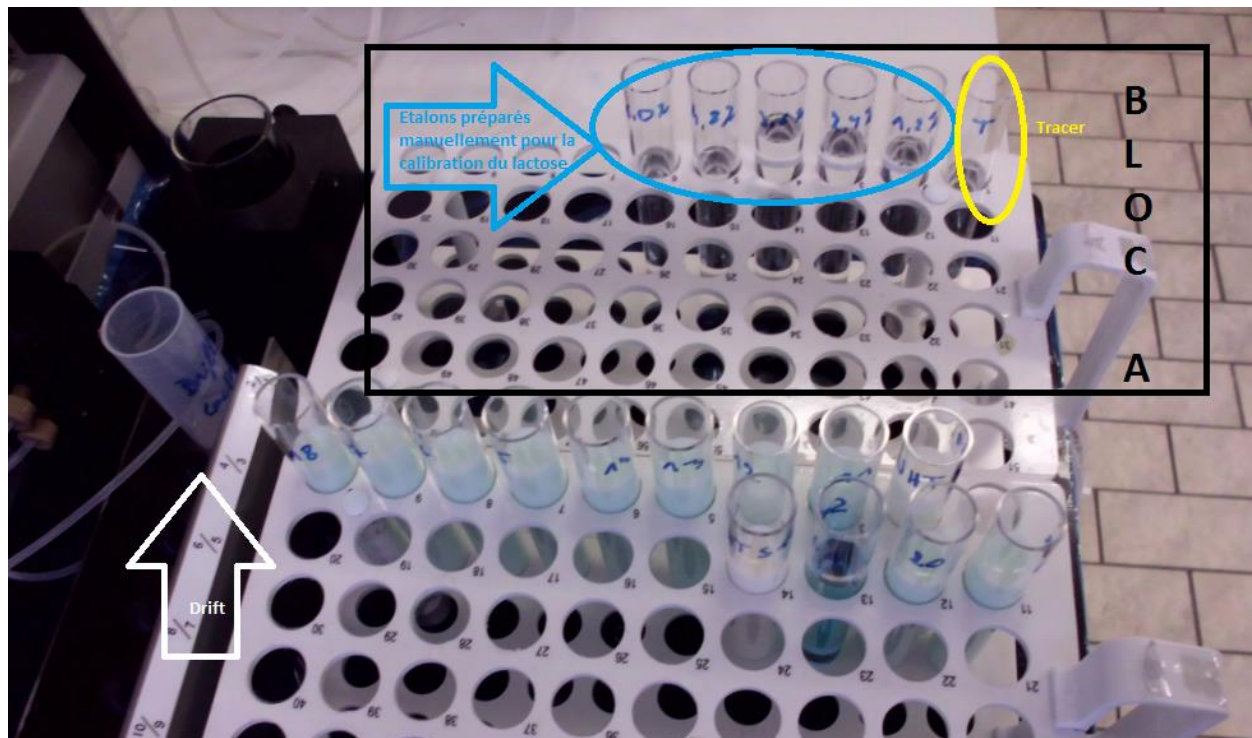


Figure n°13 : Echantillonneur lors d'une calibration au lactose.  
Le Tracer (ici en jaune) est positionné en « A1 » car il est en position « 1 » du Bloc A  
Les cinq tubes (voir flèche bleue) contenant les étalons préparés manuellement (1,2 à 6,0 %) sont placés de « A2 » à « A6 ».  
Le Drift (voir flèche blanche) est quant à lui placés en « ST1 ».

La seconde étape de la calibration est détaillée en annexe 7.

Troisième étape : les graphes de calibration apparaissent à l'écran.

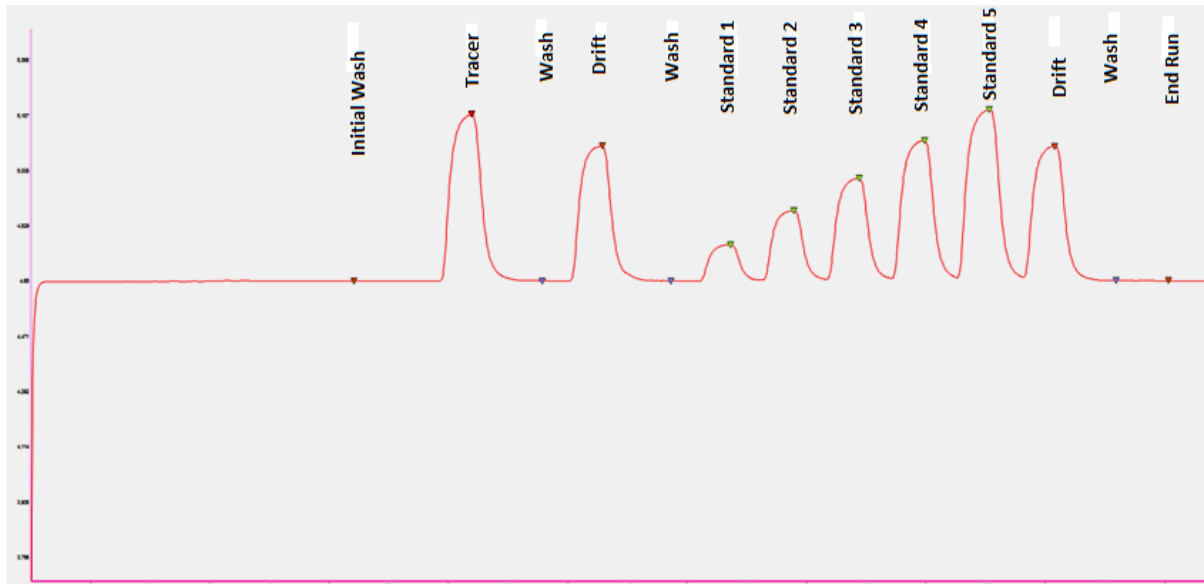


Figure n°14 : Voici le style d'un graphe d'une calibration au lactose.

Quatrième étape : les résultats de la calibration sont également traduits en tableaux chiffrés.

	NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Lactose- Results
1	1	0	IW	IW	InitialWash	-0,07
2	1	1	A1	T	Tracer	5,81
3	1	2	WT	W	Wash	-0,07
4	1	3	ST1	D	Drift	4,68
5	1	4	WT	W	Wash	-0,07
6	1	5	A2	S1	Standard1	1,20
7	1	6	A3	S2	Standard2	2,41
8	1	7	A4	S3	Standard3	3,54
9	1	8	A5	S4	Standard4	4,87
10	1	9	A6	S5	Standard5	5,97
11	1	10	ST1	D	Drift	4,67
12	1	11	WT	W	Wash	-0,07
13	1	12	E	E	EndRun	-0,07

Figure n°15 : En parallèle avec le graphique, voici un exemple de résultats chiffrés d'une calibration au lactose.

Je reviendrai plus en détails dans l'explication de ces tableaux au point 3 (Résultats et Discussion).

## 2.3. Sécurité

Pendant la manipulation de produits dangereux mais aussi lors de la vidange des bidons de récupérations, le technicien de laboratoire doit veiller à toujours porter sur lui son équipement de protection individuel (EPI) à savoir ses lunettes, son tablier et ses gants.

## 2.4. Rincages

### 2.4.1. Pour le nettoyage quotidien

En fin de journée, il convient de procéder au nettoyage des différents tuyaux de l'AFC afin d'y éviter l'assèchement des résidus de lait.

Il faut notamment rincer à l'eau durant 5 minutes

- + les tuyaux « de couleurs » (soit ceux qui ont acheminé les solutions vers l'analyseur)
- + mais aussi les tuyaux noirs (soit ceux qui ont véhiculé l'eau déminéralisée) en mode **EN LIGNE** (voyant vert sur PC).

Ensuite, on passe en mode **HORS LIGNE** (voyant rouge sur PC).

- + Si on a analysé moins de 20 échantillons dans la journée, il faut rincer les tuyaux dans lesquels les divers échantillons ont transité durant 20 min à l'acide chlorhydrique + 20 min à l'eau
- + Si on a analysé plus de 20 échantillons dans la journée, on rincera ces mêmes tuyaux durant 5 min à l'hypochlorite de Sodium + 5 min à l'eau + 20 min à l'acide chlorhydrique + 20 min à l'eau.

### 2.4.2. Pour le nettoyage avant une période d'arrêt

A la veille d'une période d'arrêt (veille de week-end ou congé), il convient d'assurer de la même manière les tuyaux « de couleurs » et les tuyaux noirs en mode **EN LIGNE** (voyant vert sur PC).

Ensuite, on passe en mode **HORS LIGNE** (voyant rouge sur PC) pour rincer l'AFC durant 10 min à l'hypochlorite de Sodium + 5 min à l'eau + 20 min à l'acide chlorhydrique + 20 min à l'eau.

Par ailleurs, l'aiguille servant au pompage des échantillons de lait subira un triple rinçage à l'acide chlorhydrique et à l'eau.

# 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Au cours de mon stage, de nombreux résultats ont été récoltés. Certains fiables d'autres moins. Voici les résultats des différentes analyses menées durant ce stage.

## 3.1. Dosage de l'urée

### 3.1.1. Calibration de l'urée

Voici un exemple de résultats obtenus à la suite d'une calibration de l'urée.

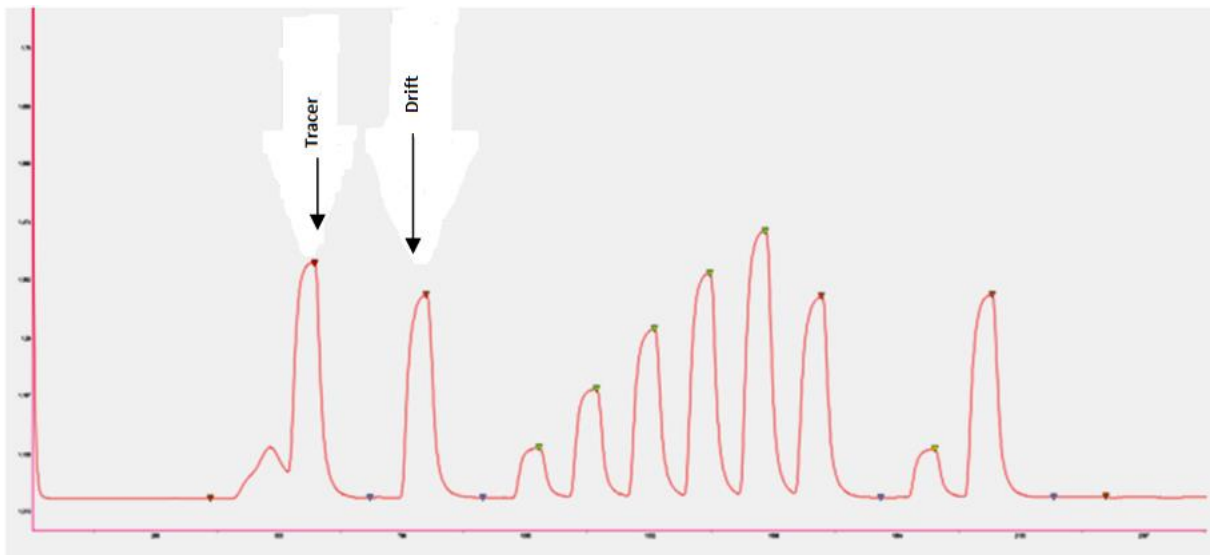


Figure n°16 : Signal de calibration de l'urée par AFC

Le graphe ci-dessus est obtenu par le programme informatique « Flow Access ». Il est utile afin de voir l'état général de la calibration.

Le sommet des différents pics est symbolisé par un triangle d'une couleur spécifique :

- Les oranges représentent les données du Drift,
- Les données du Tracer sont représentées par un triangle rouge,
- Les bleues pour les rinçages,
- Les jaunes pour les pics des standards.

Le Drift aura un rôle de « correcteur » de résultats par rapport à la ligne de base obtenue avant la calibration.

Le Tracer quant à lui, permettra de donner un pic maximal au graphe afin de voir la valeur maximale de l'analyse.

	NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Urea- Results
1	1	0	IW	IW	InitialWash	1,53
2	1	1	A1	T	Tracer	426,77
3	1	2	WT	W	Wash	1,53
4	1	3	ST2	D	Drift	368,16
5	1	4	WT	W	Wash	1,53
6	1	5	A2	S1	Standard1	93,40
7	1	6	A3	S2	Standard2	198,70
8	1	7	A4	S3	Standard3	310,36
9	1	8	A5	S4	Standard4	409,59
10	1	9	A6	S5	Standard5	487,95
11	1	10	ST2	D	Drift	365,54
12	1	11	WT	W	Wash	1,53
13	1	12	A2	U	Unknown	90,93
14	1	13	ST2	D	Drift	366,89
15	1	14	WT	W	Wash	1,53
16	1	15	ERI	ERI	EndRun	1,53

Figure n°17 : Tableau chiffré d'une calibration à l'urée

Associé au graphe, ce tableau de résultats fournit plus de précisions quant aux analyses (Figure n°17).

Les Standards s'établissent suivant la concentration la plus faible (100 ppm pour S1) jusqu'à la plus élevée (500 ppm pour S5). Les dilutions sont effectuées par l'AFC ce qui permet également de voir les valeurs du Drift (le plus proche possible de S4) et du Tracer (le plus proche possible de S5).

On aperçoit également des valeurs « Wash », il s'agit d'un rinçage entre les mesures qui sont sans incidence sur les résultats.

Enfin, un troisième tableau mettant en relation la surface des pics obtenus par graphique en fonction de la concentration de nos échantillons permet de vérifier la justesse des résultats d'analyse.

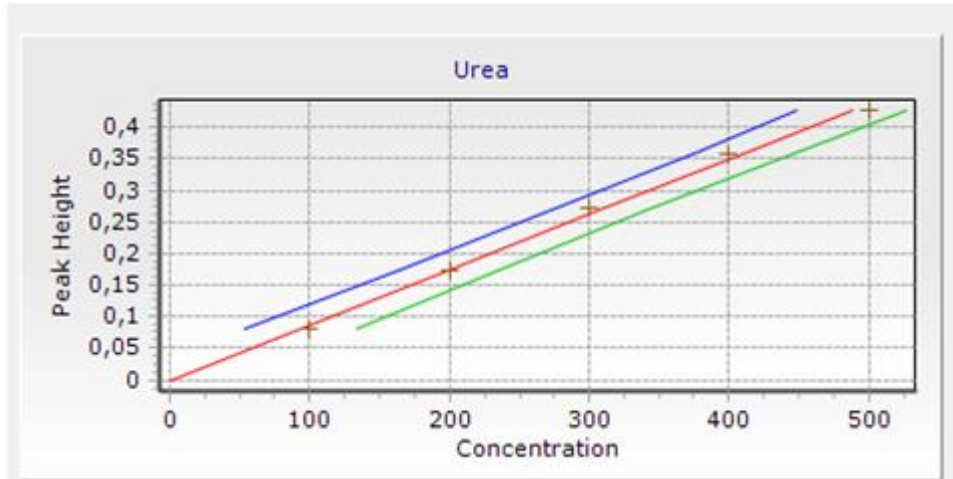


Figure n°18 : Tableau de l'évolution de la hauteur du pic en fonction de la concentration.

Pour ce tableau, plusieurs résultats accompagnaient le graphe. Par défaut, le programme affiche des résultats avec beaucoup de chiffres significatifs ainsi que des chiffres sans réel intérêt.

Je n'ai donc gardé que les données principales du graphe :

$$R^2 = 0,996$$

$$\text{ETR (Ecart type résiduel)} = 0,0087$$

Avec un tel écart type (0,0087) et un  $R^2$  supérieur à 0,998, on peut considérer que notre calibration est correcte.

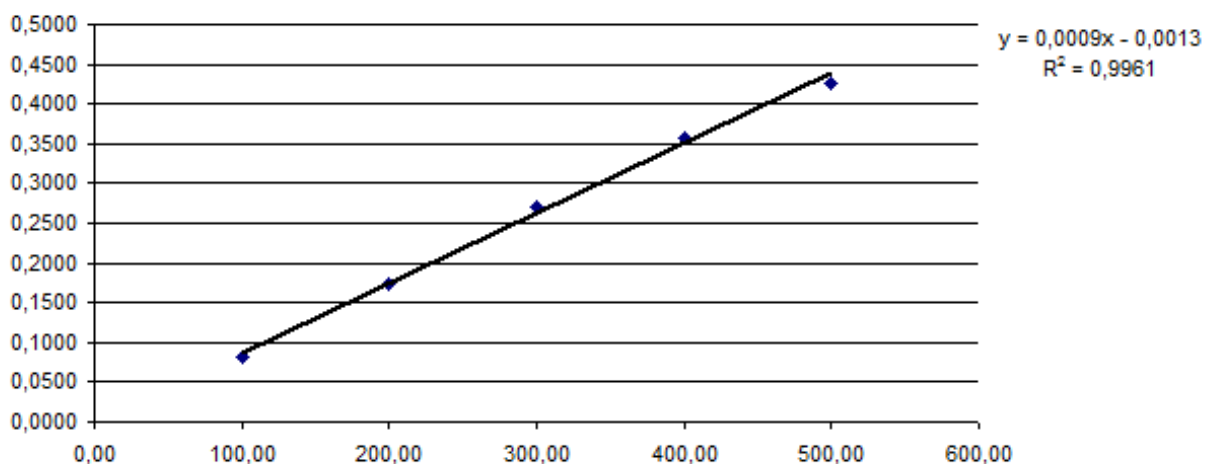


Figure n°19 : Tableau de l'évolution de la hauteur du pic en fonction de la concentration importé sur Excel.

Le tableau de résultats ci-dessus est l'importation de la calibration Urée sur Excel. Cette opération n'est pas indispensable lors de toutes les calibrations mais elle permet de comparer la valeur du  $R^2$  avec celle obtenue lors de la calibration en elle-même.

Le graphe créé sur Excel représente la hauteur du pic en fonction de la concentration d'urée en ppm.

En reprenant les valeurs de hauteurs de pics de 0,08 à 0,43 en ordonnée et de concentration standards de 100 à 500 en abscisse puis en y ajoutant une courbe de tendance, on remarque que la valeur de  $R^2$  est bien la même que celle obtenue par Flow Access.

Grâce à la fonction affichée sur le graphe on peut vérifier les valeurs réelles de concentration.

On remarque par exemple que, pour une hauteur de pic de 0,0807, on obtient une valeur Excel de 91,11 alors que cette dernière était de 93,40 par le logiciel de l'AFC.

Cette différence, ne portant pas à conséquence, est simplement due au fait que les valeurs obtenues par le programme informatique Flow Access sont affichées avec plusieurs chiffres décimaux alors que nous nous sommes contentés de 4 chiffres décimaux pour les valeurs «  $ax + b$  » par Excel (Figure n°19).

### 3.1.2. Analyse de l'urée

En se basant sur cette calibration, on va pouvoir réaliser nos analyses.

Les résultats développés ci-dessous font partie d'un lot nommé « 13 0214 » ; le « 13 » signifie qu'il s'agit du lot de la 13<sup>e</sup> semaine de l'année. Les 4 chiffres suivants représentent le code des échantillons.

Comme pour la calibration, les résultats d'analyses se présentent sur un graphique mettant en lumière des hauteurs de pics des différents laits en fonction du temps (Figure n°20).

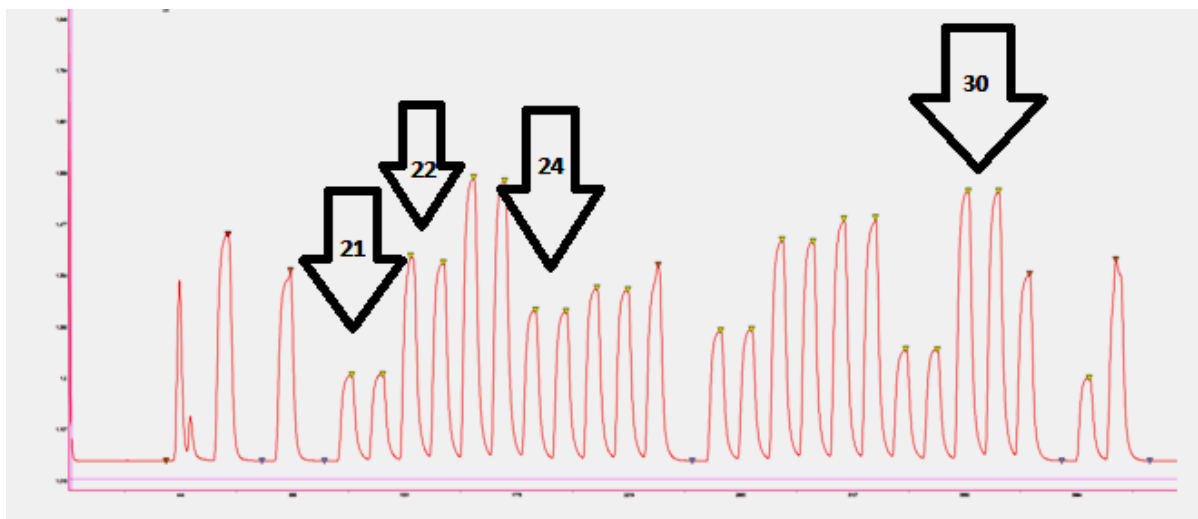


Figure n°20 : Graphe de l'analyse de l'urée des échantillons du lot « 13 0214 »

L'analyse de ces échantillons numérotés de 21 à 30, a été réalisée en double afin de mettre en évidence la répétabilité des résultats.

La répétabilité des résultats est la différence absolue que l'on obtient entre deux analyses obtenues avec la même méthode, par un seul et même technicien, au sein d'un même laboratoire, à partir d'un appareil identique, et ce durant un court intervalle de temps.

Cette différence absolue entre deux mêmes analyses ne pourra excéder, dans 5% des cas, les 15 mg.kg<sup>-1</sup> dans le cadre des analyses d'urée et 0,107 g/100 mL pour les analyses de lactose.

La reproductibilité est la différence absolue que l'on obtient entre deux analyses obtenues avec la même méthode, sur un même appareil, mais réalisées par différents techniciens, dans différents laboratoires. Dans le cas des analyses d'urée, cette différence ne pourra excéder, dans 5% des cas, les 50 ppm tandis qu'elle ne pourra excéder 0,113 g/mL pour le lactose.

Avec cette analyse en double pour laquelle nous aurons donc 2 X 10 échantillons, nous avons ajouté un échantillon de lait UHT S11 soit datant de la semaine 11 de l'année 2013.



### 3.1.3. Analyse des résultats

A la fin de l'analyse et en parallèle avec le graphe, les résultats suivants sont apparus :

Echantillons	R1 (ppm)	R2 (ppm)	Moyenne (ppm)	Différence (ppm)
21	180,11	181,48	180,80	1,37
22	409,91	396,40	403,16	-13,51
23	560,07	551,93	556,00	-8,14
24	302,36	299,64	301,00	-2,72
25	343,42	339,35	341,39	-4,07
26	262,76	265,83	264,30	3,07
27	439,45	438,39	438,92	-1,06
28	483,83	488,31	486,07	4,48
29	232,03	232,05	232,04	0,02
30	546,35	548,64	547,50	2,29

On remarque que la répétabilité des résultats est correcte (Les différences sont largement en dessous de 50 ppm).

Prenons pour exemple l'analyse de l'échantillon n°21 où l'on remarque une différence de 1,37 ppm d'Urée.

A souligner aussi l'excellente répétabilité de l'échantillon n°29 avec seulement 0,02 ppm d'écart.

A noter que le lait UHT comporte le taux d'urée le plus bas de la série. Avec 170 ppm, on peut considérer que le taux est faible.

A contrario, avec un résultat de plus de 550 ppm pour l'échantillon n°23, on classera ce lait comme présentant un fort taux d'urée.

## 3.2. Dosage du lactose

### 3.2.1 Calibration du lactose

Comme pour l'urée, la calibration du lactose nous fournira les résultats suivants :

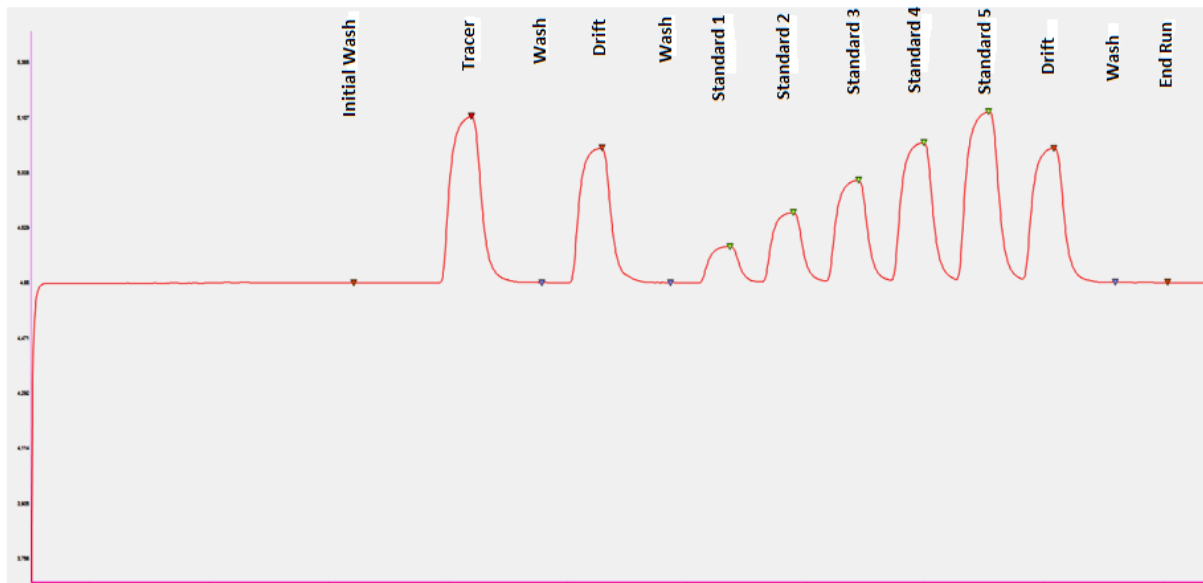


Figure n°21 : Signal de calibration du lactose obtenu par le logiciel de l'AFC

Le graphe nous montre bien les 5 pics des dilutions ainsi que les pics Drift et Tracer. On remarque aussi toute l'importance de la ligne de base réalisée avant la calibration. Elle est caractérisée par une base de graphe bien stable.

	NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Lactose- Results
1	1	0	IW	IW	InitialWash	-0,07
2	1	1	A1	T	Tracer	5,81
3	1	2	WT	W	Wash	-0,07
4	1	3	ST1	D	Drift	4,68
5	1	4	WT	W	Wash	-0,07
6	1	5	A2	S1	Standard 1	1,20
7	1	6	A3	S2	Standard2	2,41
8	1	7	A4	S3	Standard3	3,54
9	1	8	A5	S4	Standard4	4,87
10	1	9	A6	S5	Standard5	5,97
11	1	10	ST1	D	Drift	4,67
12	1	11	WT	W	Wash	-0,07
13	1	12	E	E	EndRun	-0,07

Figure n°22 : Tableau de résultats de la calibration en lactose.

Afin d'avoir une meilleure calibration lactose, les dilutions ont été réalisées manuellement. Ceci n'est valable que pour le lactose.

Les standards s'étendent de 1,2 % pour le standard n°1 jusque 6,0 % pour le standard n°5 en augmentant par palier de 1,2 %.

On remarque sur ce tableau de résultats (Figure n°22) que les données de calibration sont correctes puisque les données obtenues par Flow Access après calibration sont fort proches des valeurs demandées.

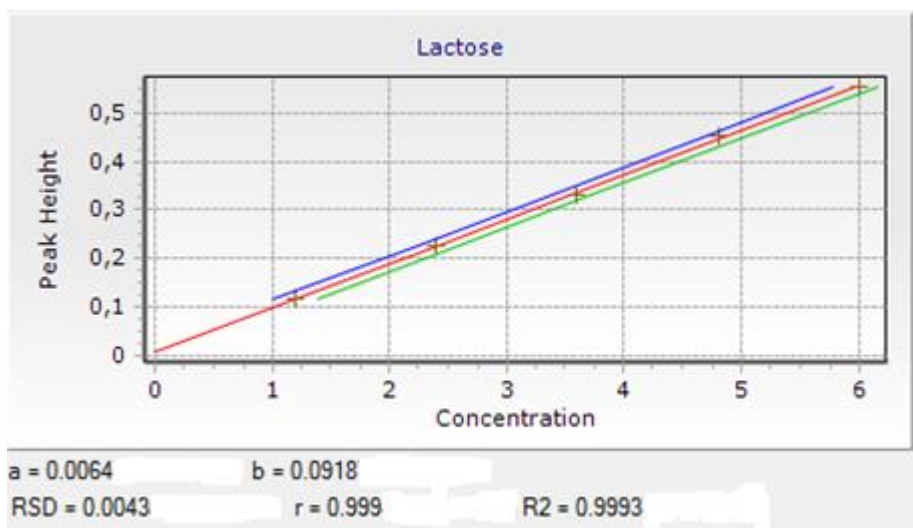


Figure n°23 : Tableau de l'évolution de la surface du pic en fonction de la concentration formant la droite de calibration du lactose.

Comme expliqué pour l'urée, la droite de calibration fourni également des résultats (Figure n°23). Ces résultats étant livrés avec plus de 10 décimales, je n'ai gardé que les premiers chiffres significatifs.

Le programme exprime la concentration en fonction de la hauteur du pic selon l'équation  $y = bx + a$ .

On aura donc comme équation :

$$[\text{Lactose}] = (0,0918 \cdot \text{Hauteur pic}) + 0,0064.$$

(b)            (x)            (a)

Le RSD ou ETR est l'écart type résiduel (ici de 0,0043).

Le  $r^2$  étant de 0,9993, les données sont donc jugées correctes.

### 3.2.2. Analyse du lactose

En reprenant cette calibration correcte, on va pouvoir réaliser une analyse lactose dans un lait quelconque.

Les résultats développés ci-dessous font partie d'un lot nommé « 13 0214 » ; le « 13 » signifie qu'il s'agit du lot de la 13<sup>e</sup> semaine de l'année. Les 4 chiffres suivants représentent le code des échantillons.

Comme pour la calibration, les résultats d'analyses se présentent sur un graphique mettant en lumière des hauteurs de pics des différents laits en fonction du temps (Figure n°24).

L'analyse a été une nouvelle fois réalisée en double afin de vérifier la répétabilité des résultats obtenus.

### 3.2.3. Analyse des résultats

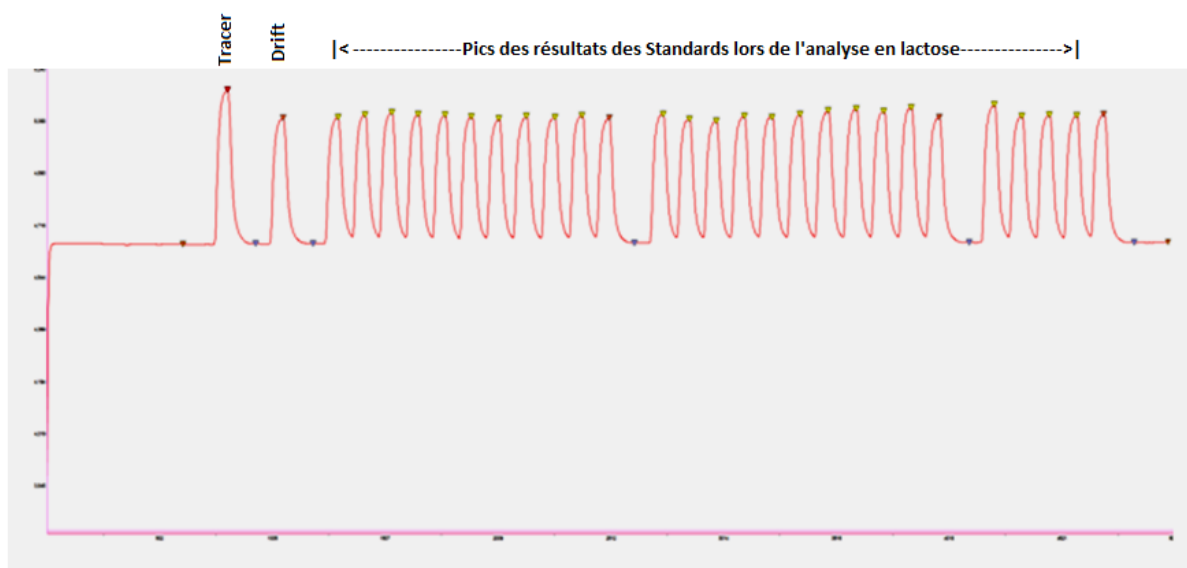


Figure n°24 : Graphe de l'analyse en lactose du lot « dq 13 0214 »

	NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Lactose- Results
1	1	0	IW	IW	InitialWash	-0,10
2	1	1	A1	T	Tracer	6,16
3	1	2	WT	W	Wash	-0,10
4	1	3	ST1	D	Drift	5,00
5	1	4	WT	W	Wash	-0,10
6	1	5	A2	U	UHT S11	5,04
7	1	6	A3	U	11	5,14
8	1	7	A3	U	11	5,23
9	1	8	A4	U	12	5,15
10	1	9	A4	U	12	5,12
11	1	10	A5	U	13	5,05
12	1	11	A5	U	13	4,98
13	1	12	A6	U	14	5,07
14	1	13	A6	U	14	5,02
15	1	14	A7	U	15	5,10
16	1	15	ST1	D	Drift	4,98
17	1	16	WT	W	Wash	-0,10
18	1	17	A7	U	15	5,15
19	1	18	A8	U	16	4,96
20	1	19	A8	U	16	4,88
21	1	20	A9	U	17	5,06
22	1	21	A9	U	17	5,02
23	1	22	A10	U	18	5,14
24	1	23	A10	U	18	5,28
25	1	24	A11	U	19	5,35
26	1	25	A11	U	19	5,25
27	1	26	A12	U	20	5,41
28	1	27	ST1	D	Drift	4,99
29	1	28	WT	W	Wash	-0,10
30	1	29	A12	U	20	5,47
31	1	30	A13	U	Sol LA	4,99
32	1	31	A13	U	Sol LA	5,03
33	1	32	A14	U	UHT S11	4,98
34	1	33	ST1	D	Drift	5,11
35	1	34	WT	W	Wash	-0,10
36	1	35	E	E	EndRun	-0,10

Figure n°25 : Résultats obtenu par le logiciel de l'AFC suite à l'analyse du lot.

On remarque une répétabilité des résultats correcte.

Prenons pour exemple l'analyse de l'échantillon n°12 où l'on remarque une différence de seulement 0,03% de lactose.

Le lait UHT placé en premier et en dernier dans l'analyse comporte un taux de lactose relativement proche également l'un de l'autre et comportant une valeur d'environ 5%, ce qui est parfaitement normal pour un lait UHT (Figure n°25).

### 3.3. Nouvelle analyse de lait

Cette analyse de lait a été réalisée à partir de trois laits différents :

- ✚ un lait de référence (ASTA)
- ✚ un échantillon étalon hebdomadaire (S 10)
- ✚ un lait stérilisé par UHT de chez « Campina »

J'ai programmé l'AFC afin qu'il analyse en double chaque échantillon afin de mettre en évidence la répétabilité des résultats.

Le lait nommé « ASTA » est un lait luxembourgeois qu'une entreprise a demandé d'analyser.

Le lait S10 est un échantillon hebdomadaire conservé au CRA-W. Le S10 signifie qu'il s'agit de l'échantillon de la 10<sup>e</sup> semaine de l'année 2013.

Enfin le lait UHT est un lait qui a été stérilisé dans l'entreprise « Campina » pour le CRA-W.

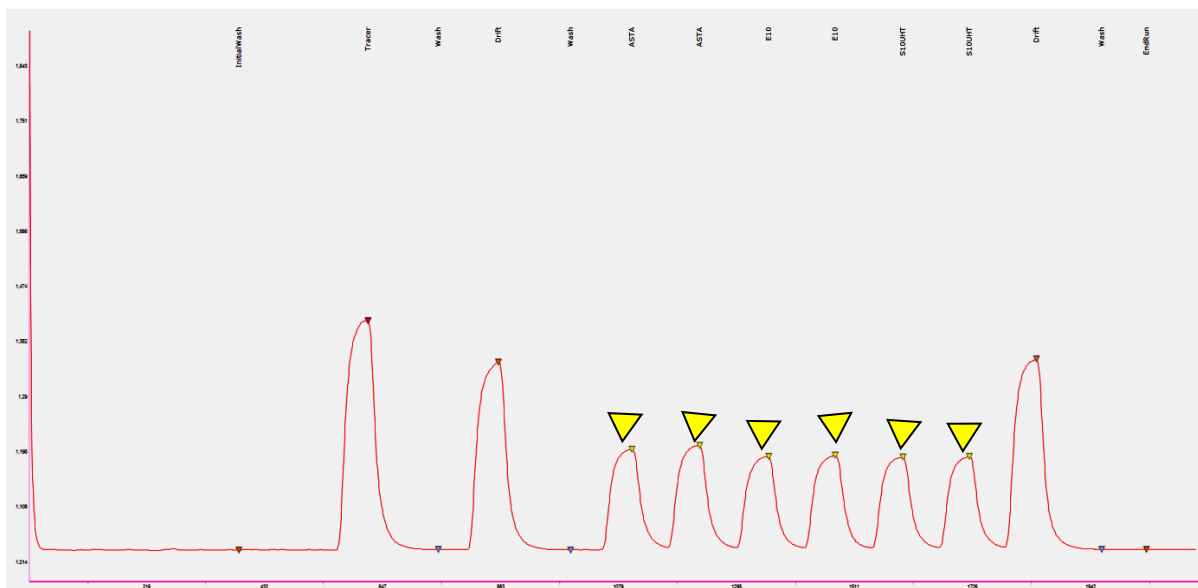


Figure n°26 : Graphe de l'analyse avec 6 pics d'analyse (triangles jaunes).

Sur ce graphique mettant en relation la hauteur du pic en fonction du temps, on remarque au premier coup d'œil que la concentration en urée des 6 échantillons est relativement proche malgré le fait que nous utilisons trois laits différents.

On aperçoit ensuite une certaine répétabilité au niveau des échantillons. En d'autres termes, les hauteurs de pics au sein d'un même lait sont peu éloignées les unes des autres.

Les données chiffrées permettent d'affiner cette constatation :

	NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Urea- Results
1	1	0	IW	IW	InitialWash	0,89
2	1	1	A1	T	Tracer	460,99
3	1	2	WT	W	Wash	0,89
4	1	3	ST1	D	Drift	378,32
5	1	4	WT	W	Wash	0,89
6	1	5	A2	U	ASTA	202,45
7	1	6	A2	U	ASTA	209,89
8	1	7	A3	U	E10	186,47
9	1	8	A3	U	E10	188,58
10	1	9	A4	U	S10UHT	184,65
11	1	10	A4	U	S10UHT	185,64
12	1	11	ST1	D	Drift	383,67
13	1	12	WT	W	Wash	0,89
14	1	13	E	E	EndRun	0,89

Figure n°27 : Tableau de résultats

Les chiffres de ce tableau sont très parlants et confirment ce que nous avons pu remarquer sur le graphe, à savoir une très bonne répétabilité de résultats pour les 3 laits différents puisque nous avons une différence à peine supérieure à 2 ppm pour l'étalon S10 ainsi que pour l'UHT.

Cette différence est un peu plus élevée pour l'échantillon ASTA mais reste tout à fait dans les normes.

Un seul point a surtout attiré l'attention lors de cette analyse : si les échantillons placés en positions A3 et A4 comportent une concentration uréique proche de 185 ppm, les valeurs pour le lait ASTA sont bien plus élevées (Figure n°27).

Il s'avère que cette observation a été signalée à plusieurs reprises et uniquement pour le lait ASTA.

En effet, ce lait de référence, en provenance du Grand Duché de Luxembourg, est acheminé au CRA-W avec un conservateur de couleur jaune.

Sachant que les analyses réalisées utilisent des réactions colorimétriques, il n'est pas impossible que les valeurs AFC soient influencées par la couleur du conservateur.

## 3.4. Analyse commune

### 3.4.1 Calibration commune

Après avoir vu un exemple de calibration et d'analyse d'urée et lactose, il est utile de préciser que des calibrations communes sont également possibles.

Dans ce cas, plusieurs graphes apparaîtront pour chaque analyse, comme montré ci-dessous.

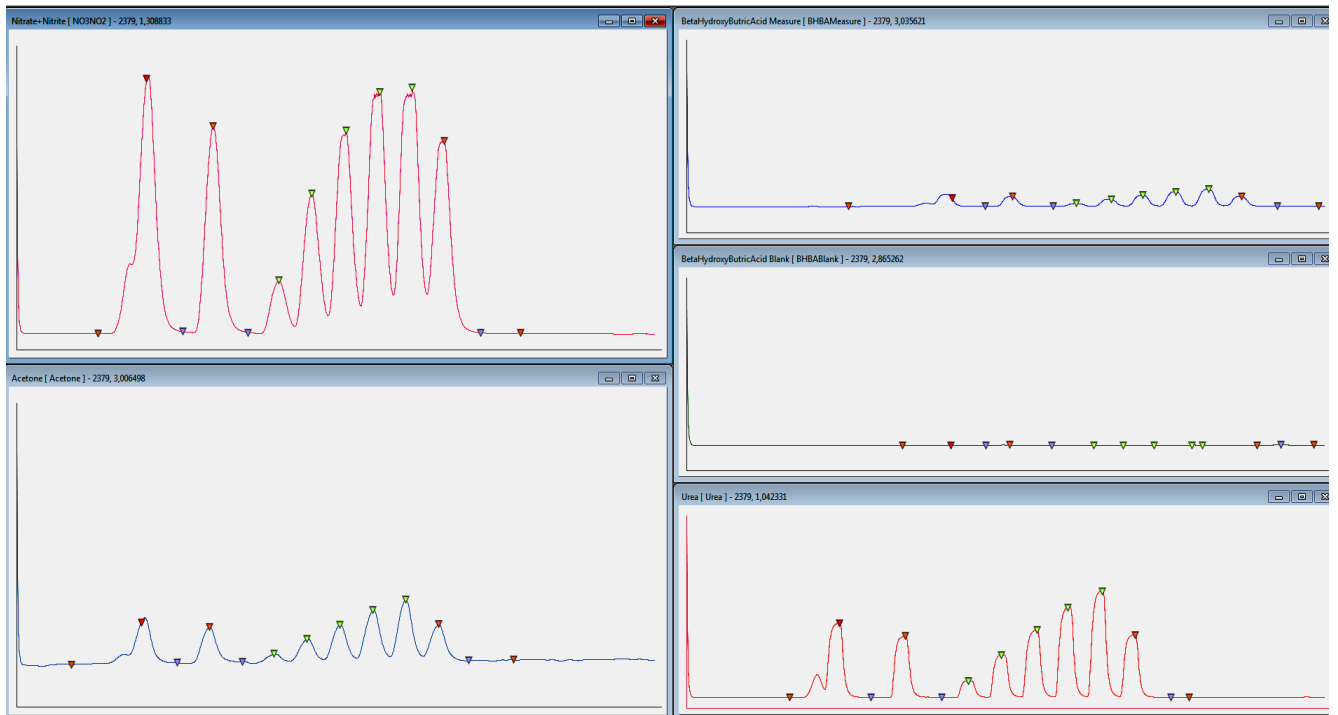


Figure n°28 : Exemple de graphes de calibration commune  
En haut à gauche : Nitrites-nitrates,  
En bas à gauche : Acétone  
Sur la droite de haut en bas : BHBA, BHBA (Blanc) et urée.

Cette calibration a été réalisée afin d'analyser 2 laits différents : un lait de référence ASTA et un lait étalon S11 soit celui de la 11<sup>e</sup> semaine.

La calibration a donc été réalisée sur l'urée, l'acétone, les nitrites-nitrates et le BHBA mais pas sur le lactose pour lequel la calibration est toujours réalisée à part.

A la lecture de ce graphique, on peut déduire que les calibrations sont correctes bien que celle des nitrites-nitrates présenterait un léger défaut de ligne de base.

Les chiffres de la calibration commune apparaissent dans un tableau de résultats (Figure n°29).



NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Urea- Results	BetaHydroxyButyricAcid Blank- Results	BetaHydroxyButyricAcid Measure- Results	Acetone- Results	Nitrate+Nitrite- Results
1	1	0 IW	IW	InitialWash	14,07	0,00	0,03	0,06	-0,10
2	1	1 A1	T	Tracer	347,14	0,00	0,74	0,69	0,87
3	1	2 WT	W	Wash	14,07	0,00	0,03	0,06	-0,10
4	1	3 ST1	D	Drift	289,53	0,00	0,85	0,60	0,68
5	1	4 WT	W	Wash	14,07	0,00	0,03	0,06	-0,10
6	1	5 A2	S1	Standard1	87,95	0,00	0,26	0,18	0,10
7	1	6 A3	S2	Standard2	203,52	0,00	0,61	0,40	0,44
8	1	7 A4	S3	Standard3	312,35	0,00	0,94	0,61	0,70
9	1	8 A5	S4	Standard4	412,96	0,00	1,24	0,83	0,86
10	1	9 A6	S5	Standard5	483,22	0,00	1,45	0,97	0,89
11	1	10 ST1	D	Drift	295,41	0,00	0,88	0,62	0,63
12	1	11 WT	W	Wash	14,07	0,00	0,03	0,06	-0,10
13	1	12 E	E	EndRun	14,07	0,00	0,03	0,06	-0,10

Figure n°29 : Voici le tableau de chiffres de la calibration commune.

### 3.4.2. Analyse

Comme pour la calibration, les résultats d'analyse commune apparaissent sous forme de graphes (Figure n°30). On remarque que les échantillons comportent peu de Nitrite-Nitrates ainsi que du BHBA ; ceci étant préférable.

On peut également voir une mauvaise ligne de base pour l'analyse en acétone (problème expliqué ultérieurement).

Enfin le graphe du lactose ayant connu un problème en début d'analyse semble donner 4 pics corrects.

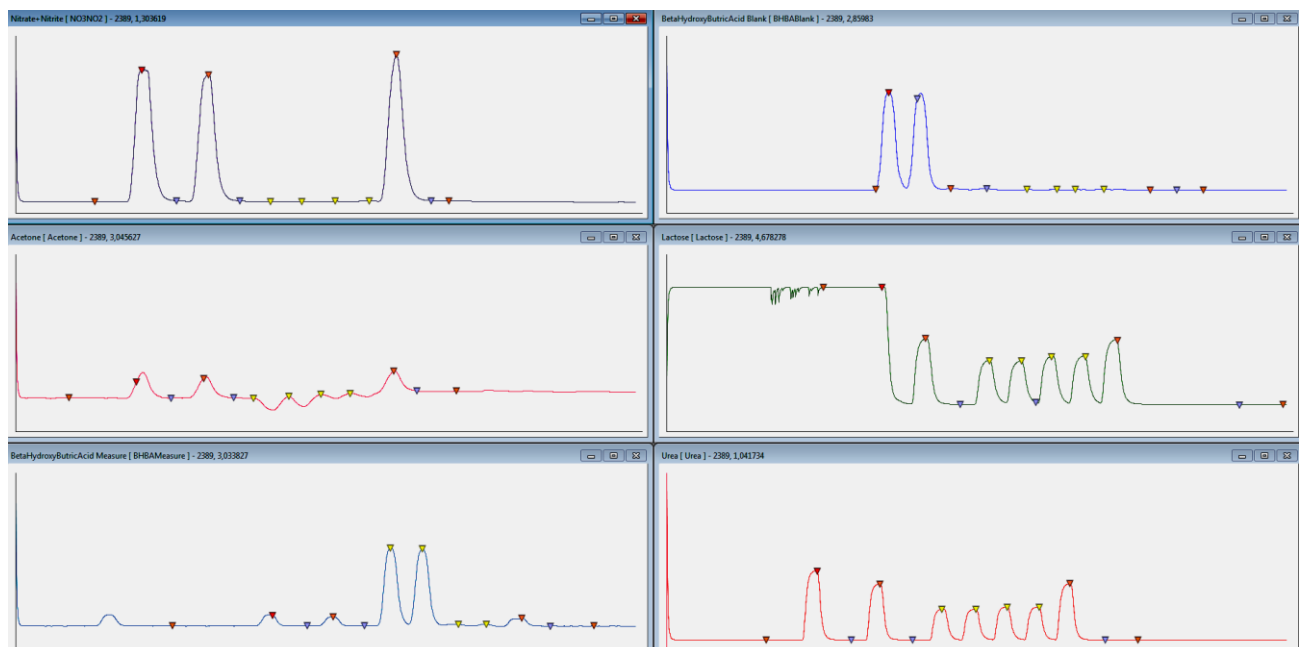


Figure n°30 : Ensemble des graphes des différentes analyses.  
 Sur la gauche de haut en bas : Nitrites-nitrates, Acétone, BHBA (mesure)  
 Sur la droite de haut en bas : BHBA, Lactose et urée.

Au point de vue des résultats chiffrés, les analyses des deux laits présentent une répétabilité très bonne (Figure n°31).

Le lait ASTA présente néanmoins un taux de lactose assez bas. Il faut savoir que ce lait est conservé avec un colorant jaunâtre pouvant éventuellement influencer les résultats d'analyses (Problème analysé en 3.7).

NeedleNumber	ResultID	Position	Sample Type	SampleIdentity	Urea- Results	Lactose- Results	BetaHydroxyButricAcid Blank- Results	BetaHydroxyButricAcid Measure- Results	Acetone- Results	Nitrate+Nitrite- Results
1	1	0 IW	IW	InitialWash	9.87	-0.10	0.00	0.03	0.06	-0.10
2	1	1 A1	T	Tracer	318.67	6.11	0.00	1.04	0.49	0.61
3	1	2 WT	W	Wash	9.87	-0.10	0.00	0.03	0.06	-0.10
4	1	3 ST1	D	Drift	262.74	6.78	0.00	0.88	0.60	0.58
5	1	4 WT	W	Wash	9.87	-0.10	0.00	0.03	0.06	-0.10
6	1	5 A2	U	ASTA 1	149.13	4.42	0.00	7.36	0.01	-0.11
7	1	6 A2	U	ASTA 2	149.47	4.43	0.00	7.28	0.03	-0.11
8	1	7 A3	U	S11 1	158.63	4.97	0.00	0.22	0.06	-0.11
9	1	8 A3	U	S11 2	158.11	5.02	0.00	0.18	0.06	-0.10
10	1	9 ST1	D	Drift	263.46	6.67	0.00	0.76	0.65	0.69
11	1	10 WT	W	Wash	9.87	-0.10	0.00	0.03	0.06	-0.10
12	1	11 E	E	EndRun	9.87	-0.10	0.00	0.03	0.06	-0.10

Figure n°31 : Résultats de l'analyse sous forme de chiffres.

### 3.5. L'analyse de l'acétone

Un problème a été détecté à plusieurs reprises au niveau des analyses de l'acétone. Voici les différentes étapes menées au laboratoire afin de palier ce défaut.

- a) Analyse UHT S13 en double : on remarque que le graphe comporte des pics négatifs...

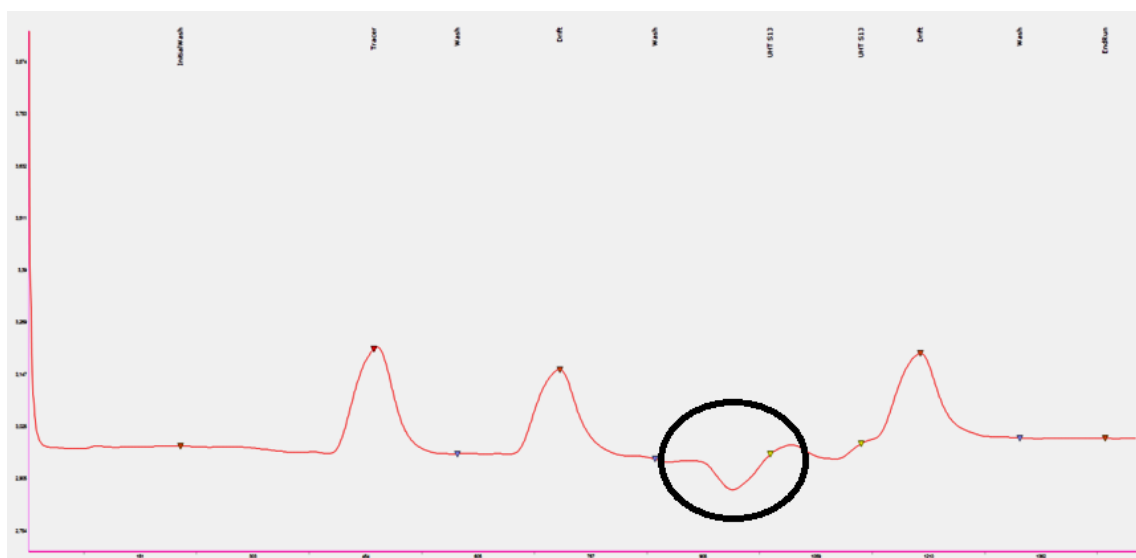


Figure n°32 : Le graphe montre clairement un problème au niveau de la ligne de base.

Le problème pourrait venir de la ligne de base. En effet, étant donné que le graphe de la calibration n'a pas de base correcte, cette hypothèse est la plus probable.

En vérifiant la ligne de base, on remarque que celle-ci est parfaite et donc qu'aucun problème n'est à signaler.

La deuxième hypothèse probable pourrait être un problème au niveau des tuyaux. C'est pourquoi un rinçage intensif à l'acide chlorhydrique puis à l'eau suivi d'un rinçage au niveau des tuyaux de la seringue a été réalisé.

b) Une nouvelle analyse sur 2 échantillons UHT a donc été réalisée...

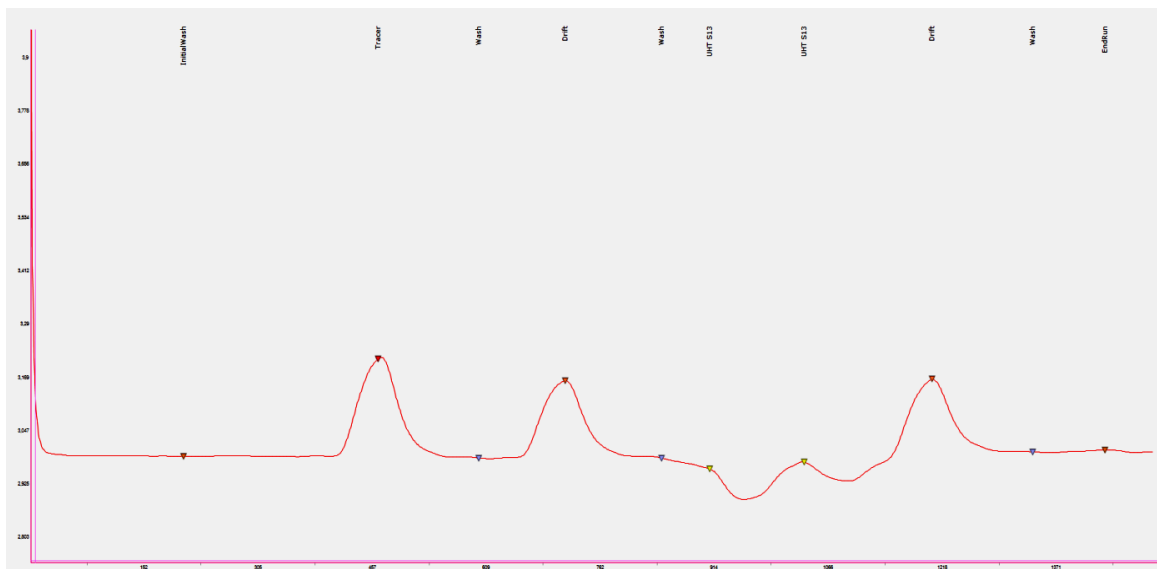


Figure n°33 : Le constat est clair : le problème subsiste toujours comme en démontre le graphe et les chiffres sont encore moins bons que l'essai n°1.

c) N'ayant aucune réelle idée de l'origine de ce problème, un nouveau test a été mené dans un tube à essai avec 10 mL UHT S13 dans lequel j'ai ajouté 1,25 mL Acétone 4 mM.

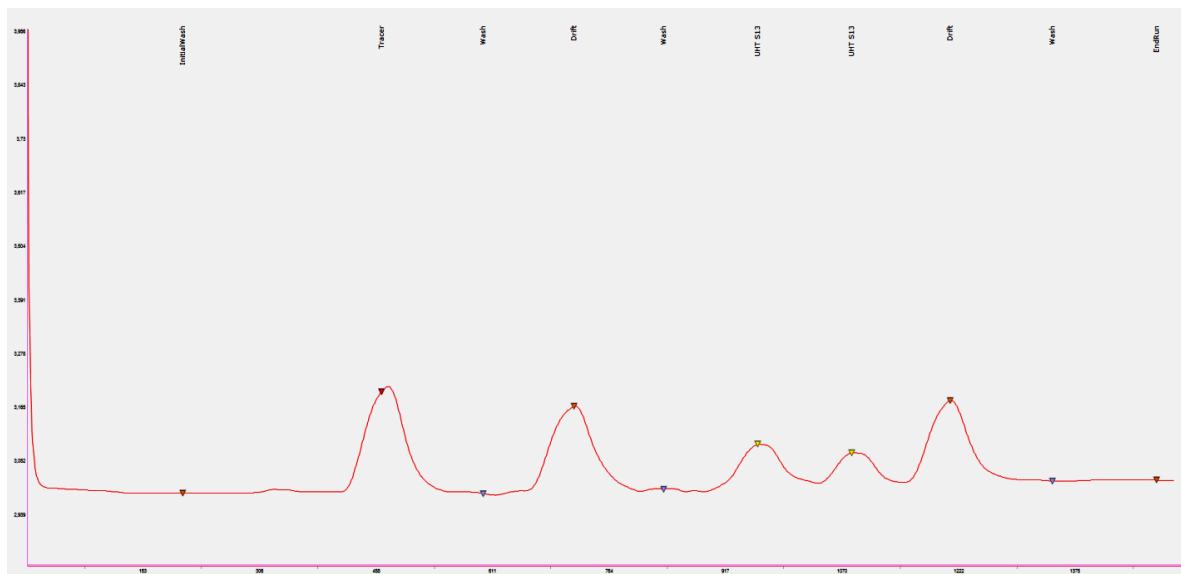


Figure n°34 : Le graphe semble à première vue avoir une meilleure allure mais, lors de l'analyse de l'UHT S13, on remarque que le niveau de la ligne de base n'est pas le même qu'en tout début d'analyse.

Les résultats obtenus sont peu répétables puisque après calcul on remarque une marge d'erreur relative de 20,34% soit beaucoup trop importante.

Avec les divers rinçages et ces 3 analyses effectuées, nous n'avons pas été en mesure de trouver la cause de ces pics négatifs. Un technicien a donc été appelé afin d'examiner ce problème.

#### d) Visite du technicien AFC

Quelques jours plus tard, après la visite du technicien AFC, il a été conclu que le problème concernant l'acétone était apparemment un souci au niveau de la membrane. Il semblerait que la membrane de l'acétone fasse partie d'un mauvais lot en provenance de l'industrie. Ce défaut de fabrication serait la cause de la détérioration trop rapide de la membrane expliquant donc la présence des pics négatifs.

Voici une calibration commune réalisée après le changement de la membrane de l'acétone ou on observe directement une meilleure allure du graphe de calibration (Figure n°35).

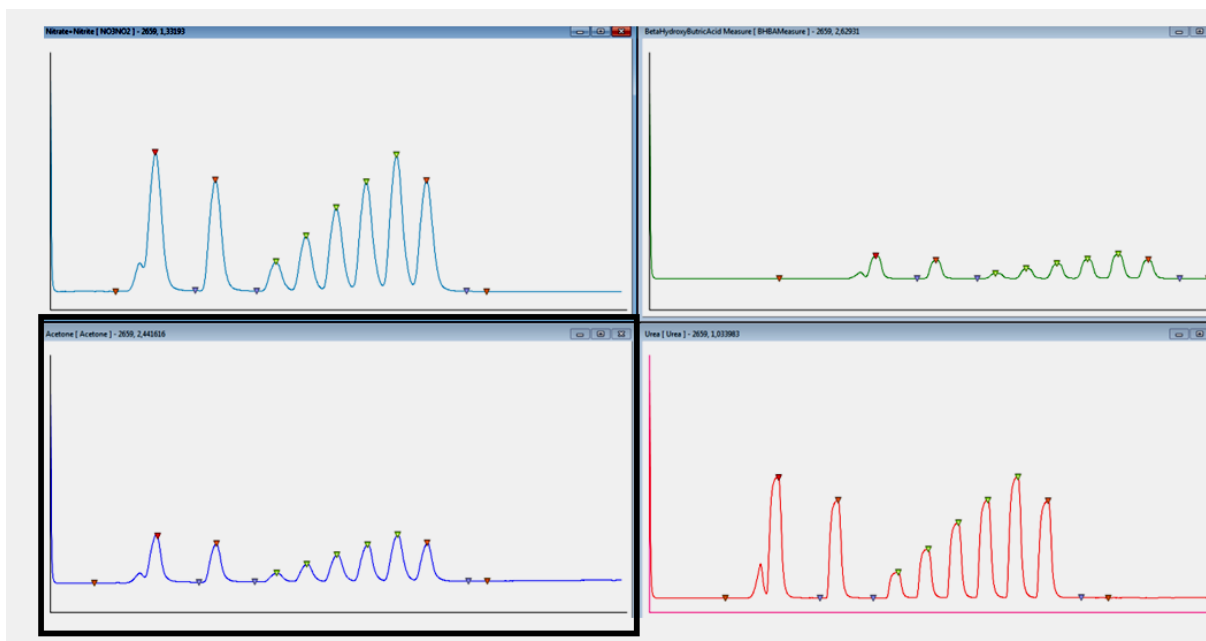


Figure n°35 : Etat du graphe lors d'une calibration commune après visite du technicien.  
Amélioration au niveau de la ligne de base de l'acétone.

e) Conclusion et mesure à prendre.

Ce problème résultait donc d'un problème de qualité de membrane.

Il apparait en effet que la membrane de l'acétone, d'aspect différent par rapport aux autres membranes de l'AFC, soit plus fragile ou en tout cas plus rapidement usée.

Il conviendrait dès lors de remplacer cette membrane toutes les deux semaines, voire toutes les semaines si plusieurs analyses d'acétone sont réalisées.

## 3.6. Etude de l'influence du conservateur sur les résultats

Les mesures effectuées par l'analyseur à flux continu sont des mesures de type colorimétrique soit variables en fonction de différentes longueurs d'ondes. Cependant, certains clients utilisent des conservateurs et des colorants afin de maintenir le lait stable avant que ce dernier soit analysé par l'AFC.

Lors de l'analyse de résultats, il n'a pas été rare d'obtenir des résultats interpellants avec ces échantillons « colorés » provenant de clients.

L'expérience réalisée ici a donc permis de voir si les conservateurs et colorants placés dans les échantillons de lait avaient réellement une influence sur les résultats.

Pour cela, j'ai travaillé sur du lait cru et frais.

L'analyse s'est déroulée en trois étapes :

- 1 : Analyse lait cru (5X)
- 2 : Analyse lait cru + 200  $\mu\text{L}$  de conservateur (5X) (Sans Colorant)
- 3 : Analyse lait cru + 200  $\mu\text{L}$  de conservateur + 20  $\mu\text{L}$  de Bleu de Bromothymol (5X)

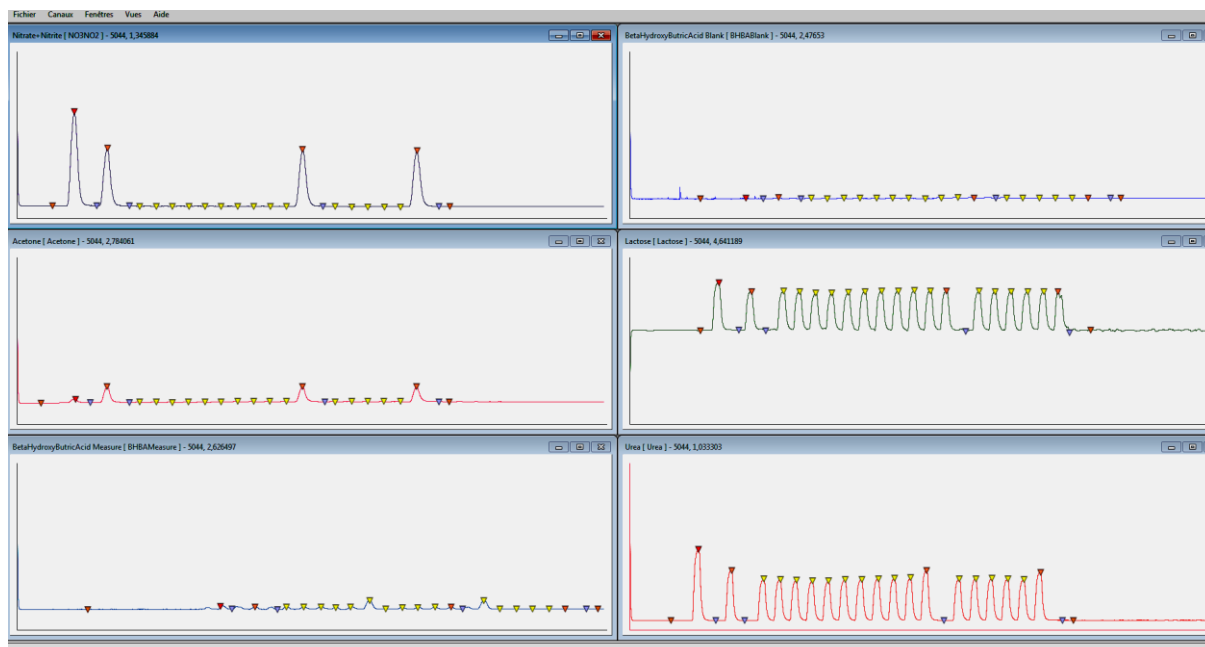


Figure n°39 : Graphe de l'analyse commune.

A première vue, l'ensemble des graphiques ne nous montre rien de réellement interpellant.

Tous les résultats sont repris dans le programme Flow Acces, comme pour chaque analyse, sous forme de tableau comme affiché ci-dessous (Figure n°40).  
 Pour plus de clareté, nous avons analysé les résultats pour l'urée uniquement (Figure n°41).

NeedleNumber	ResultID	Position	SampleType	SampleIdentity	Urea- Results	Lactose- Results	BetaHydroxyButricAcid Blank- Results	BetaHydroxyButricAcid Measure- Results	Acetone- Results	Nitrate+Nitrite- Results
1	1	0 IW	IW	InitialWash	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01
2	1	1 ST2	T	Tracer	483.89	5.37	0.00	252.64	0.19	1.08
3	1	2 WT	W	Wash	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01
4	1	3 ST1	D	Drift	339.29	4.37	0.00	202.97	0.69	0.65
5	1	4 WT	W	Wash	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01
6	1	5 ST3	U	Lait cru	281.57	4.45	0.00	218.33	0.06	-0.02
7	1	6 ST3	U	Lait cru	280.43	4.40	0.00	208.93	0.07	-0.02
8	1	7 ST3	U	Lait cru	272.91	4.25	0.00	251.67	0.05	-0.02
9	1	8 ST3	U	Lait cru	269.03	4.21	0.00	198.36	0.06	-0.02
10	1	9 ST3	U	Lait cru	269.39	4.25	0.00	203.98	0.07	-0.02
11	1	10 ST4	U	Lait+200µL cons.	276.82	4.37	0.00	1024.33	0.07	-0.02
12	1	11 ST4	U	Lait+200µL cons.	277.74	4.38	0.00	-10.19	0.09	-0.02
13	1	12 ST4	U	Lait+200µL cons.	283.81	4.43	0.00	194.89	0.08	-0.02
14	1	13 ST4	U	Lait+200µL cons.	288.48	4.46	0.00	190.40	0.07	-0.02
15	1	14 ST4	U	Lait+200µL cons.	289.19	4.39	0.00	211.00	0.08	-0.02
16	1	15 ST1	D	Drift	338.24	4.52	0.00	147.05	0.67	0.64
17	1	16 WT	W	Wash	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01
18	1	17 ST5	U	Lait+c+20µL Bleu	285.42	4.37	0.00	842.69	0.06	-0.02
19	1	18 ST5	U	Lait+c+20µL Bleu	286.78	4.36	0.00	-34.56	0.07	-0.02
20	1	19 ST5	U	Lait+c+20µL Bleu	290.52	4.37	0.00	-38.51	0.06	-0.02
21	1	20 ST5	U	Lait+c+20µL Bleu	288.67	4.37	0.00	-45.23	0.06	-0.02
22	1	21 ST5	U	Lait+c+20µL Bleu	284.87	4.34	0.00	-38.12	0.07	-0.02
23	1	22 ST1	D	Drift	326.15	4.55	0.00	-33.77	0.65	0.63
24	1	23 WT	W	Wash	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01
25	1	24 E	E	EndRun	-1.93	-0.09	0.00	-34.95	0.06	-0.01

Figure n°40 : Ensemble des données chiffrées de l'analyse

	A	B
1	Lait cru	281,43
2	Lait cru	280,21
3	Lait cru	272,62
4	Lait cru	268,69
5	Lait cru	268,97
6	Lait+200µL cons.	276,31
7	Lait+200µL cons.	277,17
8	Lait+200µL cons.	283,15
9	Lait+200µL cons.	287,74
10	Lait+200µL cons.	288,37
11	Lait+c+20µL Bleu	284,53
12	Lait+c+20µL Bleu	285,89
13	Lait+c+20µL Bleu	289,62
14	Lait+c+20µL Bleu	287,77
15	Lait+c+20µL Bleu	283,99
16		
17	moy lait cru	274,38
18	ET lait cru	6,09
19		
20	moy lait cons	282,55
21	ET lait cons	5,68
22		
23	moy lait cons et bleu	286,36
24	ET lait cons et bleu	2,33
25		
26	moy générale	281,10
27	ET général	6,94

Le tableau ci-contre représente les valeurs d'analyse d'urée pour le lait cru (1 à 5), les valeurs du mélange lait + 200 µL de conservateur (6 à 10) et enfin celles du mélange lait + conservateur + 20 µL bleu de Bromothymol (11 à 15).

Si les chiffres ne sont pas encore réellement parlants avec ces 15 premières mesures, on remarque néanmoins, une fois les moyennes effectuées, une augmentation de la concentration en urée lors de chaque opération et la diminution de l'écart type.

Figure n°41 : Résultats de l'analyse en urée (en ppm) converti en tableau Excel pour le calcul des moyennes.

Pour analyser ces résultats, j'ai utilisé le test de Student. Ce test est basé sur un principe de calcul de statistique permettant de comparer des moyennes.

### 3.6.1. Lait cru VS Lait cru + 200 µL conservateur.

La première série de données que j'ai analysées mettait en comparaison les concentrations en urée du lait cru avec le lait auquel j'ai ajouté 200 µL de conservateur.

conservateur seul							
	Lait Cru	Lait+200µL cons.	Différence				
	281,43	276,31	-5,12	Somme des différences	40,81		
	280,21	277,17	-3,04	Moyenne des différences	8,162		
	272,62	283,15	10,53	Somme des carrés des différences	885,212		
	268,69	287,74	19,05	Somme des carrés des écarts	877,0495	P	
	268,97	288,37	19,39	Valeurs critiques Test de Student	1,2325	0,195	
				Degré de liberté	4		
				Probabilité	0,05		
				Valeur t (Table de Student)	2,776	2,776	

La valeur T calculée est inférieure à la valeur T de la table de Student pour un seuil de confiance de 0,05. Donc, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs.  
 Probabilité associée au test T est de 0,20 > 0,05, d'où pas de différence significative.

Figure n°42 : Comparaison entre résultats lait cru et lait avec 200 µL de conservateur.

Au final, tous ces calculs ont permis de démontrer que la valeur du test de Student obtenue par calcul (1,2325) était inférieure à la valeur T trouvée dans la Table (2,776) pour un seuil de confiance de 0,05 et que la probabilité associée au test T est plus élevée (0,195) que ce même seuil de confiance (0,05) (Figure n°42).

Ces résultats nous permettent donc de prouver que le conservateur ajouté au lait n'a pas d'influence significative sur les résultats obtenus par l'AFC lors des analyses.

### 3.6.2. Lait cru VS lait cru + conservateur + colorant.

La deuxième série de données voyait la comparaison entre les concentrations en urée du lait cru avec le lait auquel j'ai ajouté 200 µL de conservateur mais également du colorant.

conservateur avec colorant							
	Lait Cru	Lait+C+20µL Bleu	Différence				
	281,43	284,53	3,1	Somme des différences	59,88		
	280,21	285,89	5,68	Moyenne des différences	11,976		
	272,62	289,62	17	Somme des carrés des différences	920,519		
	268,69	287,77	19,08	Somme des carrés des écarts	203,396	P	
	268,97	283,99	15,02	Valeurs critiques Test de Student	3,7554	0,020	
				Degré de liberté	4		
				Probabilité	0,05		
				Valeur t (Table de Student)	2,776	2,776	

La valeur T calculée est supérieure à la valeur T de la table de Student pour un seuil de confiance de 0,05. Donc, il y a une différence significative entre les valeurs.  
 Probabilité associée au test T est de 0,02 < 0,05, d'où différence significative.

Figure n°43 : Comparaison entre résultats lait cru et lait avec 200 µL de conservateur + 20 µL Bleu de Bromothymol.



Avant d'analyser les résultats, on peut déjà s'interroger en voyant les différences toutes nettement positives pour concentration en urée.

Par calcul, on obtient une valeur de 3,7554 pour le test de Student contre 2,776 pour la valeur présente dans la table. La valeur T calculée étant supérieur à la valeur T de la table de Student pour un seuil de confiance de 0,05 ; on peut dire qu'il y a bien une différence notable entre les moyennes.

Par ailleurs, la probabilité associée au test T (0,020) est inférieure au seuil de confiance (0,05) d'où une différence significative.

Le conservateur avec le colorant a donc bien une influence sur les résultats d'analyse.

### 3.6.3. Lait cru + 200 µL conservateur VS lait cru + conservateur + colorant.

Enfin, une analyse comparative entre le lait cru auquel a été ajouté 200 µL de conservateur avec le lait dans lequel, en plus du conservateur, on a ajouté le colorant bleu, permet d'observer aucune différence significative entre les valeurs. (Figure n°44)

conservateur avec colorant + conservateur							
	Lait+200µL cons.	Lait+C+20µL Bleu	Différence		Somme des différences	19,06	
	276,31	284,53	8,22		Moyenne des différences	3,812	
	277,17	285,89	8,72		Somme des carrés des différences	204,653	
	283,15	289,62	6,47		Somme des carrés des écarts	131,996	P
	287,74	287,77	0,03		Valeurs critiques Test de Student	1,4838	0,212
	288,37	283,99	-4,38		Degré de liberté	4	
					Probabilité	0,05	
					Valeur t (Table de Student)	2,776	

La valeur T calculée est inférieure à la valeur T de la table de Student pour un seuil de confiance de 0,05. Donc, il n'y a pas de différence significative entre les valeurs.  
 Probabilité associée au test T est de 0,212 > 0,05, d'où pas de différence significative.

Figure n°44 : Comparaison entre résultats lait + 200 µL de conservateur et lait avec 200 µL de conservateur + 20 µL Bleu de Bromothymol.

### 3.7. Résultats des analyses

Le tableau repris en annexe n°8 reprend l'ensemble des analyses effectuées dans le cadre de ce travail. Il n'a cependant pas toujours été possible d'avoir l'ensemble des déterminations sur tous les échantillons.

Lors des analyses, les mesures ont été effectuées en double et leur cohérence a été vérifiée.

	Urée (ppm)	Lactose (%)	BHBA (mmol)	Acétone (mmol)
Moyenne	316,6	4,3	223,6	0,10
Ecart type	145,1	1,3	203,6	0,06
Min	149,3	0,8	0,2	0,02
Max	812,9	6,9	695,4	0,30

Tableau 3.7.1 : Tableau reprenant la moyenne, l'écart type ainsi que les valeurs extrêmes de chaque composé pour l'ensemble des analyses. On y remarque notamment les grandes différences entre les valeurs extrêmes (Min vs Max).

A partir des résultats obtenus sur 16 échantillons (Tableau 3.7.2) pour lesquels les quatre analytes (urée, lactose, BHBA et acétone) étaient disponibles, nous avons pu étudier les corrélations entre les différents paramètres.

	ppm Urée	% Lactose	mmol BHBA	mmol Acétone
ech01	149,3	4,43	7,32	0,02
ech02	158,4	5,00	0,20	0,06
ech27	812,9	4,32	79,16	0,10
ech29	333,0	3,31	183,28	0,07
ech30	265,2	1,00	647,55	0,09
ech31	210,9	4,96	47,72	0,06
ech32	465,1	4,57	70,86	0,08
ech33	164,3	4,27	176,47	0,12
ech34	238,5	2,39	202,75	0,08
ech35	367,4	3,61	208,61	0,15
ech36	561,8	4,21	472,75	0,30
ech37	253,1	4,34	90,71	0,12
ech38	200,2	4,02	133,22	0,13
ech39	292,6	3,13	397,16	0,08
ech40	470,2	0,76	695,44	0,12
ech41	325,1	4,05	136,50	0,13

Tableau 3.7.2 : Tableau des résultats obtenus sur 16 échantillons.

En regard du tableau 3.7.3 ci-dessous, seule une corrélation (R) particulièrement élevée se dégage. Une corrélation négative est observée entre le BHBA et le lactose. (Coefficient de corrélation  $R = -0,85$  ou  $R^2 = 0,726$ ).

	Urée	Lactose	BHBA
Urée	-		
Lactose	-0,08	-	
BHBA	0,23	-0,85	-
Acétone	0,41	-0,01	0,40

Tableau 3.7.3 : Matrice de corrélation R

Avec un  $R^2$  de 0,726, on peut dire également que nous avons un pourcentage d'explication relativement fiable de 72,6%.

En reprenant les valeurs du BHBA en fonction des valeurs du lactose, on obtient alors le graphe suivant :

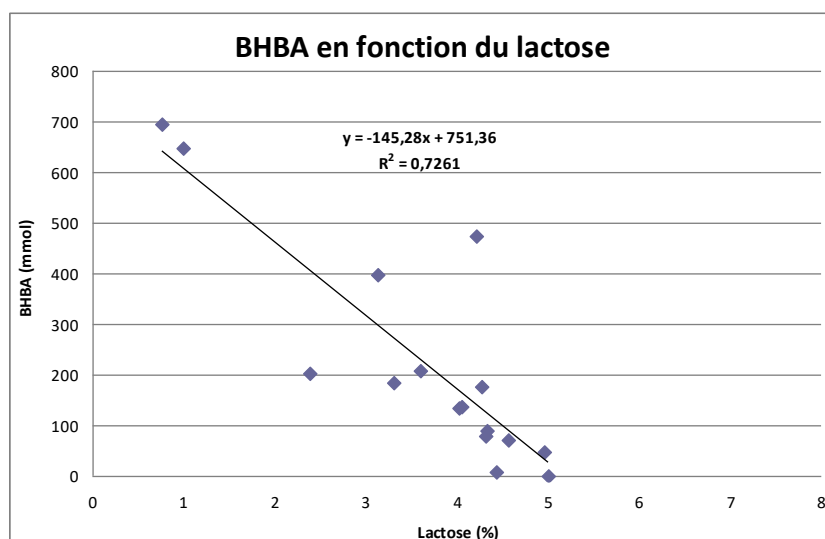


Figure 3.7.1 : Evolution de la teneur des échantillons en BHBA en fonction du lactose.

Ce graphe montre qu'à une teneur élevée en BHBA, correspond une teneur plus faible en lactose. Aucune autre corrélation significative n'est observée indiquant une indépendance entre les critères étudiés.

### 3.7.1. l'urée (Annexe n°9)

En ce qui concerne le dosage de l'urée, un coefficient de variation entre double de 0,79% a été observé ce qui est supérieur à la valeur du certificat délivré pour le dosage de l'urée (CV = 0,42%) (Annexe n°10) mais qui reste cependant acceptable vu que nos résultats résultent de doubles réels alors que le CV du certificat est établi sur un seul échantillon en conditions idéales. (Tableau 3.7.4).

	Urée
Nombre échantillons	36
Moyenne (ppm)	308,6
Ecart type (ppm)	150,5
CV (%)	0,79

Tableau 3.7.4 : Tableau reprenant le nombre d'échantillon, la moyenne et l'écart type pour cette analyse.

Sur un total de 36 échantillons, la plupart de ceux-ci sont répartis dans les classes 101-200, 201-300 et 301-400 ppm. 11% des échantillons présentent des teneurs supérieures à 500 ppm.  
(Tableau 3.7.4).

Classes	Fréquence	%
100	0	0,0
200	8	22,2
300	12	33,3
400	7	19,4
500	5	13,9
ou plus...	4	11,1
	36	100

Tableau 3.7.5 : Tableau reprenant les fréquences et les pourcentages des échantillons en analysés pour l'urée.

Le graphe issu de ce tableau montre bien que la majorité des échantillons comporte des valeurs se situant entre 200 et 300 ppm (Figure 3.7.2)

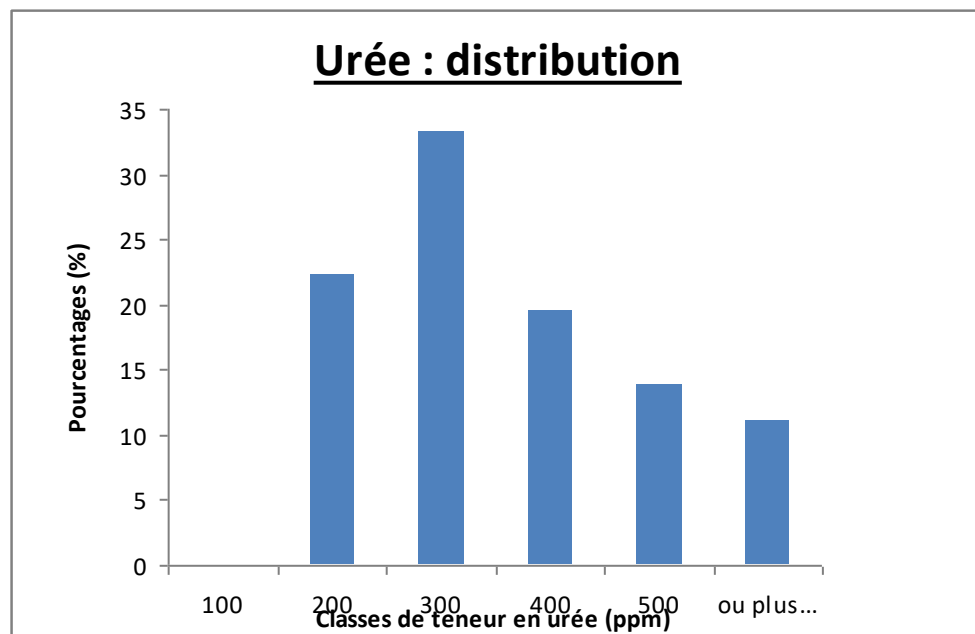


Figure 3.7.2 : Histogramme de la répartition en pourcentages des échantillons en fonction des classes de teneur en urée. Aucun échantillon ne comporte de valeurs comprises entre 0 et 100 ppm tandis que plus de 30% se situent entre 200 et 300 ppm.

### 3.7.2. le lactose(Annexe n°11)

Pour ce qui est du lactose, un coefficient de variation de 2,60 % a été observé alors que le certificat de l'appareil annonce un CV de 0,87%.

Ceci tient essentiellement à deux échantillons dont les doubles sont très différents.

Pour l'échantillon n°40, les valeurs sont fort faibles. Une faible différence entre double peut se traduire par un coefficient de variation plus élevé.  
 Pour ce qui est de l'échantillon n°28, les doubles sont trop différents et l'analyse devrait être refaite.

	Résultats	CV
Nombre	27 échantillons	--
Moyenne	4,2 %	0,67 %
Ecart type	1,2 %	--

Tableau 3.7.6 : Tableau reprenant le nombre d'échantillon, la moyenne et l'écart type pour cette analyse.

Si on écarte ces deux échantillons, le CV est alors de 0,67% ce qui correspond mieux au certificat de l'appareil (CV = 0,87%).

Classes	Fréquence	%
1	2	7,4
2	0	0,0
3	1	3,7
4	3	11,1
5	11	40,7
ou plus...	10	37,0
	27	100

Tableau 3.7.7 : Tableau reprenant les fréquences et les pourcentages des échantillons en analysés pour le lactose.

Sous forme de graphe, on s'aperçoit en effet qu'une grande majorité des échantillons comporte une teneur en lactose comprise entre 4 et 5% voir plus de 5% (Figure 3.7.3).

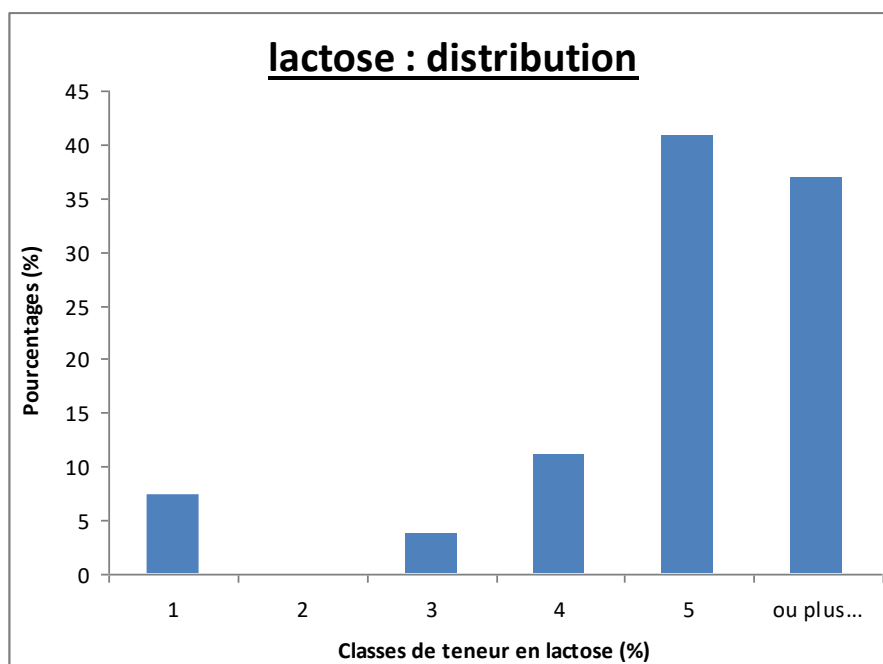


Figure 3.7.3 : Histogramme de la répartition en pourcentages des échantillons en fonction des classes de teneur en lactose. Aucun échantillon ne comporte une teneur en lactose se situant

entre 1 et 2% alors que plus de 40% des échantillons comporte une teneur en lactose entre 4 et 5%.

### 3.7.3. le BHBA(Annexe n°12)

Pour l'analyse du BHBA, un coefficient de variation de 2,1% est observé entre les doubles.

Le certificat établi pour cette analyse prévoit un CV de 0,61% (Annexe n°9).

<i>Classes</i>	<i>Fréquence</i>	
100	6	35,3
200	4	23,5
300	3	17,6
400	1	5,9
500	1	5,9
ou plus...	2	11,8
	17	100

Tableau 3.7.8 : Tableau reprenant les fréquences et les pourcentages des échantillons en analysés pour le BHBA.

Pour trois échantillons, la différence entre les doubles est élevée. Si ces échantillons sont écartés, le CV serait alors ramené à 1,3%.

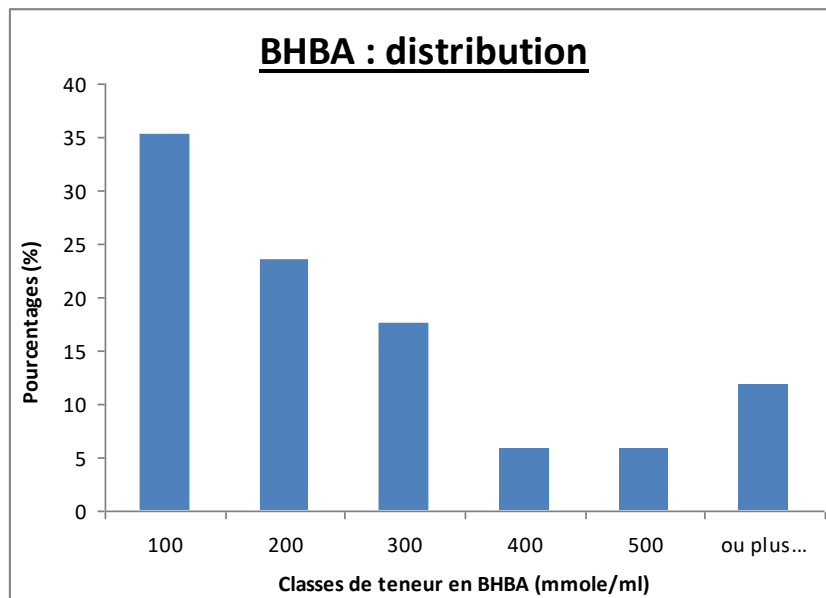


Figure 3.7.4 : Histogramme de la répartition des échantillons en fonction des classes de teneur en BHBA.

### 3.7.4. l'acétone

Pour cette analyse, de nombreux problèmes sont apparus (cf 3.5 « Analyse de l'acétone »).

Il est donc impossible de produire des résultats fiables et d'en tirer des conclusions. Ce paramètre est néanmoins important pour détecter un éventuel problème d'acétonémie. L'étude de ce paramètre devra être poursuivie.

## 4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'appareil à flux continu est un appareil qui, une fois bien maîtrisé, permet l'analyse simultanée et fiable de plusieurs analytes importants et permet une analyse de grandes séries d'échantillons.

Pour travailler sur un tel appareil, il est cependant préférable d'avoir des notions de chimie principalement en ce qui concerne la manipulation en laboratoire notamment pour la préparation de solutions.

Le stage de trois mois nous a permis d'obtenir la maîtrise de l'appareillage préalablement aux analyses proprement dite.

Au point de vue résultats, la première grande constatation qui a été faite sur nos analyses montre qu'il existe une relation entre le BHBA et le lactose. En effet, plus la teneur en lactose est grande et plus faible sera la teneur en BHBA.

Les résultats des analyses en lactose sont correctes puisque la majorité des échantillons est proche des 5% ce qui correspond bien au pourcentage lactose attendu dans le lait de vache.

En ce qui concerne le BHBA, en écartant les trois échantillons on passe à un CV de 1,30% ce qui reste fort élevé par rapport au 0,61% présent dans le certificat.

Certaines analyses devraient cependant être poursuivies afin de pouvoir vérifier les éventuelles constatations qui sont avancées ci-dessus.

Il est par exemple impossible de tirer de conclusion sur les analyses concernant l'acétone suite à un problème de répétabilité.

# BIBLIOGRAPHIE

- (1) Heuer C., Luinge H., Lutz E., Schukken Y., Van der Maas J., Wimink H. and Noordhuizen J. (2001). Determination of acetone in cow milk by FTIR for the detection of subclinical ketosis. J.Dairy Sci. 84: 575-582.
- (2) Brandt M., Haeussermann A. And Hartung E. (2009). Innited review: Technical solutions for analysis of milk constituents and abnormal milk. J.Dairy Sci. 93: 427-436.
- (3) <http://www.cra.wallonie.be/fr/24/nouvelles/525>
- (4) Jean Metge, Etapes BTA BTSA : La Production laitière, Paris, Edition Nathan 1990, p 75-77 et 99-103
- (5) <http://www.gt-mag.com/l-acetonemie-de-la-vache-laitiere-les-article-88.html>
- (6) J.M Pycke, Chimie des aliments (A l'usage des diététiciens de l'institut Paul Lambin), 1986, p 205-222
- (7) <http://www.apaqw.be/page.asp?id=269&langue=FR>
- (8) J.M Pycke, Chimie des aliments (A l'usage des diététiciens de l'institut Paul Lambin), p 205-222
- (9) <http://www.podcastscience.fm/wp-content/uploads/2012/12/lactose.png>
- (10) [https://fr.wikipedia.org/wiki/Lait\\_cru](https://fr.wikipedia.org/wiki/Lait_cru)



# ANNEXES

## Annexe 1 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination de l'urée

### Solution de NaCl

Dissoudre 18 g de NaCl dans +/- 800 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml de BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine à 4°C.

### Réactif colorant

Dissoudre 1.675 g de diacétyl monoxim ( $C_4H_7NO_2$ ) et 0.335 g de thiosemicarbazide dans +/- 800 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml de BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine à 4°C (vérifier si le pH se situe entre 7.5 et 8, ajuster si nécessaire avec du NaOH 0.1 M et vérifier avant utilisation si la solution est toujours au bon pH).

### Réactif acide

Dissoudre 0.033 g de chlorure de fer (III) ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) dans +/- 600ml d'eau distillée .

Sous la hotte, ajouter prudemment 0.65 ml d'acide orthophosphorique ( $H_3PO_4$  à 85 %) et 200 ml d'acide sulfurique à 95-97 %.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et ajouter de l'eau à proximité du trait.

Laisser refroidir dans un bain d'eau froide puis porter au trait de jauge.

Rem : stable 3 jours.

### Solution stock urée 2000 mg/l

Dissoudre 0.2 g d'urée dans +/- 80 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

## Annexe 2 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination du lactose

### Solution tampon citrate

Dissoudre 3.06 g acide citrique ( $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ) et 10.0 g de tri-sodium citrate ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) dans 800 ml d'eau distillée.

Ajuster le pH à 5.3 si nécessaire.

Transvaser dans un jaugé de 1l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml de BRIJ 35.

Rem : stable une semaine.

### Détergent 0.06%

Dans un jaugé de 1000 mL, remplir à 1 L d'eau distillée puis ajouter 2 mL de BRIJ 35

### Réactif colorant

Dissoudre 38 g de carbonate de sodium dans 500 ml d'eau distillée.

Ajouter 0.900 g de potassium ferricyanide ( $K_3 [Fe(CN)_6]$ ). Et laisser dissoudre.

Transvaser dans un jaugé de 1l et porter au trait de jauge.

Rem : stable deux semaines.

### Solution stock de lactose à 12 %

Dissoudre 12,6310 g de lactose dans 80 ml d'eau distillée sur une plaque chauffant à 50 °C.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et ajouter de l'eau à proximité du trait.

Laisser refroidir dans un bain d'eau froide puis porter au trait de jauge.

## Annexe 3 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination de l'acétone

### Solution tampon pH 7

Dissoudre 13.8g de dihydrogénophosphate de sodium et 12.11 g de TRIS (hydroxyméthyl aminophospateméthane) dans +/- 800 ml d'eau distillée.

Ajuster le pH à 7 avec une solution HCl (acide chlorhydrique) diluée.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 1 ml de BRIJ 35.

Rem : stable une semaine à 4°C.

### Solution d'hydroxylamine

Dissoudre 2 g d'hydroxyl ammonium chloride ((NH<sub>2</sub>OH)HCl) dans +/-80 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

Rem : stable une semaine.

### Solution stock indicatrice

Dissoudre 0.0625 g de méthylorange dans 0.5 ml d'hydroxyde de sodium( NaOH 1M).Puis diluer dans 200 ml .

Transvaser dans un jaugé de 250 ml et porter au trait de jauge.

Rem : stable un mois à l'abri de la lumière.

### Réactif de coloration

Diluer 100 ml de solution stock indicatrice et 75 ml de solution d'hydroxylamine dans 825 ml d'eau distillée.

Ajouter 1 ml de BRIJ 35

Rem : stable une semaine à l'abri de la lumière

### Air wash bottle = NaOH 1 M

Dissoudre 10 g de NaOH dans 200 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 250 ml et porter au trait de jauge.

Rem : stable un mois dans la bouteille.

### Solution stock d'acétone 4 mmol

Remplir un jaugé de 100 ml de +/- 30ml d'eau distillée. Mettre sur la balance et peser 0.02323 g d'acétone (=  $\mu$ l) puis porter au trait de jauge.

Rem : préparer avant utilisation.

## Annexe 4 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination des nitrites + nitrates

### Solution tampon 1

Dissoudre 40g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 200 g de  $\text{NaCl}$  dans 800 ml eau distillée

Sous la hotte, ajuster le pH à 8.5 avec du  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25%

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine à 4 °C.

### Solution tampon 2

Dissoudre 10g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  et 50 g de  $\text{NaCl}$  dans 800 ml eau distillée .

Ajouter 20 ml d'EDTA.

Sous la hotte ajuster le pH à 8.5 avec du  $\text{NH}_4\text{OH}$  à 25%

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine à 4 °C.

### Solution EDTA

Dissoudre 3.35 g de EDTA dans +/- 80 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

Rem : stable 1 mois.

### Réactif de coloration

Diluer 100 ml d'acide phosphorique à 85 % dans 700 ml d'eau distillée.

Ajouter 10 g de sulfamide ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ) et 0.5 g de ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$ ) et laisser dissoudre

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Rem : stable 1 semaine à 4 °C.

### Solution stock de nitrate 8 mmol

Dissoudre 0.068g de nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ) dans +/- 80 ml d'eau distillée

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

## Annexe 5 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination du Beta-hydroxybutyrate acide

### Solution tampon pH 9

Dissoudre 25 g de tris hydroxyméthylaminométhane ( $C_4H_{11}NO_3$ ) dans +/- 800ml d'eau distillée.

Ajouter 0.900 g de Chlorure de magnésium et 1.40 g d'acide oxalique, laisser dissoudre.

Ajuster le pH à  $9 \pm 0.1$  avec une solution HCl diluée.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 2 ml BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine à 4 °C.

### Solution de NAD

Dissoudre 0.100 g de nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) dans 25 ml d'eau distillée et homogénéiser doucement.

Rem : stable 1 jour à 4 °C.

### Solution de B-hydroxybutyrate dehydrogenase

Dissoudre 25 U de B-hydroxybutyrate dehydrogenase dans 25 ml de solution tampon pH 9 en agitant doucement.

BHDH = 3U/mg → 1 pot = 25 mg = 5 ml

→ 5 ml = 75 U

→ 1 ml = 15 U

→ Dissoudre 2 ml dans 30 ml de Solution tampon pH 9

Rem : stable 1 jour.

### Solution stock d'acide B-hydroxybutyrate 6 mmol

Faire chauffer l'acide B-hydroxybutyrate au bain marie à 40 °C.

Dissoudre 0.0625 g (=  $\mu$ l) d'acide B-hydroxybutyrate dans +/- 80 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

## Annexe 6 : Préparation des solutions et réactifs pour la détermination du Sodium citrate

### Solution de NaCl

Dissoudre 50 g de chlorure de sodium (NaCl) dans +/- 800 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 1 l et porter au trait de jauge.

Ajouter 1 ml BRIJ 35.

Rem : stable 1 semaine.

### Solution tampon NADH

Dissoudre 3 bouteilles du kit enzymatique n° 1 dans 260 ml d'eau distillée. Ajouter 0.225 g de chlorure de zinc(II) ( $ZnCl_2$ ) et homogénéiser.

Ajouter 1 ml BRIJ 35.

Rem : stable 1 jour, garder la solution entre 0 et 4 °C (bain froid) durant l'analyse.

### Solution lyase citrate

Dissoudre 2 bouteilles n°2 du kit enzymatique dans 36 ml d'eau distillée.

Rem : stable 1 jour, garder la solution entre 0 et 4 °C (bain froid) durant l'analyse.

### Solution stock 8 mmol de citrate de sodium

Dissoudre 0.2353 g de citrate de sodium ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ) dans +/- 80 ml d'eau distillée.

Transvaser dans un jaugé de 100 ml et porter au trait de jauge.

## Annexe 7 : Démarche à suivre pour l'utilisation du programme informatique « Flow-Acces ».

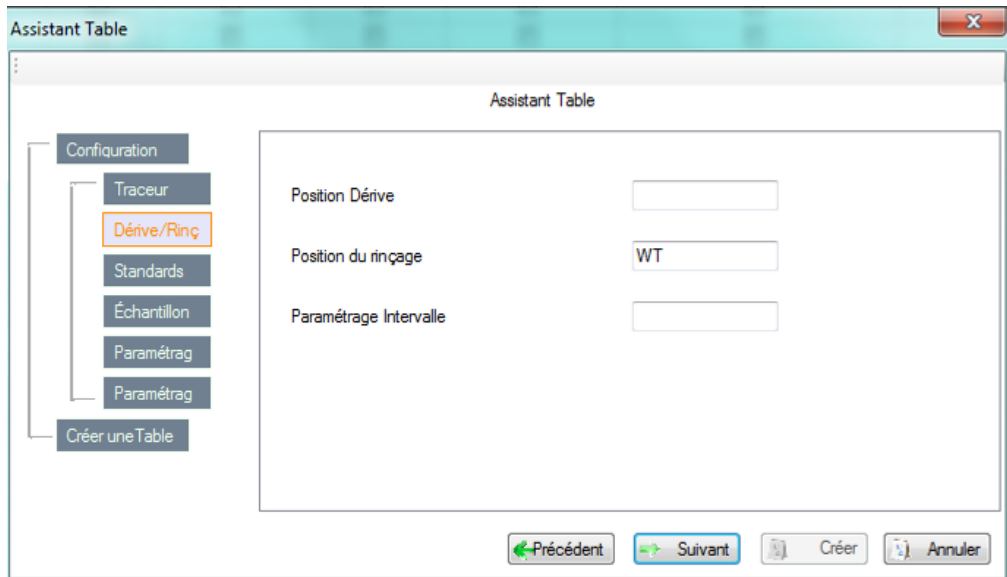
Afin de créer notre table, on va cliquer sur l'onglet en haut à gauche de la page principale. On arrivera sur une page sur laquelle notre tableau sera créé. Pour cela, on cliquera sur l'onglet « Assistant table ». Une fenêtre s'ouvrira comme le montre la figure ci-dessous.

Dans cette configuration, on y inscrit la position de notre Tracer (Exemple : « A1 »). Le Tracer va servir à donner un pic au graphe. Il s'agit de la valeur la plus haute présente sur un graphe.

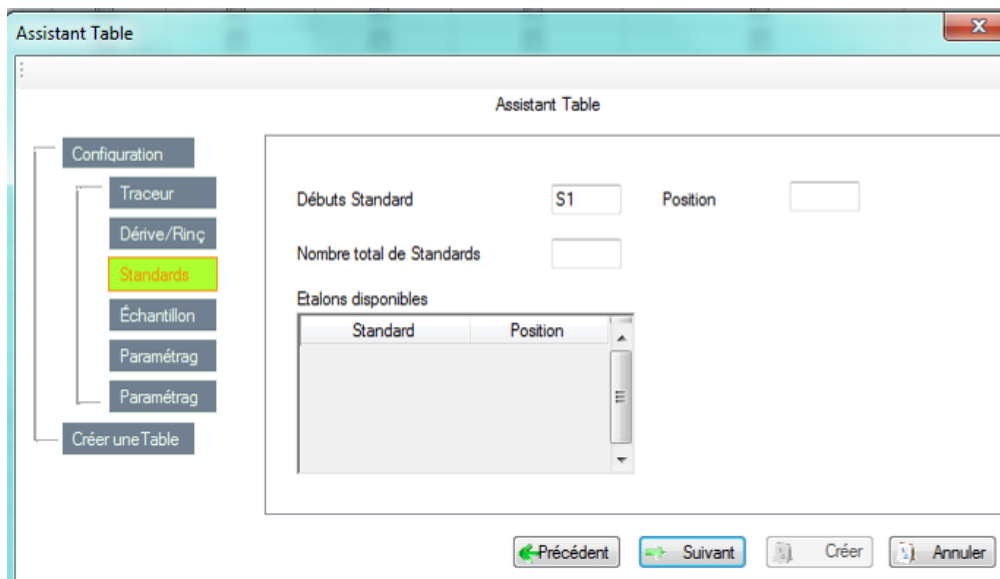
Type	Position
Wash	WT
DriftIgnore	
WashIgnore	

Après avoir cliqué sur l'onglet « suivant », on y inscrit la position du Drift. Le Drift joue un rôle de correcteur. Il va corriger les résultats obtenus en se basant sur la ligne de base réalisée auparavant.

Comme le Tracer, on va inscrire la position du Drift (Exemple : « ST1 ») puis on y inscrira l'intervalle des Drifts entre les échantillons avant de cliquer sur « Suivant »



On y inscrit ensuite le nombre de Standards (au nombre de 5) ainsi que la position du premier Standard (souvent « A1 »).



En cliquant deux fois sur « suivant » puis sur « créer » on reviendra à notre table prête pour la calibration.



## Annexe 8 : Résultats en double pour l'analyse des échantillons en urée, lactose, BHBA et Acétone.

	Urée 1 ppm	Urée 2 ppm	Lactose 1 %	Lactose 2 %	BHBA 1 mmol/l	BHBA 2 mmol/l	Acétone 1 mmol/l	Acétone 2 mmol/l
ech01	149,1	149,5	4,42	4,43	7,36	7,28	0,01	0,03
ech02	158,6	158,1	4,97	5,02	0,22	0,18	0,06	0,06
ech03	202,5	209,9						
ech04	186,5	188,6						
ech05	184,7	185,6						
ech06			5,14	5,23				
ech07			5,15	5,12				
ech08			5,05	4,98				
ech09			5,07	5,02				
ech10			5,10	5,15				
ech11			4,96	4,88				
ech12			5,06	5,02				
ech13			5,14	5,28				
ech14			5,35	5,25				
ech15			5,41	5,47				
ech16			5,04	4,98				
ech17	180,1	181,5						
ech18	409,9	396,4						
ech19	560,1	551,9						
ech20	302,4	299,6						
ech21	343,4	339,4						
ech22	262,8	265,8						
ech23	439,5	438,4						
ech24	483,8	488,3						
ech25	232,0	232,1						
ech26	546,4	548,6						
ech27	794,3	831,5	4,28	4,36	82,25	76,07	0,10	0,09
ech28	195,5	202,9	3,90	9,86	253,74	247,64	0,08	0,08
ech29	332,0	334,0	3,32	3,29	186,36	180,19	0,07	0,06
ech30	261,5	269,0	0,99	1,01	656,69	638,41	0,08	0,10
ech31	204,8	217,1	4,99	4,92	49,44	46,00	0,06	0,06
ech32	468,1	462,2	4,57	4,56	72,65	69,07	0,08	0,07
ech33	165,8	162,7	4,30	4,24	181,21	171,73	0,11	0,12
ech34	241,9	235,1	2,38	2,39	203,12	202,38	0,08	0,08
ech35	359,5	375,2	3,53	3,68	210,44	206,77	0,15	0,15
ech36	564,2	559,4	4,22	4,20	486,82	458,68	0,30	0,30
ech37	248,8	257,4	4,33	4,34	91,65	89,77	0,12	0,11
ech38	199,9	200,5	4,08	3,95	134,16	132,28	0,13	0,13
ech39	289,2	296,0	3,11	3,14	396,58	397,74	0,07	0,09
ech40	474,6	465,8	0,86	0,66	704,23	686,65	0,11	0,12
ech41	326,4	323,9	4,02	4,07	137,44	135,56	0,14	0,12
ech42	220,9	218,0						
ech43	286,8	287,3						
ech44	282,6	283,4						
ech45	154,5	154,5						
ech46	316,9	318,2						
ech47	332,2	327,5						

## Annexe 9 : Résultats pour l'analyse de l'urée

	ppm Urée 1	ppm Urée 2	ppm Moyenne	ppm Ecart-type	% CV
ech01	149,1	149,5	149,3	0,17	0,11
ech02	158,6	158,1	158,4	0,26	0,16
ech03	202,5	209,9	206,2	3,72	1,80
ech04	186,5	188,6	187,5	1,06	0,56
ech05	184,7	185,6	185,1	0,49	0,27
ech17	180,1	181,5	180,8	0,68	0,38
ech18	409,9	396,4	403,2	6,76	1,68
ech19	560,1	551,9	556,0	4,07	0,73
ech20	302,4	299,6	301,0	1,36	0,45
ech21	343,4	339,4	341,4	2,04	0,60
ech22	262,8	265,8	264,3	1,54	0,58
ech23	439,5	438,4	438,9	0,53	0,12
ech24	483,8	488,3	486,1	2,24	0,46
ech25	232,0	232,1	232,0	0,01	0,00
ech26	546,4	548,6	547,5	1,14	0,21
ech27	794,3	831,5	812,9	18,62	2,29
ech28	195,5	202,9	199,2	3,74	1,88
ech29	332,0	334,0	333,0	0,98	0,29
ech30	261,5	269,0	265,2	3,77	1,42
ech31	204,8	217,1	210,9	6,18	2,93
ech32	468,1	462,2	465,1	2,94	0,63
ech33	165,8	162,7	164,3	1,56	0,95
ech34	241,9	235,1	238,5	3,39	1,42
ech35	359,5	375,2	367,4	7,83	2,13
ech36	564,2	559,4	561,8	2,35	0,42
ech37	248,8	257,4	253,1	4,29	1,69
ech38	199,9	200,5	200,2	0,30	0,15
ech39	289,2	296,0	292,6	3,39	1,16
ech40	474,6	465,8	470,2	4,40	0,94
ech41	326,4	323,9	325,1	1,23	0,38
ech42	220,9	218,0	219,4	1,44	0,66
ech43	286,8	287,3	287,1	0,24	0,08
ech44	282,6	283,4	283,0	0,42	0,15
ech45	154,5	154,5	154,5	0,01	0,01
ech46	316,9	318,2	317,5	0,66	0,21
ech47	332,2	327,5	329,9	2,35	0,71

## Annexe 10 : Certificat de l'AFC donnant les valeurs extrêmes ainsi que la moyenne des coefficients de variabilité pour les différentes analyses

Constituants	unités	min	max	CV (%)
Urée	mg/l	10	500	0,42
Acetone	mmole/l	0,02	1	0,83
Nitrates	mmole/l	0,02	1	0,69
Nitrites				
Lactose	%	0,02	6	0,87
BHBA	mmole/l	0,04	2	0,61
Citrate de Na	mmole/l	0,03	1,5	0,88

## Annexe 11 : Résultats pour l'analyse du lactose

	Lactose 1	Lactose 2	ppm Moyenne	ppm Ecart-type	% CV	% CV2
ech01	4,42	4,43	4,43	0,005	0,11	0,11
ech02	4,97	5,02	5,00	0,025	0,50	0,50
ech06	5,14	5,23	5,19	0,045	0,87	0,87
ech07	5,15	5,12	5,14	0,015	0,29	0,29
ech08	5,05	4,98	5,02	0,035	0,70	0,70
ech09	5,07	5,02	5,05	0,025	0,50	0,50
ech10	5,10	5,15	5,13	0,025	0,49	0,49
ech11	4,96	4,88	4,92	0,040	0,81	0,81
ech12	5,06	5,02	5,04	0,020	0,40	0,40
ech13	5,14	5,28	5,21	0,070	1,34	1,34
ech14	5,35	5,25	5,30	0,050	0,94	0,94
ech15	5,41	5,47	5,44	0,030	0,55	0,55
ech16	5,04	4,98	5,01	0,030	0,60	0,60
ech27	4,28	4,36	4,32	0,040	0,93	0,93
ech29	3,32	3,29	3,31	0,015	0,45	0,45
ech30	0,99	1,01	1,00	0,010	1,00	1,00
ech31	4,99	4,92	4,96	0,035	0,71	0,71
ech32	4,57	4,56	4,57	0,005	0,11	0,11
ech33	4,30	4,24	4,27	0,030	0,70	0,70
ech34	2,38	2,39	2,39	0,005	0,21	0,21
ech35	3,53	3,68	3,61	0,075	2,08	2,08
ech36	4,22	4,20	4,21	0,010	0,24	0,24
ech37	4,33	4,34	4,34	0,005	0,12	0,12
ech38	4,08	3,95	4,02	0,065	1,62	1,62
ech39	3,11	3,14	3,13	0,015	0,48	0,48
ech40	0,86	0,66	0,76	0,100	<b>13,16</b>	
ech41	4,02	4,07	4,05	0,025	0,62	0,62

## Annexe 12 : Résultats pour l'analyse du BHBA

	BHBA 1	BHBA 2	mmole/ Moyenne	Ecart-type	CV	CV2
ech01	7,36	7,28	7,32	0,040	0,55	0,55
ech02	0,22	0,18	0,20	0,020	10,00	
ech27	82,25	76,07	79,16	3,090	3,90	
ech28	253,74	247,64	250,69	3,050	1,22	1,22
ech29	186,36	180,19	183,28	3,085	1,68	1,68
ech30	656,69	638,41	647,55	9,140	1,41	1,41
ech31	49,44	46,00	47,72	1,720	3,60	
ech32	72,65	69,07	70,86	1,790	2,53	2,53
ech33	181,21	171,73	176,47	4,740	2,69	2,69
ech34	203,12	202,38	202,75	0,370	0,18	0,18
ech35	210,44	206,77	208,61	1,835	0,88	0,88
ech36	486,82	458,68	472,75	14,070	2,98	2,98
ech37	91,65	89,77	90,71	0,940	1,04	1,04
ech38	134,16	132,28	133,22	0,940	0,71	0,71
ech39	396,58	397,74	397,16	0,580	0,15	0,15
ech40	704,23	686,65	695,44	8,790	1,26	1,26
ech41	137,44	135,56	136,50	0,940	0,69	0,69