

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou



Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'Obtention du Diplôme de Master type stage
Spécialité : Alimentation Humaine et Qualité des Produits

THEME :

**Les acides gras polyinsaturés en alimentation
humaine et relation avec la santé**

Travail réalisé par :

- BOURFIS Naima
- CHABANI Malika

Présenté le 13/07/2017 devant le jury :

Présidente : M^{me} DERMECHE Samia
Examinatrice : M^{me} ISSELNANE- TAMACHE Souad
Promotrice : M^{me} GHAZI Amel

Année Universitaire 2016-2017

REMERCIEMENTS

*A Dieu,
Qui a permis la réalisation de ce travail.
A tous ceux que nous aimons.*

Nous tenons à remercier sincèrement Mr MATI A., professeur en Biochimie Appliquée à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pour nous avoir accueillies dans son laboratoire.

Nous remercions notre promotrice M^{me} GHAZI Amel pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant ce travail, pour ses aides, ses conseils, tout au long de l'élaboration de ce modeste travail.

*Nous remercions les membres du jury qui ont acceptés de juger ce travail : la présidente M^{me} DERMECHE Samia.
ainsi que l'examinatrice M^{me} ISSELNANE- TAMACHE Souad.*

Nous tenons également à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace



A ma mère

*Pour son grand amour, ses sacrifices et toute l'affection qu'elle a
toujours offerte*

A mon père

*Pour son amour, sa patience et ses considérables sacrifices pour me
parvenir à ce niveau*

A mes frères et mes sœurs

A mes amies

A mon Amie et camarade Naima

Je dédie ce mémoire.

Malika CHABANI



Dédicace



A mes chers parents

*Pour leur amour, leur patience et leurs considérables sacrifices pour
me parvenir à ce niveau*

A mes frères et mes sœurs

A ma grande mère

A mon Amie et camarade Malika

A mes amies

Je dédie ce mémoire.

Naima BOURFIS



Avant propos

Le mémoire de master ainsi présenté a consisté en un stage pratique bloqué réalisé au laboratoire de Biochimie de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'UMMTO, pour lesquels les responsables des formations suivantes :

- Master de Biochimie Appliquée ;
- Master Alimentation Humaine et Qualité des Produits.

En concertation avec les responsables du département de Biochimie-Microbiologie de la faculté, ont arrêté des dispositions communes quant à la présentation finale du mémoire, tenant compte des objectifs attendus pour sa réalisation, tant les volets liés à la recherche bibliographique et la rédaction de synthèses appropriées ainsi qu'aux diverses manipulations pratiques qui ont été centrés sur le contrôle et l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

De ce fait, ce mémoire comporte deux parties à parts égales :

- Une synthèse des données bibliographiques sur le thème
« Les acides gras polyinsaturés en alimentation humaine et relation avec la santé » ;
- Une partie pratique liée au contrôle et à l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

Sommaire

Introduction	01
I. Synthèse bibliographique.....	02
I.1. Généralités sur les lipides	02
I.1.1 Définition des lipides	02
I.1.2 Origine des lipides	02
I.1.2.1 Les lipides d'origine alimentaire	02
I.1.2.2 Les lipides d'origine endogène	03
I.1.3 Rôle des lipides	03
I.1.3.1 Rôle énergétique	03
I.1.3.2 Rôle biologique	03
I.1.3.3 Rôle de messenger	03
I.1.3.4 Rôle de transporteur de vitamines.....	04
I.1.4. Classification des lipides.....	04
I.1.4.1 Les acides gras	05
I.1.4.1.1 Les acides gras saturés	05
I.1.4.1.2 Les acides gras monoinsaturés.....	05
I.1.4.1.3 les acides gras polyinsaturés	06
I.2 Les acides gras polyinsaturés en alimentation humaine	08
I.2.1. Les deux principales séries d'AGPI.....	08
I.2.2. Nomenclature des AGPI	08
I.2.3. Le caractère essentiel et indispensable des AGPI n-3 et n-6	09
I.2.4. Le métabolisme des acides gras polyinsaturés.....	10
I.2.5. Rôle des AGPI	12
I.2.5.1 Rôle structural.....	12
I.2.5.2 Rôle de médiateurs lipidiques : les eicosanoides	12
I.2.5.3 Régulation de la transcription	12
I.2.6. Sources alimentaires des AGPI.....	14
I.2.7 Recommandation nutritionnel en AGPI.....	14
I.2.7.1 Apports nutritionnels conseillés (ANC).....	14
I.2.7.2 Situation de la consommation en AGPI.....	16
I.2.7.3.Importance du rapport n-6/n-3	17
I.3 Les acides gras polyinsaturés et relation avec la santé	17

I.3.1 Généralité	18
I.3.2 Effets de la consommation des AGPI <i>n</i> -3 sur la santé.....	18
I.3.2.1 Maladies cardiovasculaires	18
I.3.2.1.1 Maladies coronariennes et l'athérosclérose	19
I.3.2.1.2 Arythmie cardiaque.....	19
I.3.2.1.3 La pression artérielle.....	20
I.3.2.1.4 Maladies inflammatoires et immunité	20
I.3.2.2 AGPI <i>n</i> -3 et le développement de cerveau	20
I.3.2.3 Les AGPI et le cancer	21
I.3.2.4 Les AGPI et l'acuité visuelle	21
I.3.2.5 Les AGPI <i>n</i> -3 dans l'obésité et le diabète de type 2	22
I.3.2.6 Effets sur le système nerveux central.....	22
I.3.3 Effets de la consommation des AGPI <i>n</i> -6 sur la santé.....	22
I.3.3.1 AGPI <i>n</i> -6 et maladies cardiovasculaires	23
I.3.3.2. AGPI <i>n</i> -6 et obésité.....	23
II. Partie pratique.....	24
Introduction	24
II.1. Matériel.....	28
II.1.1. Matériel biologique.....	25
II.1.2. Equipement	25
II.1.3. Petits matériels.....	25
II.1.4. Produits et réactifs spécifiques	25
II.2.1. Méthodes physico-chimiques	26
II.2.1.1. Détermination de la teneur en protéines des trois laits	26
II.2.1.2. Dosage des sucres réducteurs dans les trois lait	27
II.2.1.3. Détermination de la teneur en vitamine C des trois laits	29
II.2.2. Fractionnement des protéines du lait de vache	29
II.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100	30
II.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques lyophilisées du lait de vache par la trypsine	31
II.2.5. Méthodes électrophorétiques	32
II.2.5.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	32
II.2.5.2. Conditions générales et conduite de l'électrophorèse	33
II.2.5.3. Conditions expérimentals	35

II.2. Résultats et discussion	36
II.2.1. Analyse physico-chimique	36
II.2.1.1. Teneur en protéines totales	36
II.2.1.2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)	37
II.2.1.3. Teneur en vitamine C	38
II.2.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de SEPHACRYL S100.....	38
II.2.4. Control électrophorétique en PAGE-native des fractions issues de la chromatographie de perméation	39
II.2.5. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques du lait de vache par la trypsine	41
Conclusion.....	43

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure	titre	pages
Figure 1:	Classification simplifiée des lipides	04
Figure 2:	Structure de l'acide palmitique.....	05
Figure 3 :	Structures de l'acide oléique.....	05
Figure 4 :	Structure de l'acide linoléique	06
Figure 5 :	Structure et nomenclature des principales familles d'AG	09
Figure 6 :	Voies métaboliques de conversion des AL et ALA alimentaires en leurs AG polyinsaturés à longue chaîne.....	11
Figure 7 :	Procédure expérimentale	27
Figure 8:	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY <i>et al.</i> (1951).....	28
Figure 9:	Transformation de l'acide 3,5 dinitrosalicylique en l'acide 3- amino- 5- nitro salicylique	29
Figure 10 :	Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS	29
Figure 11:	Protocole d'isolement des protéines du lait.....	31
Figure12:	Photographie d'une unité de chromatographie basse pression	32
Figure 13:	Mécanisme d'action de la trypsine	33
Figure 14:	Un monomère d'acrylamide	34
Figure 15 :	Une molécule de bis-acrylamide	34
Figure 16:	Les différentes étapes de l'électrophorèse.....	35
Figure 17:	Teneur en protéines dans différents échantillons de lait.....	36
Figure 18:	Teneur en sucre réducteur dans différents échantillons de lait.....	37
Figure 19:	Teneur en vitamine C dans différents échantillons de lait.....	38
Figure 20:	Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur gel de Sepha- cryl S100	39
Figure 21 :	Electrophorègramme des fractions protéiques obtenu après une chromato- graphie de perméation sur gel de Séphacryl S100	40
Figure 22 :	Electrophorègramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques obtenus sous l'action de la trypsine sur les protéines sériques du lait de vache.....	41

Liste des tableaux

Tableau I : Quelques acides gras insaturés	07
Tableau II: Les principaux rôles physiologiques exercés par les AGPI.....	13
Tableau III : Teneur (mg /100g) en acides gras linoléique et α -linolénique des principales huiles d'origine végétale et animale.....	14
Tableau IV: Les apports conseillés en acides gras	16
Tableau V : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation de la population française	17
Tableau VI: Rapport oméga 6/ oméga 3 dans plusieurs population.....	18

Liste des abréviations

Abréviation	Désignation
ARA	Acide Arachidonique
AET	Apport Energétique Total
AG	Acide Gras
AGMI	Acide Gras Monoinsaturé
AGPI.....	Acide Gras Polyinsaturé
AGPI-LC	Acide Gras Polyinsaturé à Longue Chaîne
AGS	Acide Gras Saturé
ALA	Acide α -linolacide Linoléique
ANC	Apports Nutritionnels Conseillés
Afssa.....	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
α -La :	α –Lactalbumine
β -Lg	β -Lactoglobuline
BSA	Albumine Sérique Bovine
DHA	Acide Docosahexaénoïque
D.O	Densité Optique
DCPIP.....	2,6 dichlorophénol indophenol
DNS	Acide 3,5 Dinitrosalicylique
EPA	Acide Eicosapentaénoïque
HDL.....	High Density Lipoprotein
kDa	Kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
MCV	Maladie Cardiovasculaire
4-HNE	4-hydroxynonénate
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
pH.....	Potentiel Hydrométrique
pHi.....	Point isoélectrique
PLs.....	Phospholipides
UHT.....	Ultra Haute Température
Ig.....	Immunoglobuline

SDS..... Dodécylsulfate de sodium
T (%) pourcentage d'acrylamide et de bis-acrylamide dans un volume
V de tampon
TCA Acide trichloracétique
TEMED N,N,N',N'-tetraméthyl-éthylène diamine
Tris Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane
V/V Volume / volume

Résumé

Les lipides alimentaires sont des nutriments essentiels contenant une grande variété d'acides gras notamment des acides gras polyinsaturés (AGPI) de la famille des *n*-3 et *n*-6, (couramment appelés oméga 3 et des oméga 6). Les deux chefs de files de ces deux familles sont respectivement l'acide α -linoléique (ALA) et l'acide linoléique (LA). Ces derniers sont dits indispensables car ils doivent impérativement être apportés par l'alimentation étant nécessaires pour l'organisme mais non synthétisable par ce dernier.

L'acide α -linoléique (ALA), précurseur de la série *n*-3 se trouve essentiellement dans les graines, les huiles de colza, de noix et de lin et aussi dans les poissons. Une fois consommé l'ALA conduit à la synthèse spécifique de dérivés à plus longue chaîne par un processus de désaturations élongations successives. Les 2 AGPI majeurs ainsi formés sont l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; 20 :5*n*-3) et l'acide docosahéxaénoïque (DHA ; 22 :6*n*-3). L'acide linoléique (LA), précurseur de la série *n*-6 se trouve essentiellement dans les graines et les huiles de tournesol et de soja. Comme pour la série *n*-3, le LA est métabolisé par désaturations et élongations successives en un acide gras à plus longue chaîne, l'acide arachidonique (AA ; 20 :4*n*-6).

Les AGPI jouent un rôle bénéfique dans certain pathologie telles que les maladies cardiovasculaire, les troubles inflammatoires, les maladies neurodégénérative, le cancer et le diabète de type II, c'est pourquoi la recommandation nutritionnelles actuelles préconisent d'augmenté la part relative des AGPI, est plus particulièrement des AG de la séries *n*-3 dans l'alimentation, l'apport oméga 3 sur oméga 6 conseillé est de 1/5.

Mots-clés : acides gras polyinsaturés/ acide linoléique/ acide α -linoléique/ alimentation/ santé.

Abstract

Dietary lipids are essential nutrients containing a wide variety of fatty acids including polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the n-3 and n-6 families (commonly known as omega-3s and omega-6s). The two leaders of these two families are α -linolenic acid (ALA) and linoleic acid (LA), respectively. The latter are said to be indispensable because they must imperatively be provided by the diet being necessary for the organism but not synthesizable by the latter.

α -linolenic acid (ALA), the precursor of the n-3 series, is found mainly in seeds, rapeseed, nut and flax oils and also in fish. Once consumed the ALA leads to the specific synthesis of longer chain derivatives by a process of desaturations successive elongations. The two major PUFAs thus formed are eicosapentaenoic acid (EPA, 20: 5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22: 6n-3). Linoleic acid (LA), the precursor of the n-6 series, is found primarily in sunflower and soybean seeds and oils. As for the n-3 series, LA is metabolized by successive desaturations and elongations to a longer chain fatty acid, arachidonic acid (AA; 20: 4n-6).

PUFAs play a beneficial role in certain pathologies such as cardiovascular disease, inflammatory disorders, neurodegenerative diseases, cancer and type II diabetes, which is why the current nutritional recommendation advocates increasing the relative share of PUFAs. Is more particularly AG of the n-3 series in the diet, the omega 3 intake on omega 6 recommended is 1/5.

Key words : polyunsaturated fatty acids / linoleic acid / α -linolenic acid / diet / health.

Introduction

Riche en oméga 3 ou en oméga 6 voici des termes que l'on retrouve souvent lors de publicités et sur les emballages de certains produits alimentaires. Mais que sont-ils, quels sont les aliments où on peut les trouver et à quoi servent-ils ?

Il existe plusieurs acides gras de type oméga 3 et oméga 6 mais seul l'acide alpha-linolénique (ALA) et l'acide linoléique (AL) sont considérés comme indispensables et seule la consommation d'aliments spécifiques ou la prise de complément alimentaire peut en fournir au corps. Dans notre alimentation ces acides gras dits indispensables se trouvent principalement dans les poissons et fruits de mer (le saumon, le maquereau, la sardine, le hareng et le thon offrent un excellent apport en acides gras oméga-3) ; les huiles d'origine végétale (colza, noix, soja, ...), porc (saindoux), bœuf, beurre, lait et le jaune d'oeuf. Les autres acides gras à longue chaîne sont dits essentiels puisqu'ils sont bénéfiques au bon fonctionnement de notre organisme et peuvent être synthétisés par le corps à partir des deux chefs de file ALA et AL.

De nombreuses études cliniques concluent que les acides gras polyinsaturés notamment les omégas 3 diminuent les risques de certaines maladies cardiaques. En plus de prévenir la formation de caillots dans le sang (souvent responsables de l'infarctus du myocarde), ils diminuent le taux de triglycérides, ce qui réduit d'autant les risques de troubles vasculaires. Les acides gras oméga-3 contribuent également à la diminution de la pression artérielle et du taux de cholestérol et de stabiliser le rythme cardiaque.

L'objectif de cette synthèse bibliographique est de mieux connaître les acides gras polyinsaturés et de mettre en évidence les différentes sources alimentaires et leur relation avec la santé humaine.

I. Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur les lipides

On regroupe sous le nom de lipides des substances naturelles insolubles dans l'eau mais solubles dans certains solvants organiques tels que le méthanol, le chloroforme, l'acétone. Chez les êtres vivants, certains sont abondants, d'autres sont présents en faible quantité. On classe les lipides en fonction de leur nature chimique et du rôle qu'ils tiennent dans la structure et le fonctionnement des organismes.

Il existe différentes classes de lipides, mais leurs propriétés communes résultent des chaînes hydrocarbonées (carbone + hydrogène) qui constituent la majeure partie de leur structure. Ces lipides présentent plusieurs fonctions biologiques importantes, ils remplissent des fonctions structurales essentielles en tant que composants majeurs des biomolécules membranaires. Ils servent de combustibles pour la cellule et pour cela ils interviennent dans des réactions d'oxydation dans la cellule, un rôle de protection à la surface d'un grand nombre d'organisme ; ils peuvent aussi être des constituants de la surface cellulaire et participer à la reconnaissance des cellules et de ce fait jouer un rôle dans l'immunité cellulaire. Enfin, certaines substances telles que les vitamines et les hormones sont classées parmi les lipides et ces substances sont douées d'une intense activité biologique.

I.1.1 Définition des lipides

Alors que la plupart des familles de molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques, les lipides (du grec *lipos*, graisse) sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité. Ce sont des composés à solubilité nulle ou faible dans l'eau mais par contre élevée dans les solvants organiques non polaires (méthanol, chloroforme, cyclohexane, éther éthylique, acétone...). Les termes d'huiles, beurres, graisses, cires ne désignent que leur état physique liquide ou solide à la température ambiante (CHIKHI et BENSEGUENI, 2006).

Un lipide est une molécule :

- soit complètement apolaire (lipide neutre) ;
- soit bipolaire, molécule amphiphile (ou amphipathique), avec une tête polaire liée à une chaîne fortement apolaire (queue).

I.1.2 Origine des lipides

Les lipides ont une double origine : alimentaire et endogène.

I.1.2.1 Les lipides d'origine alimentaire

Les lipides alimentaires (huiles ou graisse) provenant des plantes sont constitués majoritairement de triacylglycérols. Ceux provenant des animaux sont constitués de Triacyl-

glycérols mais aussi de phospholipides (Pls) jusqu'à environ 15% des lipides totaux (LERAY, 2013).

Les lipides alimentaires sont présents dans divers produits d'origine animale, les produits laitiers entiers ou partiellement écrémés (beurre, crème, fromage...), dans les viandes (bœuf, agneau, porc...), la charcuterie, et certains poissons (saumon, thon, anguille, anchois...). Les produits d'origine végétale contenant des lipides sont les oléagineux (amandes, noix, arachides...), mais aussi certains fruits ou légumes, comme l'avocat, sont riches en lipides. L'huile, qu'elle soit végétale ou animale, est constituée entièrement de lipides. De nombreux produits industrialisés, biscuits, gâteaux, confiseries, viennoiseries, fritures, hamburgers, pizzas et plats préparés en général sont très riches en lipides (ABDOUL AZIZ, 2013).

I.1.2.2 Origine endogène

Les cellules de l'organisme peuvent avoir besoin de synthétiser des acides gras, composants essentiels des membranes biologiques. Il existe donc des voies de biosynthèse des acides gras dans les cellules humaines (certains acides gras ne sont pas synthétisables par ces cellules : ce sont les acides gras dit essentiels, qui doivent être fournis par l'alimentation). Les cellules humaines sont ainsi capables de synthétiser des acides gras à partir du glucose. Ceci permet aussi un stockage de réserves énergétiques sous forme de lipides, qui peuvent être stockés en plus grandes quantités par l'organisme que les glucides (stockés sous forme de glycogène) (KARLESKIND, 1992).

I.1.3 Rôle des lipides

I.1.3.1 Rôle énergétique

Les lipides constituent la source d'énergie la plus efficace en apportant 39,5 Kj/g alors que les protéines et les glucides fournissent respectivement 23,7 et 17,2 Kj/g (NRC, 1993). Les réserves énergétiques sont essentiellement constituées de triglycérides du tissu adipeux blanc. Parmi les acides gras. Ce sont principalement les acides gras saturés (AGS) et secondairement les acides gras monoinsaturés (AGMI) qui assurent ce rôle énergétique.

I.1.3.2 Rôle biologique

Les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les Pls qui forment les membranes cellulaires. La composition en AG de ces Pls donne aux membranes des propriétés physiques particulières (élasticité et viscosité).

I.1.3.3 Rôle de messenger

Les AG sont les précurseur de plusieurs messagers intra et extracellulaire. Par exemple le diacylglycérol et les céramides ont des rôles de médiateurs cellulaire, les prostaglandines

sont impliqués dans les phénomènes inflammatoires, l'acide arachidonique (ARA) est le précurseur des éicosanoides, hormone de l'inflammation, la coagulation sanguine, etc.

I.1.3 4 Rôle de transporteur de vitamines

Le corps utilise les lipides pour absorber les vitamines liposolubles : A, D, E et K apportés par l'alimentation, une fois absorbé, ces vitamines seront stockées dans le tissu adipeux. Cela permet au corps de les stocker pendant une longue période de temps. Pour cette raison, le corps n'a pas besoin d'un apport quotidien en vitamines liposolubles, en cas de besoin ces derniers seront transportés par les lipides (NAFTI, 2011).

I.1.4 Classification des lipides

Selon la structure de leur squelette et d'après MAROUF et TREMBLIN (2009), les lipides peuvent être classés en deux grandes catégories (figure 1) :

Les lipides à base d'AG sont également appelés « lipides saponifiables » ce groupe renferme :

- Les lipides simples regroupant des composés à base d'acides gras, on retrouve les acides gras eux-mêmes, les glycérides, les cérides et les stérides ;
- Les lipides complexes désignent les lipides phosphorés, les lipides azotés et les lipides soufrés.

Les lipides à base d'isoprène appelés « lipides insaponifiables ». Ce dernier groupe renferme les lipides isopréniques qui sont divisés en trois catégories : les terpénoïdes, les stéroïdes et les vitamines liposolubles.

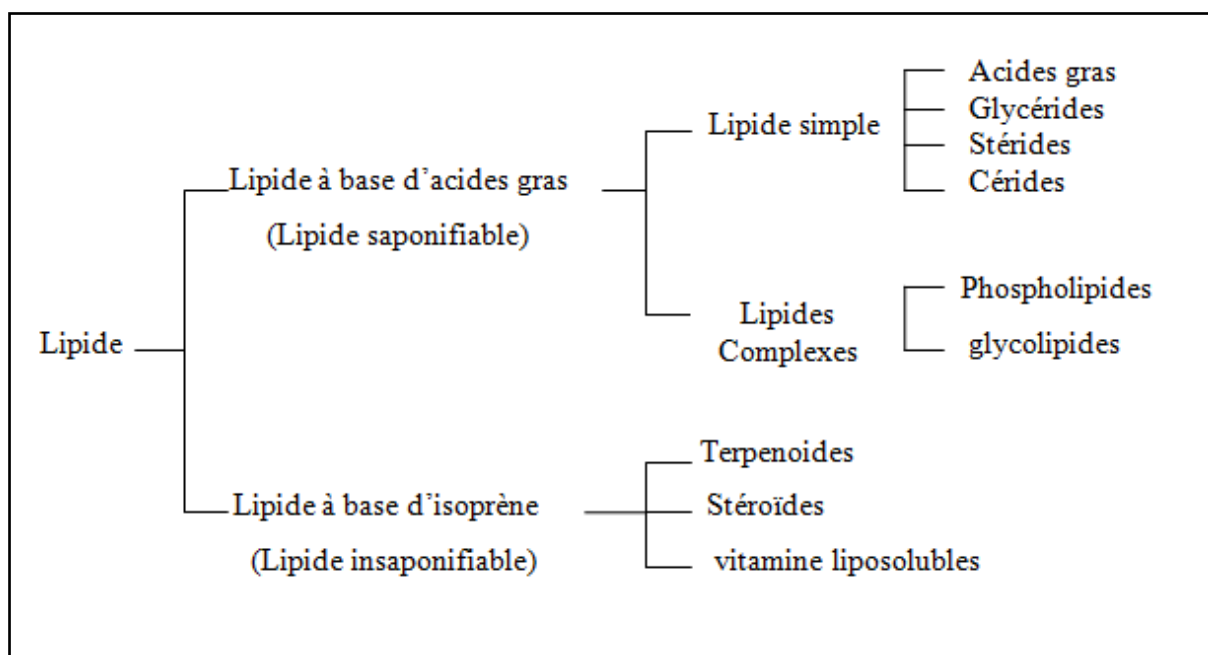


Figure 1: Classification simplifiée des lipides (MAROUF et TREMBLIN, 2009).

I.1.4.1 Les acides gras

Les AG sont des acides carboxyliques formés d'un côté par une chaîne aliphatique composée d'atomes de carbone leur conférant leur caractère lipophile et de l'autre, par un groupement carboxyle terminal. La plupart des acides gras présentent une chaîne aliphatique linéaire et un nombre pair de carbones (entre 2 et 28) (CUVLIER et *al.*, 2004). On distingue trois types d'AG en fonction de leur degré d'insaturation :

I.1.4.1.1 Les acides gras saturés (AGS)

Les acides gras saturés sont des acides gras ne comportant aucune insaturation ou double liaison. Leur formule générale est $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ où n représente le nombre d'atomes de carbone (compris entre 2 et 22 le plus souvent) (CUVLIER et *al.*, 2004). Les plus rencontrés sont l'acide palmitique (C16 :0) (figure 2) et l'acide stéarique (C18 :0).

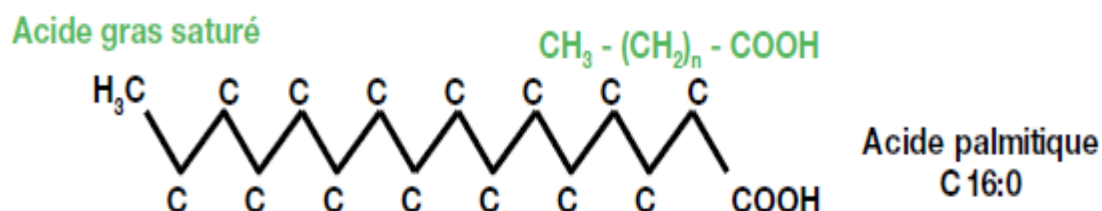


Figure 2 : Structure de l'acide palmitique (COLETTE et MONNIER, 2011).

I.1.4.1.2 Les acides gras monoinsaturés (AGMI)

Les AGMI sont des AG comportant qu'une seule double liaison.

La figure 3 représente un exemple d'AGMI, l'acide oléique.

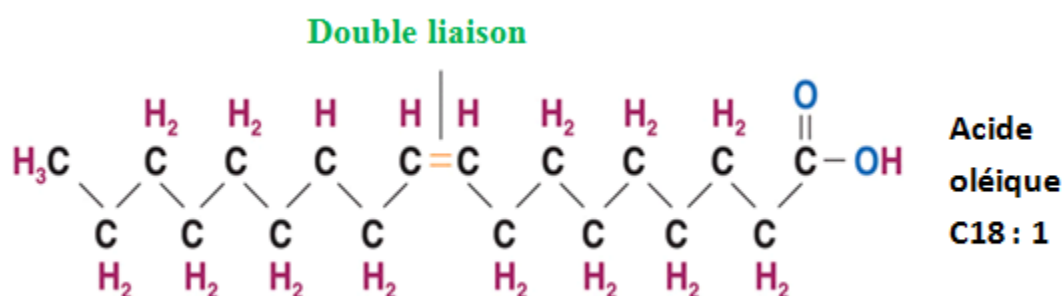


Figure 3 ; Structure de l'acide oléique (SCHMITZ, 2012).

I.1.4.1.2 Les AG polyinsaturés (AGPI)

On parle AGPI, lorsqu'il y a au moins deux doubles liaisons. Les AGPI, ayant pour formule chimique $CH_3-(CH_2)_n-(CH=CH-CH_2)_x-(CH_2)_p-COOH$ (GEAY, 2011). La figure 4 représente un exemple d'AGPI, l'acide linoléique.

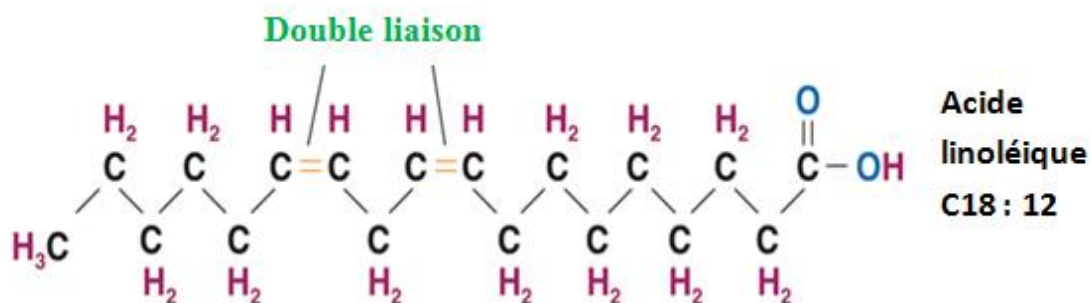


Figure 4 ; Structure de l'acide linoléique (SCHMITZ, 2012).

Le tableau I représente certains acides gras insaturés :

Tableau I : quelques acides gras insaturés (CUVELIER et al., 2004).

<i>Nombre de carbone</i>	<i>Nom courant</i>	<i>Nom systématique</i>	<i>Symbole</i>
<i>Acides gras mono-insaturés</i>			
12	Acide lauroléique	Acide cis-9-dodécénoïque	C12:1(9)
14	Acide myristoléique	Acide cis-9-tétradécénoïque	C14:1(9)
16	Acide palmitoléique	Acide cis-9-héxadécénoïque	C16:1(9)
18	Acide oléique	Acide cis-9-octadécénoïque	C18:1(9)
18	Acide vaccénique	Acide cis-11-octadécénoïque	C18:1(11)
22	Acide érucique	Acide cis-13-docosaénoïque	C22:1(13)
24	Acide nervonique	Acide cis-15-tétracosaénoïque	C24:1(15)
<i>Acides gras poly-insaturés</i>			
18	Acide linoléique	Acide tout cis-9-12-octadécadiénoïque	C18:2(9, 12)
18	Acide α -linolénique (ALA)	Acide tout cis-9-12-15-octadécatriénoïque	C18:3(9, 12, 15)
18	Acide γ -linolénique (AGL ou GLA)	Acide tout cis-6-9-12-octadécadiénoïque	C18:3(6, 9, 12)
20	Acide arachidonique (AA)	Acide tout cis-5-8-11-14-eicosatétraénoïque	C20:4(5, 8, 11, 14)
20	Acide eicosapentaénoïque (EPA)	Acide tout cis-5-8-11-14-17-eicosapentaénoïque	C20:5(5, 8, 11, 14, 17)
20	Acide dihomog γ -linolénique	Acide tout cis-8-11-14-eicosatriénoïque	C20:3(8, 11, 14)
22	Acide érucique	Acide cis-13-docosénoïque	C22:1(13)
22	Acide cervonique ou DHA	Tout cis-4-7-10-13-16-19-docosahexaénoïque	C22:6(4, 7, 10, 13, 16, 19)

I.2 Les acides gras polyinsaturés en alimentation humaine

I.2.1 Les deux principales séries d'AGPI

On distingue deux principales séries d'AGPI : les AGPI n-6 et les AGPI n-3, qui se distinguent par la position de leur première double liaison à partir de l'extrémité méthyle (entre le 6ème et 7ème carbone pour les AGPI n-6 ; entre le 3ème et 4ème carbone pour les AGPI n-3) (GUESNET et *al.*, 2005).

Contrairement aux précurseurs d'autres familles minoritaires d'AGPI (les n-7 et les n-9), les précurseurs de ces 2 familles, l'acide linoléique (LA, 18 :2n-6) pour les AGPI n-6 et l'acide α -linolénique (ALA, 18 :3n-3) pour les AGPI n-3 ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme, ils doivent être apportés par l'alimentation (LAVAILLE et LAYE, 2010).

I.2.2 Nomenclature des AGPI

Différentes nomenclatures sont employées pour désigner le nombre et la position des doubles liaisons.

Les physiologistes caractérisent les AG au moyen d'une nomenclature dans laquelle apparaissent successivement le nombre d'atomes de carbone, le nombre de doubles liaisons et la position du premier double liaison numérotée à partir de l'extrémité méthyle terminale.

La nomenclature des chimistes se distingue de la précédente par le fait que la position des doubles liaisons est numérotée en comptant les atomes de carbone à partir de l'extrémité carboxyle (numérotation en D), qui est la fonction biologiquement active de tous les AG. (GUESNET et *al.*, 2005).

Ainsi la nomenclature abrégé est (A : x wy) ou (A : x Δ z) avec A correspondant au nombre de carbones, x le nombre d'insaturations, y la position de la première insaturation numérotée à partir de l'extrémité méthyle terminale (notation utilisée par les physiologistes) et z la position des doubles liaisons à partir du premier carbone (notation utilisée par les chimistes) (FERREIRA et *al.*, 2013).

La Figure 5 représente structure et nomenclature des principales familles d'acides gras.

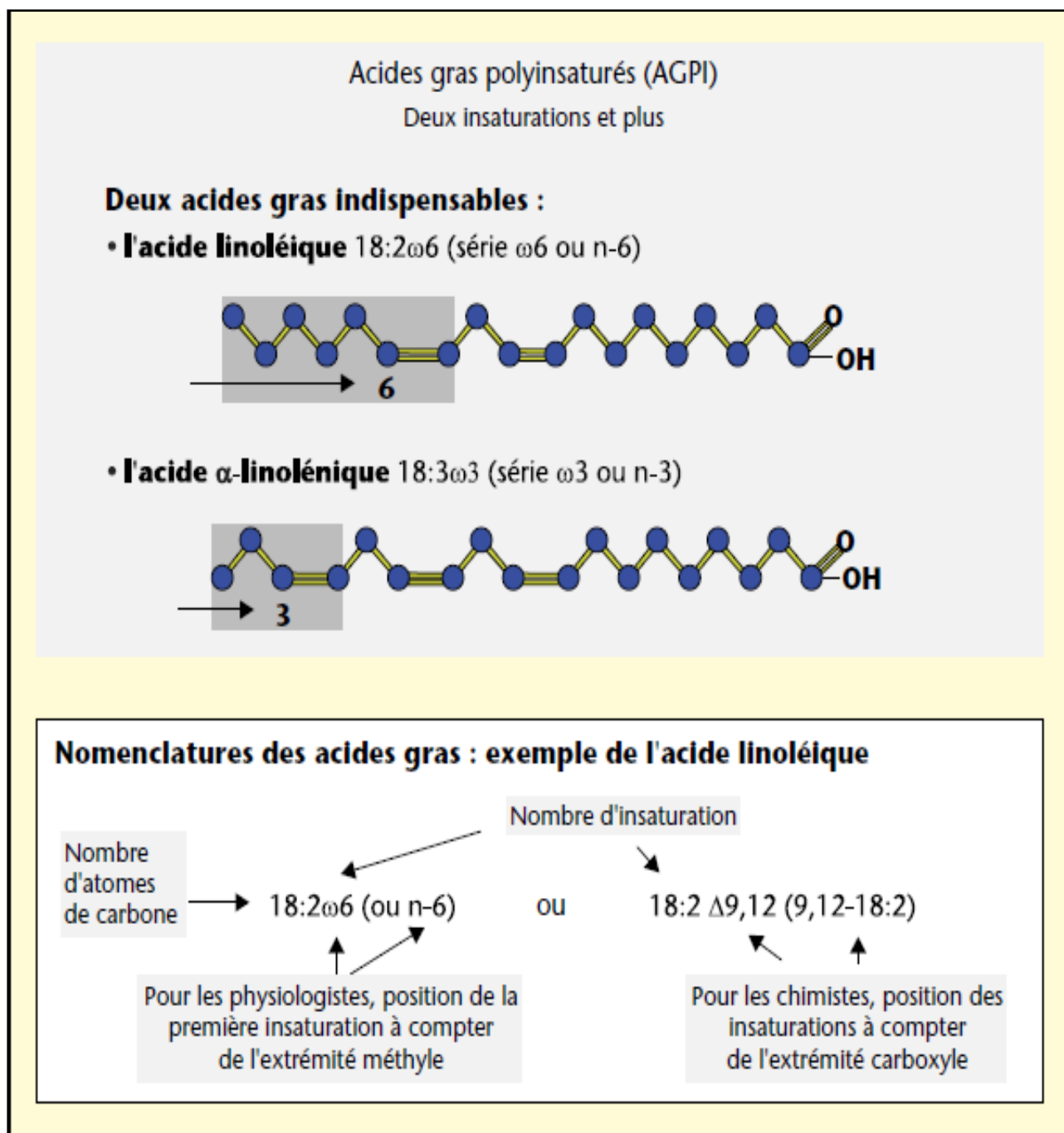


Figure 5 : Structure et nomenclature des principales familles d'AG (GUESNET et *al.*, 2005).

I.2.3 Le caractère essentiel et indispensable des AGPI n-3 et n-6

En 1929, BURR et BURR constatent que des rats soumis à un régime sans corps gras présentent de sévères anomalies physiologiques : retard de croissance, troubles cutanés, dysfonctionnement rénal et perte des fonctions de reproduction, et lorsque les lipides sont réintroduits à nouveau dans l'alimentation, ces perturbations disparaissent. De même, ils

découvrent que ce syndrome n'est pas dû à une carence en corps gras, mais surtout à l'absence d'un type bien déterminé d'AGPI : l'acide linoléique. (GUESNET et *al.*, 2005).

Concernons l'acide α -linolénique, c'est vers les années 1970 que des recherches ont montré qu'une carence prolongée du régime en cet AG, portant sur plusieurs générations, occasionnait des troubles de la vision et des fonctions cérébrales chez le rat. Chez l'homme, l'essentialité de ALA n'a été établie qu'en 1982 (HOLMAN et *al.*, 1982). C'est donc pourquoi ces deux acides LA et ALA sont appelés acides gras essentiels (AGE).

Appeler aussi AG indispensables car les cellules de mammifères sont dans l'incapacité métabolique de les synthétiser car elles ne possèdent pas, contrairement aux cellules végétales, les désaturases permettant d'introduire des doubles liaisons à l'extrémité méthyle, à savoir les $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases qui génèrent successivement AL et ALA à partir de l'acide oléique (18:1n-9) (GUESNET et *al.*, 2005).

I.2.4 Le métabolisme des acides gras polyinsaturés

Une fois que LA et ALA ont été obtenus dans l'alimentation, ils peuvent être convertis en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) C20 et C22 des séries n-6 et n-3 par le biais d'une série de réactions alternant désaturation et élongation localisé au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule. Le mécanisme ne requiert que des $\Delta 6$ -désaturases et $\Delta 5$ -désaturases, une élongase du système microsomal et une étape de raccourcissement de la chaîne comprenant une β -oxydation dans les peroxysomes (MOORE et *al.*, 1995 et SPRECHER, 2002) (Figure 6).

La première étape est la création d'une double liaison en position $\Delta 6$ du LA et de l'ALA grâce à la $\Delta 6$ -désaturase, suivie d'un allongement de chaîne avec deux nouvelles unités carbonées sous l'effet de l'élongase, et l'insertion d'une autre double liaison en $\Delta 5$ par la $\Delta 5$ -désaturase pour former les acides arachidonique (20:4n-6 ou ARA) et eicosapentaénoïque (20:5n-3 ou EPA), respectivement.

La deuxième étape voit l'allongement de l'ARA et de l'EPA avec deux unités carbonées supplémentaires pour donner 22:4n-6 et 22:5n-3 (DPA n-3), respectivement. Un allongement supplémentaire de 22:4n-6 et 22:5n-3 avec deux carbones produit 24:4n-6 et 24:5n-3, respectivement. Ces AGPI C24 sont alors désaturés par la $\Delta 6$ -désaturase pour obtenir 24:5n-6 et 24:6n-3. Il s'agit de la même enzyme désaturase qui permet la désaturation du LA et de l'ALA (D'ANDEA et *al.*, 2002).

Le docosahexaénoïque (DHA) est formé à partir de 24:6 n-3 par perte de deux carbones de la chaîne carbonée au cours d'un cycle de β -oxydation peroxysomale. Ce même mécanisme de raccourcissement de chaîne permet d'obtenir 22:5n-6 à partir de 24:5n-6. Les deux mécanismes sont mutuellement indépendants, et il n'y a pas de réactions croisées. Cependant, comme ces mécanismes font appel aux mêmes enzymes, les deux séries sont concurrentes en termes de conversion. Puisque l'acide linoléique est le principal AGPI dans l'alimentation humaine et que les apports en ALA sont généralement bas, les concentrations plasmatiques et cellulaires d'AGPI-LC n-6 dérivés de l'acide linoléique tendent à être supérieures à celles des AGPI-LC n-3.

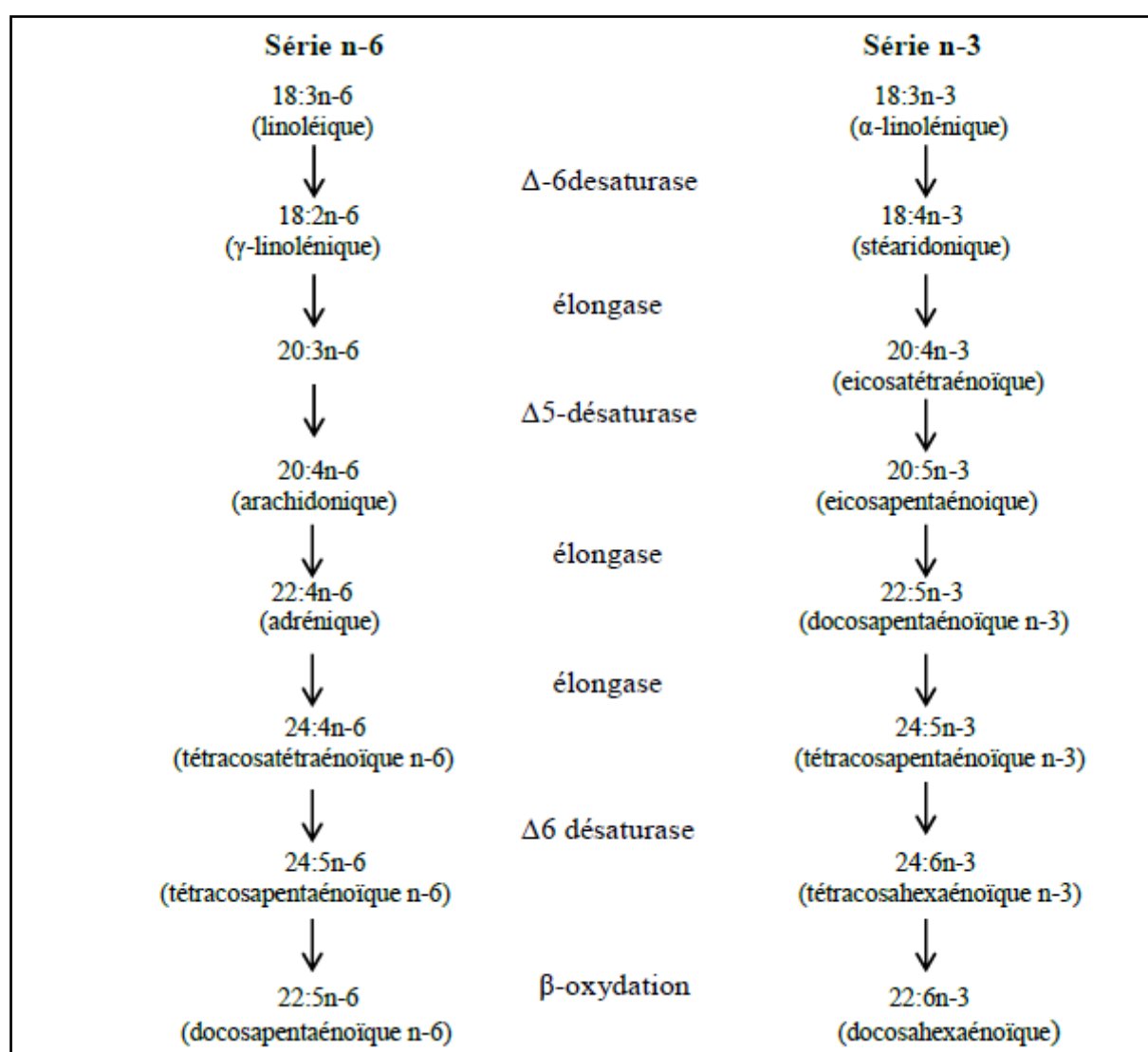


Figure 6: Voies métaboliques de conversion des acides linoléique et α -linolénique alimentaires en leurs acides gras polyinsaturés à longue chaîne (DALONGEVILLE et al., 2010).

I.2.5 Rôle des AGPI

I.2.5.1 Rôle structural

Les AG sont les composants de base des PLs des membranes cellulaires. Ils jouent donc un rôle majeur dans les propriétés physicochimiques et fonctionnelles de la plupart des membranes, contrôlant en particulier l'activité de récepteurs (tels que le récepteur de l'insuline) ou d'enzymes.

Les propriétés physicochimiques des membranes sont en grande partie déterminées par la longueur de la chaîne et le degré d'insaturation de leurs AG; plus les PLs sont riches en AGPI, plus la membrane sera fluide. En effet, les AGPI ont une configuration tridimensionnelle complexe, conférée par leurs insaturations qui introduisent des coudes dans la molécule. Ainsi, alors que les AGS sont linéaires, les AGMI présentent un coude et les AGPI, plusieurs. Incorporés dans les PLs membranaires, les AGPI occupent un volume plus important que les AGS, rendant la membrane moins compacte et augmentant ainsi sa fluidité. Au final, une modification des rapports entre les acides gras dans les membranes peut se répercuter sur leurs propriétés physicochimiques et donc sur le fonctionnement des cellules (HERMIER, 2010).

I.2.5.2 Rôle de médiateurs lipidiques

Si les AGPI sont d'importants constituants membranaires, ils sont également continuellement libérés des phospholipides membranaires sous l'action des phospholipases A2 (PLA2) (FAROOQUI et HORROKS, 2006).

Une fois libres, les AGPI sont pour la majorité réincorporés dans les phospholipides membranaires (CHEN *et al.*, 2008). Mais ils peuvent également être convertis en médiateurs oxygénés appelés eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes et lipoxines) et docosanoïdes (résolvines et neuroprotectines), qui sont synthétisés respectivement à partir d'AGPI à 20 carbones (EPA ou ARA) ou à partir du DHA (FAROOQUI *et al.*, 2007 ; ORR et BAZINET, 2008). Ces dérivés jouent un rôle de messagers cellulaires et sont impliqués notamment dans les processus d'inflammation (FUNK, 2001 ; FAROOQUI et HORROKS, 2006).

I.2.5.3. Régulation de la transcription

Les AG et leurs métabolites régulent l'expression d'un certain nombre de gènes via des facteurs de transcription tels que les SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein), PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), RXR α (retinoid X receptor) ou LXR α (Liver X Receptor) (GUESNET *et al.*, 2005).

Cette action des AGPI alimentaires sur l'expression génique est extrêmement rapide et s'effectue de manière directe par liaisons avec les facteurs de transcription ou de manière indirecte en inhibant la transcription du récepteur ou sa fixation au gène d'intérêt (SAMPATH et NTAMBI, 2004).

Le Tableau II montre les principaux rôles physiologiques exercés par les AGPI.

Tableau II: les principaux rôles physiologiques exercés par les AGPI (GUESNET et *al.*, 2005).

Acide gras (appellation commune)	Formule	Rôles physiologiques et/ou nutritionnels majeurs
Acide linoléique	18 :2 ω 6	AGPI essentiel et précurseur métabolique ω 6. Rôle structural comme constituant majeur des PLs membranaires
Acide γ - linolénique	18 :3 ω 6	Effet anti-inflammatoire
Acide dihomog γ - linolénique	20 :3 ω 6	Précurseur des prostanoïdes de la série 1
Acide arachidonique	20:4 ω 6	Rôle structural comme constituant majeur des lipides de structure. Précurseur des prostanoïdes de la série 2 et de leucotriènes de la série 4, des hydroxydes, des lipoxines, etc.
Acide docosapenténoïque	22 :5 ω 6	Constituant des phospholipides membranaires en situation de déficit alimentaire en ω 3
Acide α linolénique	18 :3 ω 3	AGPI essentiel et précurseur métabolique ω 3. Effet anti-athérogène.
Acide eicosapentaénoïque	20 :5 ω 3	Précurseur des prostanoïdes de la série 3 et des leucotriènes de la série 5, effet anti-athérogène, hypotriglycéridémiant, anti-inflammatoire, etc.
Acide docosahexaénoïque	22:6 ω 3	Rôle structurale comme constituant majeur des lipides de structure du système nerveux central

I.2.6 Sources alimentaires des AGPI

Les AGPI de notre alimentation proviennent de sources végétales et animales. Les huiles végétales sont particulièrement riches en précurseurs LA et ALA et sont donc les principales sources alimentaires de ces AGPI (Tableau III), elles couvrent entre 30 et 40% des apports quotidiens en ces AGPI de l'homme. LA est présent dans l'ensemble des huiles végétales comme celle de tournesol, de maïs et d'arachide (BOURRE, 1994).

ALA, quant à lui, est plus présent dans les huiles de colza, de noix, et de soja. ALA est contenu en moindre quantités dans certains légumes verts tels que l'épinard ou la mâche (Tableau III) (SIMOPOULOS et SALEM, 1986).

Tableau III: teneur (mg /100g) en acides gras linoléique et α -linoléique des principales huiles d'origine végétale et animale (MARTIN et *al.*, 2001).

Origine alimentaire (végétale et animale)	Acides gras essentiels (mg/100 g)	
	AL (n-6)	ALA (n-3)
-arachide	20 à 29	Traces
- colza		90
- maïs	55	
- noix	69à78	3 à 13
- olive	7	traces
- pépin de raisin	70	Traces
- soja	50 à 60	6 à 10
- tournesol	55 à 65	Traces
-bœuf	2	0.5
-poisson		Contient des dérivés
-porc (saindoux)	8	Contient des traces
-beurre	3 à 5	
-lait	4 à 8	

I.2.7 Recommandation nutritionnel en AGPI

I.2.7.1 Apports nutritionnels conseillés

Sur la base de données bibliographique acquise à partir d'études épidémiologiques ainsi que sur des modèles animaux et in-vitro, l'agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa), maintenant désignée sous le nom de l'agence nationale de sécurité sanitaire

de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), a mis à jour en 2010 les valeurs des apports nutritionnels conseillés (ANC) pour les AG. Ces recommandations nutritionnelles sont basées sur le calcul des besoins physiologiques de chaque classe d'AG tout en considérant leurs implications physiopathologiques. Ces ANC définissent, en tenant compte de l'âge et de l'état physiologique du sujet, une fourchette d'apport pour les acides gras totaux ainsi que des valeurs d'apport en précurseurs LA et ALA et de l'ensemble des AGPI-LC, comprenant notamment le DHA. Ces données sont présentées dans le Tableau IV.

Ainsi, les données disponibles ont conduit à définir chez l'adulte, d'après les besoins physiologiques et optimaux, un apport en lipides totaux de 35 à 40% de l'apport énergétique total (BELLOVENO et *al.*, 2003). Chez l'Homme adulte en bonne santé ayant un apport énergétique de 2000 kcal/jour, les ANC établis pour le LA et l'ALA correspondent respectivement à 4% et 1% de l'apport énergétique total soit un apport en LA de 8 g/jour et un apport en ALA de 2 g/jour. Ces valeurs impliquent donc le maintien du ratio LA/ALA strictement inférieur à 5 afin d'éviter une compétition excessive entre les AG de la série n-6 et les AG de la série n-3.

Concernant les AGPI-LC, les ANC établis pour l'EPA et le DHA sont de 250 mg/jour pour chacun d'eux, ce qui représente un apport de 0.25% de l'apport énergétique total pour la somme EPA+DHA (Anses, 2011).

Tableau IV : les apports conseillés en acides gras chez l'adulte (MARTIN, 2001).

En MJ/j (kcal/j)		AGS	AGMI	ω 3	ω 6	AGPI-LC	Dont DHA	Total
Homme adulte 9,2 (2200)	g/j	19.5	49	10	02	0.5	0.12	81
	% AET	8	20	4	0.8	0.2	0.05	33
Femme adulte 7,5 (1800)	g/j	16	40	8	1.6	0.4	0.1	66
	% AET	8	20	04	0.8	0.2	0.05	33
Femme enceinte 8,6 (2050)	g/j	18	45.5	10	02	1	0.25	76.5
	%AET	8	20	4.4	0.9	0.4	0.1	33.7
Femme allaitante 9,4 (2250)	g/j	20	50	11	2.2	1	0.25	84.2
	%AET	8	20	4.4	0.9	0.4	0.1	33.7
Sujet âgé 7,1 (1700)	g/j	15	38	7.5	1.5	0.4	0.1	62.5
	%AET	8	20	4.4	0.9	0.4	0.1	33.7

I.2.7.2 Situation de la consommation en AGPI

Différentes études ont permis de fournir des éléments sur les niveaux de consommation en LA et ALA pour la population française : Transfair (HULSHOF et *al.*, 1999), Aquitaine (COMBE et BOUE, 2001), SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux Anti-oxydants) (HERCBERG et *al.*, 2004) et INCA (Insuffisance Cardiaque) (RAZANAMAHEFA et *al.*, 2005).

Il ressort de ces études que l'apport moyen en ALA (environ 0,6 g/j pour Transfair, 0,7g/j pour Aquitaine, 1 g/j pour SU.VI.MAX et 0,1 g/j pour INCA) est insuffisant et très loin de couvrir l'ANC défini pour cet acide gras (2,2 g/j). Par opposition, les apports moyens en LA sont plus de dix fois supérieurs aux apports en ALA ; Il en résulte donc un ratio d'apports des précurseurs trop élevé au sein de la population française; autour de 14 au lieu de 5. Ce ratio est doublé au niveau du tissu adipeux, traduisant un stockage deux fois plus faible de l'ALA comparé au LA (COMBE et BOUE, 2001).

Concernant les apports en AGPI-LC, notamment de la série oméga 3, il existe très peu de données de consommation pour la population française. L'étude SU.VI.MAX a permis de montrer sur la cohorte étudiée (4884 sujets) que l'apport moyen en EPA était de 150 mg/j pour les hommes et 118 mg/j pour les femmes (contre 250 mg préconisé par les ANC 2010). Quant au DHA, la consommation moyenne était de 273 mg/j et 226 mg/j pour l'homme et la femme respectivement (ASTORG et *al.*, 2004).

La source majoritaire d'AGPI-LC n-3 étant constituée par les produits de la mer, une étude a montré que les 5 poissons les plus contributifs aux apports en DHA en France sont le saumon (47,6 mg/jour/personne), la sardine (28,4 mg/jour/personne), le thon (20,5mg/jour/personne), le maquereau (15,7 mg/jour/personne) et le hareng (12,4mg/jour/personne), qui fournissent ensemble 63% des apports en DHA (BOURRE et PAQUOTTE, 2007).

Le déséquilibre alimentaire entre les deux familles d'AGPI n-3 et n-6 est également retrouvé dans d'autres pays industrialisés tels que l'Australie (MEYER et *al.*, 2003) ou les Etats-Unis (KRIS-ETHERTON et *al.*, 2000).

Le Tableau V donne une estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation de la population française.

Tableau V : Estimation du rapport moyen LA/ALA dans l'alimentation de la population

Population	Rapport LA /ALA	Etudes
300 hommes 463 Femmes	}] > 13,8	Transfair (1995 – 1996) (HULSHOF et <i>al.</i> , 1999)
61 femmes parturientes 79 femmes non parturientes	}] 15	Aquitaine (1996 – 1999) (COMBE et BOUE, 2001)
	11,1	SU.VI.MAX (1994 – 2002)
2119 hommes 2889 femmes	10,8	(HERCBERG et <i>al.</i> , 2004)
	11,5	INCA 1 (1998 – 1999)
1985 adultes (> 15 ans) 1018 enfants (3 – 14 ans)	12,7	(RAZANAMAHEFA et <i>al.</i> , 2005)
	}] 17,6	INCA 2 (2006 – 2007)
2624 adultes (> 15 ans) 1018 enfants (3 – 14 ans)		

I.2.7.3. Importance du rapport n-6/n-3

L'essentiel de la consommation des AG n-3 et n-6 réside dans un rapport adéquat, ce qui est loin d'être le cas dans l'alimentation occidentale (Tableau VI). Le rapport LA/ALA est estimé à 10/1 voir à 15/1 en Europe alors qu'il devrait idéalement tendre vers 5. Les omégas 3 et les omégas 6 entrent en compétition au niveau des enzymes responsable du métabolisme des AGPI (élongase et désaturase). (AFSSA, 2002).

Grâce à de nombreuses expériences chez l'animal, il a pu être démontré que des valeurs trop importantes pour ce rapport étaient préjudiciables à la synthèse et à la disponibilité des acides gras à longue chaîne (EPA et DHA). (LERAY, 2013).

Un excès d'acide gras n-6 dans l'alimentation pourrait donc empêcher l'organisme d'utiliser au mieux les ressources connexes d'acide gras n-3, surtout l'ALA. Une valeur trop

élevé de ce rapport n-6/n-3 pourrait en effet accentuer des troubles physiologiques et contribuer à la survenue de diverses pathologies (LERAY, 2013).

Tableau VI : Rapport oméga 6/ oméga 3 dans plusieurs populations (SIMOPOULOS, 2008).

Population	Rapport LA/ALA
Paléolithique	0.79
Grèce (avant 1960)	1 à 2
Japon (actuel)	4
Inde rurale (actuelle)	5 à 6.1
Inde urbaine (actuelle)	38 à 50
Angleterre et Europe du nord (actuelles)	15
Etats unis (actuels)	16.74

I.3 Les acides gras polyinsaturés et relation avec la santé

I.3.1. Généralité

Les acides gras présents dans les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en AG essentiels que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI présents dans notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies (maladies métaboliques, neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires, obésité).

I.3.2. Effets de la consommation des AGPI n-3 sur la santé

Bien que les AGPI de la famille n-3 et ceux de la famille n-6 soient métabolisés par les même désaturases, ils n'ont pas le même effet sur l'organisme.

Les AGPI de la série n-3 font l'objet de nombreuses études dans la mesure où ils sont associés à des effets positifs dans la prévention d'un certain nombre de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires (MCV), ils préviennent également les troubles inflammatoires, certains cancers, ils ont également un effet anti-arythmique et ils peuvent réduire la teneur en triglycérides plasmatiques (NAU et *al.*, 2010).

I.3.2.1. Maladies cardiovasculaires

Depuis les années 1970, les effets bénéfiques des AGPI n-3 ont été observés sur les MCV (LERAY, 2013)

De très nombreuses études se sont consacrées à l'influence bénéfique de ces AGPI sur les facteurs de risque cardiovasculaire tel que la baisse de l'hypertension artérielle (MORRIS *et al.*, 1993), la réduction de risque d'arythmie cardiaque (KRIS ETHEERTON *et al.*, 2002) et la baisse de taux de triglycérides plasmatiques.

I.3.2.1.1 Maladies coronariennes et l'athérosclérose

Selon les données de l'OMS, l'ischémie cardiaque est la première cause de décès dans le monde (environ 7,2 millions de morts).

Les premières évidences d'un effet bénéfique des AGPI n-3 proviennent de célèbre étude Zutphen conduite en Hollande pendant 20 ans. Cette étude a démontré que la consommation régulière d'un à deux repas de poisson par semaine suffisait à prévenir les maladies coronariennes (LERAY, 2013).

La plus vaste étude épidémiologique effectuée en 1990 par HIRAYAMA dans tout le Japon (plus de 3,8 millions de personnes suivies pendant 17 ans) a permis d'estimer que la consommation quotidienne de poisson diminuait l'incidence mortelle de l'infarctus du myocarde de 20% chez l'homme et de 49% chez la femme, par rapport aux individus qui n'en consomment jamais. Très rapidement, l'incidence favorable de l'injection d'AGPI n-3 sur la morbidité et la mortalité par accident cardiaque a été associée à un ralentissement des symptômes de l'athérosclérose, pathologie vasculaire la plus fréquente dans la société occidentales (LERAY, 2013). Cette maladie est caractérisée par une perte d'élasticité des artères due à la sclérose provoquée par l'accumulation de corps gras (TG et LDL cholestérol (low density lipoprotein). Or, il a été montré que les AGPI n-3 participent à la réduction du taux de TG dans le sang et augmentent le taux de HDL cholestérol (high density lipoprotein) chez les patients atteints d'hypertriglycémie.

I.3.2.1.2 Arythmie cardiaque

Les arythmies représentent les troubles cardiaques les plus fréquents. Elles se manifestent par diverses pathologies : des battements irréguliers, des bradycardies (fréquence cardiaque inférieure à 60/min) ou des tachycardies (fréquence cardiaque supérieure à 100/min) sans justification, des fibrillations ventriculaires ou auriculaires (LERAY, 2013).

Depuis le milieu des années 1990, des études expérimentales chez l'animal de laboratoire ont montré que les AG n-3 ont des effets particuliers sur la régulation du rythme cardiaque (DALLONGEVILLE *et al.*, 2010).

Le mécanisme est cependant mal connu. il est probable que les AG n-3 augmentent la biosynthèse de dérivés eicosanoides moins arythmogènes. De plus, ils induiraient une diminution des AG libres susceptibles d'agir sur les canaux ioniques des cellules cardiaques.

Dans le cas des arythmies, il a été montré une différence d'efficacité entre l'EPA et le DHA (WU et *al.*, 2012).

I.3.2.1.3 Effet sur la pression artérielle

Les AGPI n-3 à longue chaîne réduisent légèrement, mais significativement, la pression artérielle, chez des sujets aussi bien hypertendus que normotendus (GELEIJNSE et *al.*, 2002). Cet effet passerait par une stimulation de la production de monoxyde d'azote (NO), le principal agent responsable de la vasodilatation sanguine (SINGH et *al.*, 2010). Aucun effet significatif sur la pression artérielle n'a été montré jusqu'à maintenant pour l'ALA. Cependant, des études sur des cultures de cellules endothéliales bovines montrent que la production de NO est proportionnelle à la dose d'ALA (HERMIER, 2010).

I.3.2.1.4 Maladies inflammatoires et immunité

Les réactions inflammatoires peuvent être une réponse tissulaire à une blessure ou à une infection bactérienne ou virale. Elle entraîne l'activation de la circulation sanguine et la perméabilité capillaire aux grosses molécules et aux cellules (LERAY, 2013). La réponse immunitaire permet quant à elle d'éliminer les molécules et les agents infectieux présents dans l'organisme. Pour cela, la réponse est générée dans un système particulier de cellules prenant naissance dans la moelle osseuse et migre ensuite dans un système immunitaire secondaire (thymus, rate).

Ces réactions sont déclenchées par des molécules appelées eicosanoïdes, que sont les prostaglandines, les prostacyclines, le thromboxane, les leucotriènes ou encore les lipoxines. Toutes celles-ci sont issues de la lignée des AG n-6 (GOGUS et SMITH, 2010).

Au contraire, les acides gras n-3, notamment l'EPA et le DHA, produisent des dérivés ayant des propriétés anti-inflammatoires : les leucotriènes, le TNF- α , l'IFN- γ , les interleukines, les résolvines ou la neuroprotectine D1. Ces derniers ont montrés des propriétés antagonistes aux médiateurs de l'acide arachidonique et permettent ainsi le ralentissement de l'agrégation plaquettaire et l'atténuation de la réaction inflammatoire.

I.3.2.2 Les AGPI n-3 et le développement de cerveau

Le cerveau est l'organe qui présente la teneur en lipides la plus élevée après le tissu adipeux. Le DHA et l'ARA sont les AGPI-LC qui jouent le rôle le plus important dans la fonction nerveuse. La quantité totale de DHA dans le cerveau augmente de manière considérable durant la croissance du cerveau, que ce soit par l'accroissement de la taille du cerveau mais aussi par la proportion en DHA elle-même qui augmente simultanément (LAURITZEN, 2001).

SVENNERHOLM a démontré que la composition en AG évolue pour chaque phospholipide membranaire dans un cerveau humain normal, même si cette évolution reste mineure après l'enfance (SVENNERHOLM, 1968).

Au cours du développement neuronal, l'action du DHA s'observe à différents niveaux : ajouté au milieu de culture de neurones de l'hippocampe, il induit la croissance des dendrites (CALDERON et KIM, 2004). De plus, chez les animaux soumis à un régime carencé, les neurones sont plus petits que ceux des animaux soumis à un régime équilibré (AHMAD *et al.*, 2002). Contrairement à cela, des études cliniques basées sur l'effet de compléments en DHA dans l'alimentation démontrent que les posologies les plus fortes en Oméga 3 (entre 2 et 4 g par jour) peuvent améliorer les symptômes des troubles psychiatriques sévères (HAAG, 2003).

Chez l'humain enfin, l'importance d'un apport suffisant en AGPI-LC durant le développement mental de l'enfant a fait l'objet de recherches intensives.

I.3.2.3. AGPI n-3 et cancer

De nombreuses études ont montré une relation entre certains cancers et les AG n-3. Toutes ont démontré un effet positif des AG n-3 sur le processus de cancérisation. Les effets ne sont cependant pas tout à fait clairs : les n-3 permettraient de prévenir ou de retarder l'apparition du cancer mais ne réduiraient pas la croissance des tumeurs déjà formées.

De plus, une supplémentation en huile de poissons renforcerait les effets toxiques de la chimiothérapie sur les cellules cancéreuses. En effet, les études de BOUGNOUX *et al.* (2009) en France montrent qu'un prétraitement au DHA (à une dose de 1,8g/j) améliore les résultats de la chimiothérapie chez les femmes atteintes de cancer du sein (BOUGNOUX *et al.*, 2009).

La supplémentation en AG n-3 avant et pendant un traitement par chimiothérapie a ainsi montré des bénéfices, d'autant plus qu'elle n'altère pas les cellules saines de l'organisme.

I.3.2.4 AGPI et acuité visuelle

Le DHA représente 30% des AG totaux de la rétine (BRETILLON *et al.*, 2008). Les fortes proportions de DHA présentes confèrent aux membranes des propriétés à la fois biophysiques (dynamique membranaire, fluidité, perméabilité, épaisseur) et biochimiques (en tant que source primaire de molécules de signalisation). Elles influencent également fortement la dynamique de la communication inter et intracellulaire (LITMAN et MITCHELL, 1996).

En particulier, le DHA est un AG majeur des lipides structuraux constituant les membranes des segments externes des disques des photorécepteurs (FLIESLER et ANDERSON, 1983).

Les déficiences en DHA apparaissent étroitement associées avec des dysfonctionnement structurels et fonctionnels visuel (UAUY et *al.*, 2001). Des études menées chez des rongeurs et des primates ont notamment montré l'existence d'une différence dans la forme des ondes de l'ERG en fonction de l'apport en AGPI n-3 par l'alimentation (JEFREY et *al.*, 2001).

I.3.2. 5. Les AGPI n-3 dans l'obésité et le diabète de type 2

Des études chez des rats et des souris nourris avec un régime hyper-lipidique ou une alimentation lipogénique riche en sucrose ont montré que les AGPI n-3 contrecarrent le développement de l'obésité et de l'insulino-résistance (FLACHS et *al.*, 2005 ; KUDA et *al.*, 2009).

Chez l'homme, les études montrent que les AGPI-LC n-3 permettent de limiter le dépôt de masse grasse chez un sujet obèse (HERMIER, 2010) et améliorer le métabolisme glucidique chez les individus minces en bonne santé (MORI et *al.*, 1999 ; COUET et *al.*, 1997). Bien que les AGPI n-3 semblent avoir peu d'effets sur le contrôle de la glycémie chez des patients diabétiques de type 2, ces AG sont considérés comme étant des constituants diététiques sains pour ces patients en raison de leurs effets bénéfiques sur le profil lipidique plasmatique (MACLEAN et *al.*, 2004).

I.3.2. 6. Effets sur le système nerveux central

La présence de DHA, en concentration élevée, dans les membranes des cellules cérébrales, rend compte de son importance dans le fonctionnement du système nerveux central. Des expériences de carence en DHA, menées sur les rats et les singes, ont mis en évidence que les capacités d'apprentissage et d'attention dépendent de cet AG (LAURITZEN et *al.*, 2001). Au-delà de ces études, des résultats récents suggèrent que des anomalies du métabolisme des AGPI seraient impliquées dans le développement de certains troubles psychiatriques (HORROBIN, 1998), tels que la schizophrénie (BOSCH-BOUJU et LAYE, 2015), la dépression (BLONDEAU et SCHNEIDER, 2006), l'Alzheimer et l'hyperactivité de l'enfant (LAVAILLE et LAYE, 2010).

I.3.3 Effets de la consommation des AGPI sur la santé n-6

Les effets bénéfiques des AGPI n-6 avaient été reconnus. Toutefois, certains travaux suggèrent que leur consommation excessive pourrait inverser les effets bénéfiques et provoquer des risques cardiovasculaires (ROTHROCK et FOSTER, 1990). Chez le nouveau-né nourri uniquement au biberon, il a été observé que 1 % de l'apport énergétique en LA évitait l'apparition des symptômes physiologiques (dessèchement et épaississement de la peau, desquamation) et biochimiques (teneur circulante élevée en acide eicosatriénoïque

(20:3n-9) et réduite en ARA) qui sont caractéristiques d'une déficience alimentaire en AGPI n-6 (HOLMAN et *al.*, 1970).

I.3.3.1. AGPI n-6 et maladies cardiovasculaires

La grande majorité des recherches chez l'homme impliquant les AG n-6 s'adresse à leur rôle possible dans les MCV.

L'AL est l'AG majoritaire, aussi bien dans l'alimentation qu'au niveau de corps humain. Cet AG est considéré de puis longtemps comme hypocholestérolémiant, propriété confirmé ultérieurement par de nombreux travaux utilisant des huiles végétales. Les recherches de KEY Sont permises de quantifier la baisse de cholestérol induite par un apport donnée en AL, ce dernier paramètre étant inclus dans une formule unitaire où il compense les effets inverses des AGS. Des travaux plus précis ont prouvé que l'AL est surtout actif au niveau du LDL cholestérol (LERAY, 2013).

Plusieurs études sont venues pour renforcer l'idée qu'un régime alimentaire avec de fort taux d'AG n-6 par rapport aux AGS, était protecteur contre les accidents d'origine cardiovasculaire. De nombreux travaux ont montrés que l'augmentation de la part de l'AL dans la ration alimentaire est capable d'induire une réduction significative non seulement de la cholestérolémie mais aussi de l'incidence de la mort subite, des infarctus et d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) (LERAY, 2013).

I.3.3.2 AGPI n-6 et obésité

L'obésité est un facteur de risque cardiovasculaire qui est lié à une augmentation substantielle de l'incidence du diabète sucré de type 2, de l'hypertension systémique et de la dyslipidémie, trois pathologies connues comme étant des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires. Les AGPI n-6 semblent être impliqués dans la différenciation des cellules pré-adipocytaires. Une étude récente chez l'animal a montré qu'un régime alimentaire avec un apport d'AGPI n-6 près de 15 fois supérieur à celui des AGPI n-3 bien plus élevé que les recommandations actuelles engendrait une élévation de la masse grasse dans les générations successives des souris (MASSIERA et *al.*, 2010). Ces résultats devront être confirmés chez l'humain.

Introduction

Le lait par ces grandes qualités nutritionnelles a toujours été considéré comme un produit noble, c'est un aliment indispensable pour les premiers mois de la vie et fondamentale dans la vie de l'homme. Le lait est en fait un des aliments les plus complets qui soit. Il est sécrété par les différentes espèces des mammifères, présente des caractéristiques communes et les mêmes nutriments: eau, protéines, lactose, matière grasse et matières minérales. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre.

Le lait de vache occupe une place importante dans l'alimentation humaine. Ses protéines sont extensivement utilisées pour leur propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et leur richesse en acide aminée essentielles.

Le lait reconstitué est un produit obtenu par addition d'eau au produit en poudre ou concentré, en quantité nécessaire pour rétablir le rapport approprié entre l'eau et les matières sèches. Le lait reconstitué est rapidement altérable car la poudre n'est pas stérile et la reconstitution entraîne facilement des contaminations ; il est donc préférable d'effectuer la reconstitution immédiatement avant l'usage. Dans le cas contraire, l'ébullition et la conservation au froid sont nécessaires.

Le lait UHT (ultra haute température) est un lait de longue conservation, obtenu en portant un liquide instantanément à des températures élevées entre 135-150° C durant un bref moment qui rend le produit stérilisé commercialisable, lorsqu' il est combiné à un conditionnement aseptique.

Ce travail est consacré essentiellement d'une part, à l'étude comparative de quelques paramètres physico-chimiques principaux pouvant différencier la composition du lait de vache, du lait reconstitué et du lait UHT et d'autre part, de procéder à l'isolement et la purification des protéines majeures du lait de vache suivi d'une caractérisation électrophorétique.

I. Matériel et méthodes

Cette partie expérimentale est réalisée au sein du Laboratoire pédagogique de Biochimie de la faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques de l'Université MOULOUD MAMMERI de TIZI OUZOU.

I.1. Matériel

I.1.1. Matériel biologique

Lait de vache, lait reconstitué, lait UHT, Sérum albumine bovine (BSA), Enzyme trypsine

I.1.2. Equipement

- agitateurs (de tubes type VORTEX, magnétique) ;
- bain-marie ;
- balance de précision et balance électronique;
- lyophilisateur à plateaux;
- pH-mètre;
- spectrophotomètre;
- unité de chromatographie ;
- unité d'électrophorèse verticale sur mini-cuve comprenant un couleuvre de gel, cuves d'électrophorèse (10 x 08 cm et 10 x 12 cm), générateur de courant, sécheur de gels, plaques en verre, plaques en oxyde d'alumine, espaceurs, peignes et pinces.

I.1.3. Petit matériel

- verrerie (béchers, fioles jaugées, pipettes graduées, burette de précision, éprouvettes, erlenmeyers, tube à essais, burettes, entonnoirs,...) ;
- micropipettes, seringues, gants et masques, coupelles en porcelaine, des tubes Eppendorfs, spatules, micropipette, portoir....) ;
- membranes de dialyse (seuil d'exclusion 8000 Da).

I.1.4. Produits et réactifs spécifiques

-Dosage des protéines : Na_2CO_3 anhydre 2% dans NaOH, 0,1 M, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5%, tartrate de Na et K, 1%, BSA (Albumine Sérique Bovine), réactif de Folin – ciocalteu.

-Dosage des glucides : Acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS), lactose.

-Dosage de la vitamine C : 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP), bicarbonate de sodium (Na_2CO_3), acide ascorbique, acide acétique glacial.

-Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100 : gel de séphacryl S100, tampon tris-HCl 0,02M, pH 8,4, bleu de dextrane.

-L'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine : Tampon tris- HCl, 0,5 M, pH 8, la trypsine.

-Electrophorèse: acrylamide, bis-acrylamide, tétraéthyl-méthylène diamine (TEMED), dodécyl sulfate de sodium (SDS), 2 mercaptoéthanol, bleu de bromophénol, acide trichloracétique (TCA), Tampon tris-HCl, 0,5 M, pH 8,8, bleu de Coomassie R 250), méthanol, Trisma base (Tris), glycine, glycérol 50%, d'acide trichloracétique (TCA), persulfate d'ammonium, acide chlorhydrique (HCl).

I.2 Méthodes

La méthodologie de travail adoptée dans cette étude est récapitulée dans la figure 7 comme suit :

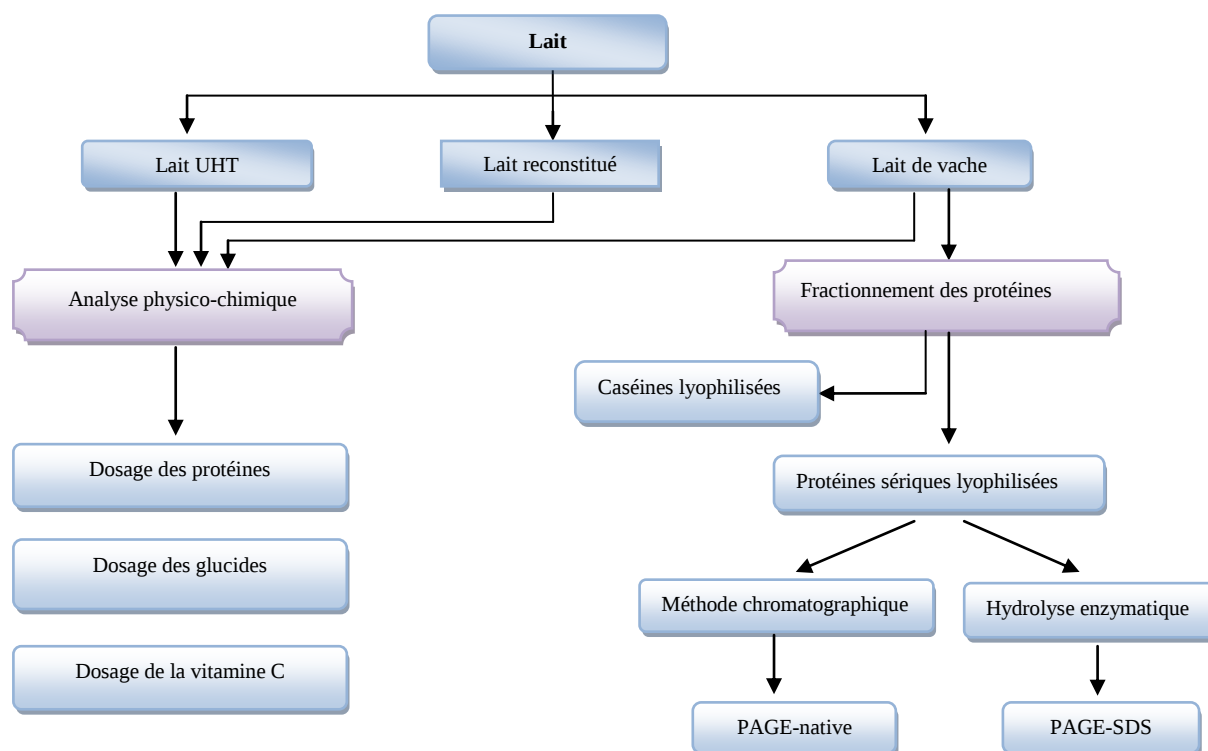


Figure 7 : Procédure expérimentale

I.2.1. Méthodes physico-chimiques

I.2.1.1. Détermination de la teneur en protéines des trois laits

Le dosage des protéines est réalisé par spectrophotométrie selon la méthode de LOWRY et *al* (1951), particulièrement adaptée au cas des protéines du lait (NAKAI et CHI, 1970 ; GEOFFREY et LUCAS, 1983). Elle est facile à mettre en œuvre et assez reproductible.

Le réactif de Folin-Ciocalteu ou acide phospho-tungsto-molybdique, additionné à une solution protéique diluée, est plus au moins réduit par les protéines, notamment les groupements phénoliques du tryptophane et de tyrosine et dans une moindre mesure, ceux de

la cystéine et de l'histidine. Cette réaction donne naissance à un complexe coloré, le bleu de molybdène dont l'intensité peut être mesurée par spectrophotomètre à 750 nm.

La densité optique (DO) lue au spectrophotomètre permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon. Celle-ci est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage, $DO=f(C)$ (Figure 8) établie avec des standards protéiques de sérum albumine bovine (BSA). Le mode opératoire est donné en (annexe 1).

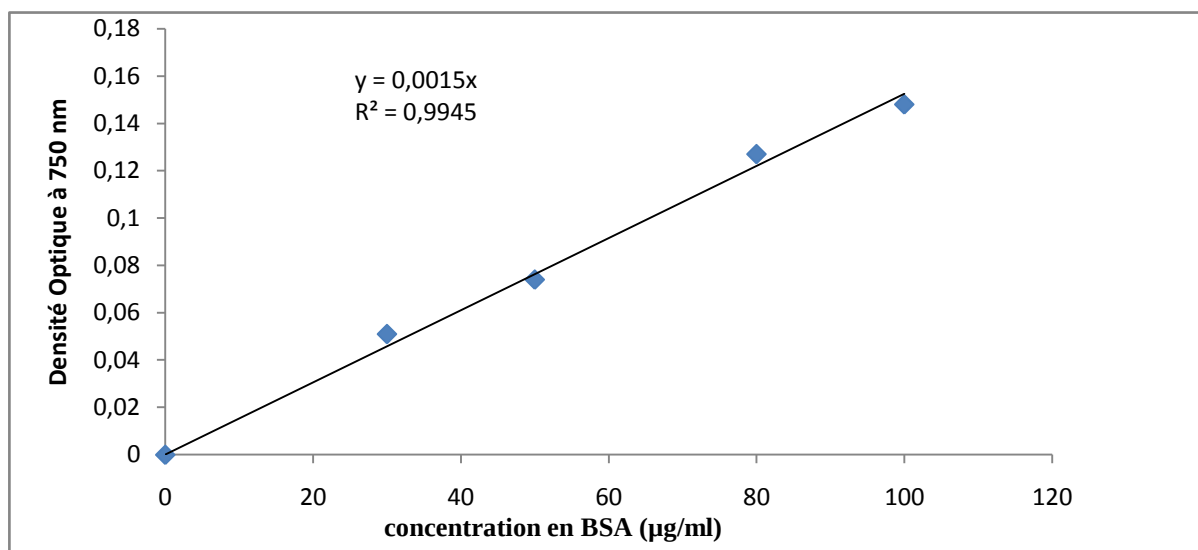


Figure 8: Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951).

L'albumine sérique bovine (BSA) est utilisée comme protéine étalon ;

R^2 = coefficient de corrélation.

I.2.1.2. Dosage des sucres réducteurs dans les trois laits

On classifie généralement les glucides en trois groupes : les monosaccharides, les oligosaccharides et les polysaccharides. Les glucides du lait sont essentiellement constitués de lactose et de quelques autres sucres en faible quantité, dont le glucose. Le lactose est un disaccharide constitué de glucose et galactose. La détermination de la teneur en sucres réducteurs peut être réalisée avec la méthode de dosage par l'acide 3,5 Dinitrosalicylique (DNS) (annexe 2).

L'acide 3,5 dinitrosalicylique (figure 9) réagit avec les oses réducteurs et autre molécules réductrices pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière à 540 nm. Dans cette réaction, la couleur de la solution passe du jaune-orange au rouge. Durant notre étude on utilise les propriétés réductrices du lactose. Les densités optiques

(DO) obtenues permettent de déterminer les concentrations des échantillons analysés en se référant à une courbe d'étalonnage (figure 10).

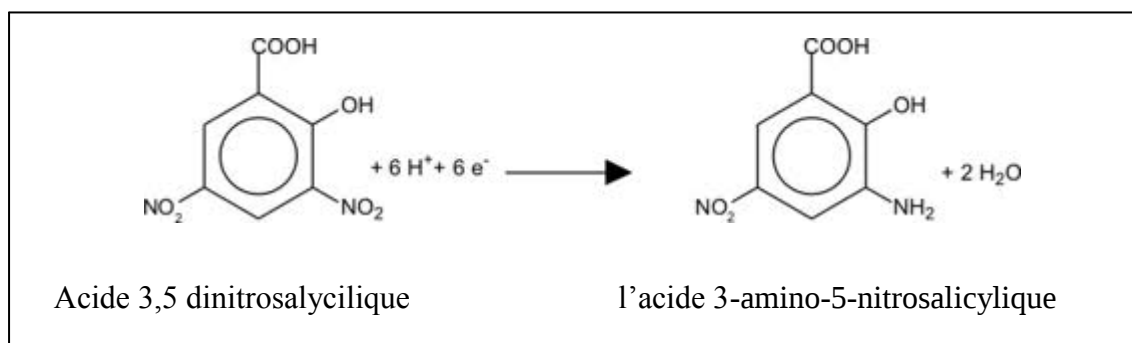


Figure 9 : Transformation de l'acide 3,5 dinitrosalicylique en l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique (AUDIGIE et *al.*, 1995).

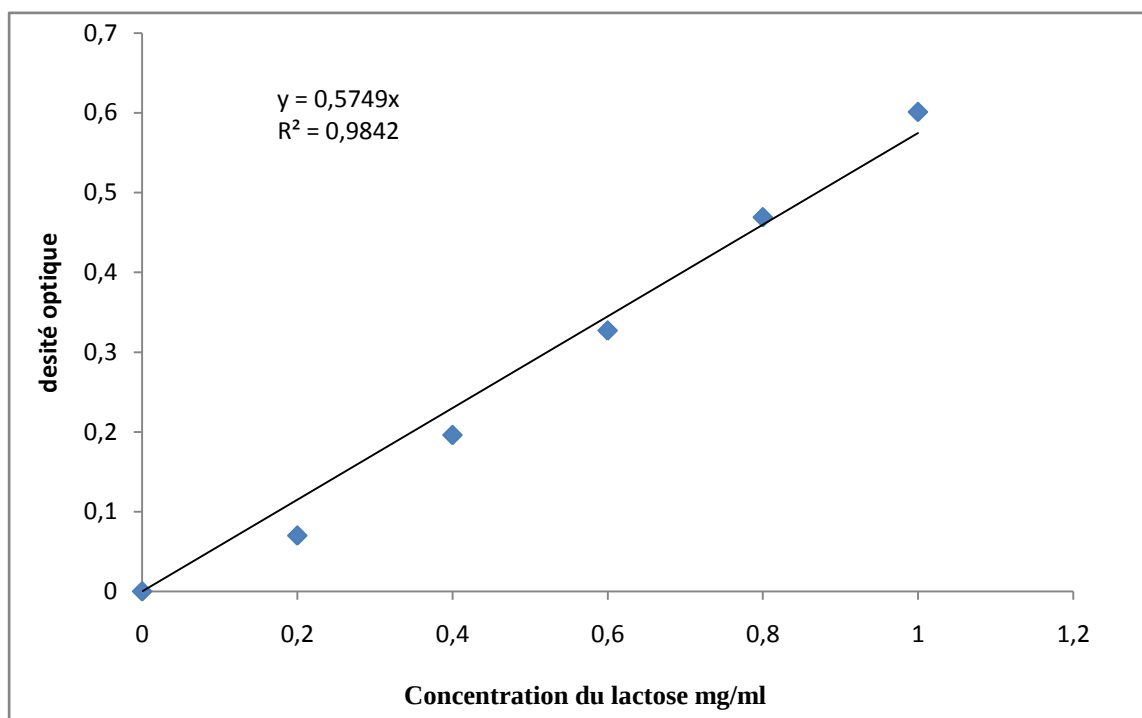


Figure 10 : Courbe étalon du dosage des sucres réducteurs par la méthode au DNS, réalisée avec du lactose comme standard.

I.2.1.3. Détermination de la teneur en vitamine C des trois laits

La vitamine C également appelée acide ascorbique est une vitamine soluble dans l'eau (DUMAIS, 2007). Le dosage de la vitamine C se fait par une méthode titrimétrique à l'aide d'une solution de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) de couleur bleu foncé en milieu neutre (annexe 3).

Le DCPIP a pour particularité, l'oxydation de la vitamine C en milieu acide, ce qui renforce sa stabilité donnant une coloration rose pâle.

Pour réaliser ce dosage, la solution de DCPIP a été étalonnée avec une solution de vitamine C de concentration connue à la qu'elle correspond un volume de DCPIP pris comme référence lors des dosages.

I.2.2. Fractionnement des protéines du lait de vache

-Ecrémage

Cette étape consiste en l'élimination de la matière grasse du lait et obtention du lait écrémé. L'écémage est effectué par centrifugation à 4000 x g pendant 20 min. Le lait est porté préalablement au bain-marie à 30-35°C et agité légèrement pour favoriser la remontée de matière grasse en surface.

-Récupération des protéines sériques et des caséines du lait

L'isolement des caséines est réalisé par précipitation différentielle au pH isoélectrique de cette fraction (pH 4,6). Cette opération est effectuée par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 4N, suivie d'une centrifugation à 4000 xg pendant 15 minutes à 4°C.

Il en résulte deux phase : le culot formé de caséines et le lactosérum correspondant au surnageant.

-La dialyse des protéines sériques des caséines du lait de vache

La dialyse est une technique qui permet de séparer des substances en utilisant leur capacité respective à franchir les pores d'une membrane de dialyse. Cette membrane se présente sous forme de cylindre allongé qu'il faut fermer aux deux extrémités et qui contient le liquide à dialyser (KAMOUN, 1987).

Cette étape permet de débarrasser les échantillons des molécules dont la taille est inférieure à 8000 Da (lactose, sels minéraux, composés azotés non protéiques).

Les échantillons des protéines sériques et de caséines obtenues sont dialysés contre de l'eau distillée pendant 48 à 72 heures à +4°C et sous agitation douce, en utilisant des membranes de dialyse avec un seuil de coupure de 8000 Da. L'eau de contre dialyse est changée 2 fois par jour.

-Congélation et lyophilisation

Après dialyse, les échantillons de protéines sont mis en une fine couche liquide dans des coupelles appropriées puis congelés sous cette forme à -18°C pendant 72 heures. Ils sont déposés sur le plateau du lyophilisateur. Celui-ci permet par sublimation le passage de l'eau directement de l'état solide à l'état gazeux. Les protéines (caséines et protéines sériques) sont alors récupérées sous forme de poudre et conservée dans un dessiccateur pendant une période relativement longue.

La figure suivante représente le protocole d'isolement des protéines du lait

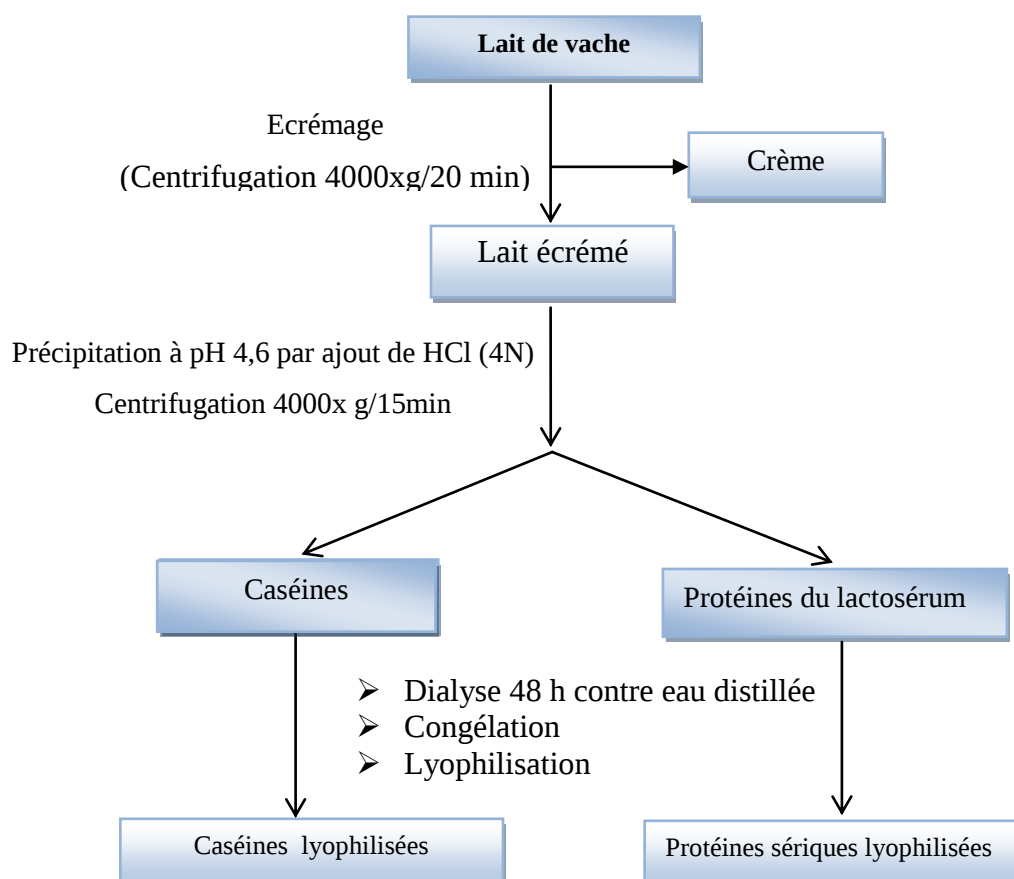


Figure 11: Protocole d'isolement des protéines du lait.

I.2.3. Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100

La chromatographie d'exclusion ou de perméation sur gel permet de séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur forme à travers une phase stationnaire appropriée qui permet d'éluer les entités protéiques dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaires (AUDIGIE et *al.*, 1995).

Les protéines sériques du lait de vache sont fractionnées selon la masse moléculaire en utilisant une phase stationnaire constituée de séphacryl S100 qui est un gel préparé par réticulation covalente d'un allyle de dextrine avec du N, N' méthylène bisacrylamide. La phase mobile utilisée est une solution tampon composée de tris 0,02 M-HCL à pH 8,4 (annexe 4). La figure 12 représente les éléments d'une unité de chromatographie basse pression.



Figure 12 : Photographie d'une unité de chromatographie basse pression.

I.2.4. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques lyophilisées du lait de vache par la trypsine

Le but de cette étape est de connaître la sensibilité des protéines de lait vis-à-vis de l'action de la trypsine et de les couper en plusieurs fragments de faible poids moléculaire. Le protocole expérimental est donné dans l'annexe 5.

La trypsine est une protéase à serine qui renferme dans sa structure primaire 230 résidus acides aminés (24 KDa). Elle est active au pH7 à 8 et à une température de 37°C. La trypsine possède un mécanisme catalytique nécessitant une triade d'acides aminés (Ser¹⁹⁵, His⁵⁷, Asp¹⁰²) pour former le site actif (KOOLMAN et RÖHM, 2001). La trypsine hydrolyse de préférence les liaisons peptidiques où un acide aminé basique tel que l'arginine ou la lysine est engagé par son groupement carboxylique (BHAGWWANDIN et *al.*, 2003 ; SZMOLA et *al.*, 2003).

L'application de la trypsine dans l'industrie alimentaire est limitée à cause du goût très amer qu'elle entraîne (RAO et *al.*, 1998).

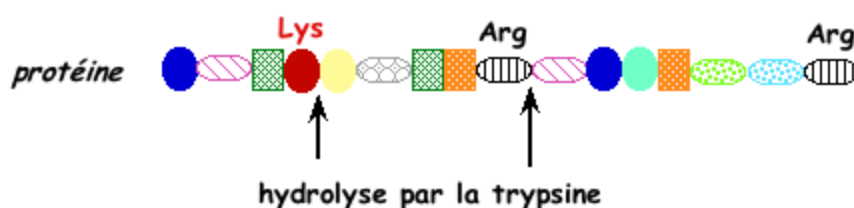


Figure 13: Mécanisme d'action de la trypsine (JASPARD, 2008).

I.2.5. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse désigne une méthode d'analyse et de fractionnement, basée sur la migration différentielle de particules chargées (dans ce cas les protéines) sous l'effet d'un champ électrique (AUDIGIE et *al*, 1995).

I.2.5.1.Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

La séparation des particules dans un champ électrique est souvent réalisée sur des supports solides (papier, agarose, acétate de cellulose et polyacrylamide). Parmi ces supports, le gel de polyacrylamide est l'un des plus utilisés en raison d'un certain nombre d'avantages qu'il assure :

- transparence du gel, permettant une analyse quantitative des protéines par densitomètre ;
- reproductibilité élevée et facilité de mise en œuvre;
- possibilité de servir comme tamis moléculaire.

Le gel de polyacrylamide est formé suite à une polymérisation entre des monomères d'acrylamide (C_3H_5ON) formant de longue chaîne et son co-monomère le N,N' méthylène-bis-acrylamide ($C_7H_9N_2O_2$), formant des ponts inter-chaînes en présence du persulfate d'ammonium et d'un catalyseur tel le N, N, N', N' tétraméthyl-éthylène diamine (TEMED).

Le degré de porosité du gel (ou de réticulation) est variable selon les indices T et C choisis selon la relation:

$$T = (a + b/v) \cdot 100 (\%) ;$$

$$C = (b/a + b) \cdot 100 (\%) ;$$

a : acrylamide (g) ;

b : N,N' -méthylène-bis-acrylamide (g) ;

v : volume final de la solution (ml) ;

T : pourcentage de la concentration totale en (acrylamide + bis-acrylamide) ;

C : pourcentage de la concentration en (bis-acrylamide) par rapport au total (acrylamide et bisacrylamide).

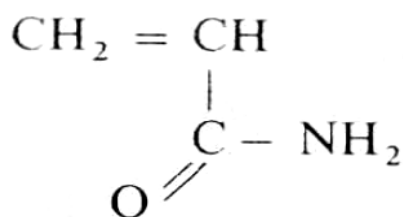


Figure 14 : Un monomère d'acrylamide (AUDIGIE et *al.*, 1995).

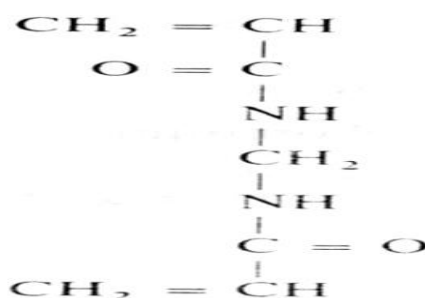


Figure 15 : Une molécule de bis-acrylamide (AUDIGIE et *al.*, 1995).

1.2.5.2. Conditions générales et conduite de l'électrophorèse

Le gel est préparé en mélangeant les solutions d'acrylamide et de bisacrylamide avec une solution tampon. L'ensemble est dégazé puis additionné des agents initiateurs (le persulfate d'ammonium et de TEMED). Le mélange est immédiatement coulé entre 2 plaques (en verre et en alumine) séparées par des espaceurs et enfin un peigne y est introduit permettant la formation des puits après polymérisation du gel.

2.2.5.2. 1. Préparation des échantillons destinés à l'analyse électrophorétique

Les échantillons à analyser sont dissous à raison de 1 à 2 mg/ml dans un tampon approprié et additionnés du bleu de bromophénol qui est un indicateur coloré qui détermine le front de migration des protéines et permet de repérer la fin de l'électrophorèse.

1.2.5.2. 2. Dépôt des échantillons dans le gel et mise sous tension

Les échantillons ainsi préparés sont déposés à raison de 10 à 20 µl dans chaque puits après avoir monté sur l'unité d'électrophorèse les deux plaques renfermant le gel et remplis les cuves inférieures et supérieures de tampon d'électrode. L'unité est alors mise sous tension, courant et voltage constant : 20 mA, 250 V.

I.2.5.2. 3. Révélation des bandes de migration électrophorétique

A la fin de la migration, le gel est démoulé pour subir les opérations successives suivantes :

- fixation** : réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45min ;
- coloration** : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de coomassie 0.2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (P/V) ;
- décoloration** : réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3.12/1.5/0.37 (V/V/V), voir (annexe 8).

Les différentes étapes de l'électrophorèse sont présentées dans la figure 16.

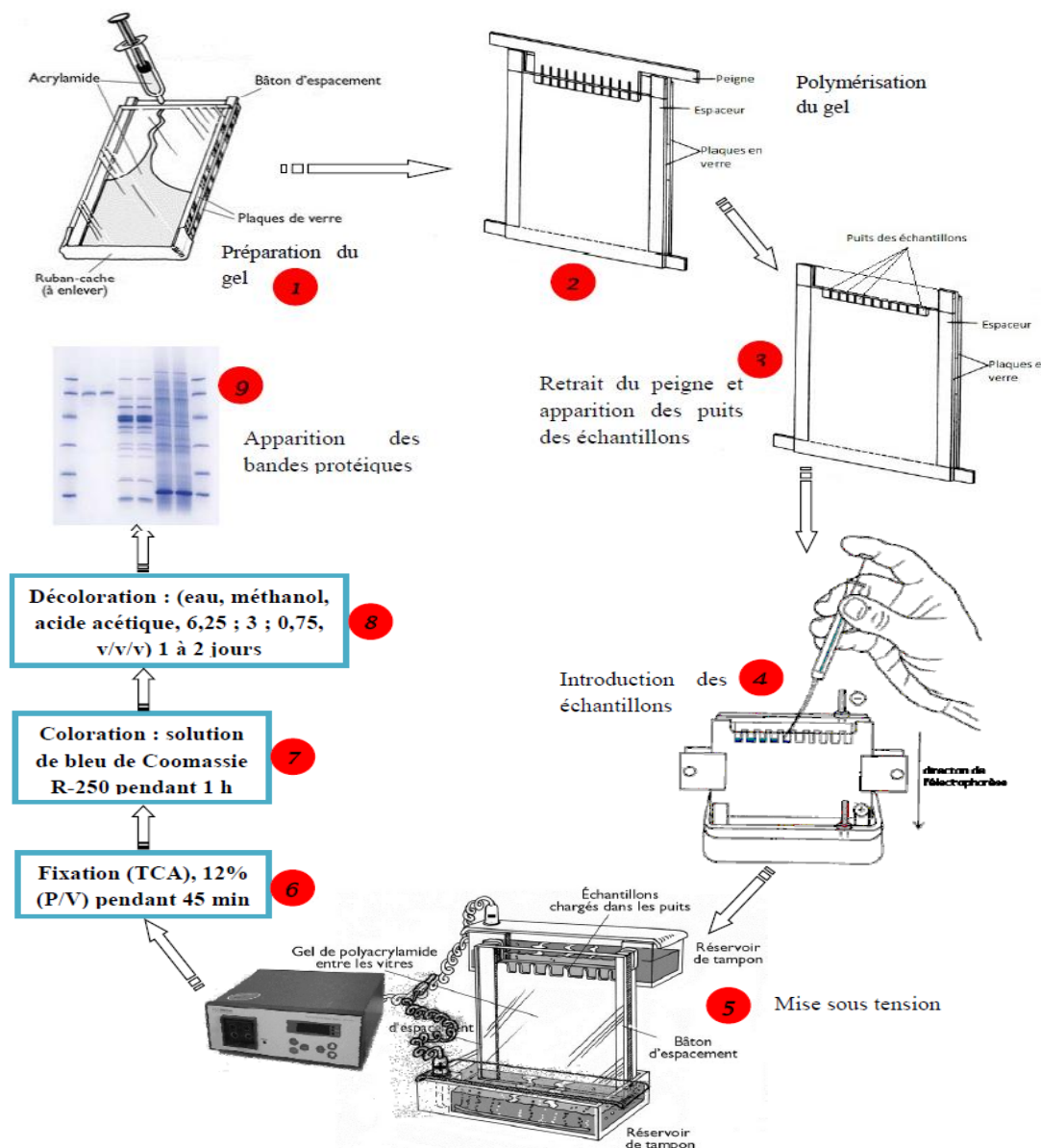


Figure 16 : Les différentes étapes de l'électrophorèse

I.2.5.3. Conditions expérimentales

I.2.5.3.1. PAGE-native (Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes)

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans les conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native) est une méthode particulièrement résolutive pour les protéines sériques du lait. La séparation est basée non seulement sur la taille des protéines, mais aussi sur la forme de la protéine et sa charge.

Sur la base du protocole de HILLIER (1976) (Annexe 6), le gel de polyacrylamide utilisé est de T = 12% et C = 2,7%. Le tampon du gel est composé de (TRIS, 0,75 M, pH 8,9) et celui de l'électrode de (TRIS, 5 mM ; glycine, 77 mM ; pH 8,3). Les échantillons sont dissous à raison de 2 mg/ml dans une solution contenant le tampon du gel (1/10 V/V), de l'eau distillée (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V).

I.2.5.3.2. PAGE- SDS (Electrophorèse en milieu dissociant et dénaturant, en présence de SDS et du 2 mercaptoethanol)

L'électrophorèse (PAGE- SDS) est une technique en gel dénaturant utilisant le dodécyl sulfate de sodium (SDS). Le SDS ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$) est un détergent fortement anionique qui s'associe avec les protéines et leur confère une charge globale négative.

Associé avec le 2-mercaptoethanol, un agent réducteur assurant la rupture des ponts disulfure, le SDS solubilise les protéines et provoque la dissociation des polypeptides. La fixation en excès du SDS sur les protéines permet d'éliminer le facteur de séparation selon la charge. Les différentes protéines seront ainsi différenciées en migration électrophoretique selon leur poids moléculaire.

La PAGE-SDS utilise deux gels :

- un gel de concentration faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage sur les protéines ;
- un gel de séparation où les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire.

Suivant le protocole de LAEMMLI et FAVRE (1973) (annexe 7), nous avons réalisé un gel de concentration (T = 4% et C = 2,7%), en tampon (TRIS - HCl, pH 6,8), dont l'objectif est la concentration des protéines, pour une migration homogène dans le gel de séparation. Ce dernier, se caractérise par (T = 17% et un C = 2,7%), en tampon (TRIS - HCl, pH 8,8).

II.2 Résultats et discussion

II.2.1 Analyse physico-chimique

II.2.1.1 Teneur en protéines totales

Les protéines du lait jouent un rôle essentiel dans notre régime alimentaire journalier, car elles sont consommées en grande quantité soit sous forme de lait de consommation ou produits laitiers (fromages, yaourt,...), ou dans nombreuses préparations alimentaires (plats cuisinés, sauces, pâtisseries, confiseries...). Leur composition équilibrée en résidus d'acides aminés essentiels et leur bonne digestibilité constitue un atout pour les consommateurs (LOUISOT, 1997).

La Figure 17 représente les résultats du dosage des protéines totales par la méthode de LOWRY et *al.* (1951) de trois laits : lait de vache, lait reconstitué et lait UHT. Les teneurs obtenues sont respectivement de $32,46 \pm 0,042$ g/l dans le lait de vache, $28,1 \pm 0,02$ g/l dans le lait reconstitué et de $24,3 \pm 0,096$ g/l dans le lait UHT. Ces résultats montrent que la teneur en protéines totales dans le lait de vache est plus élevée que celle obtenue dans le lait reconstitué. Par contre, le lait UHT reste le plus pauvre en protéines. Cette différence peut être expliquée par une dénaturation des protéines lors du traitement thermique au cours de processus de production. Comparativement aux résultats relevés d'autres travaux sur le lait de vache la concentration qu'on a trouvé est relativement la même obtenue par ALAIS et *al.* (2003) qui est de 32,3 g/l est légèrement inférieure à celle trouvée par COURTET LEYMARIOS (2010) ($33,21 \pm 0,39$ g/l). Cette teneur répond bien à la norme requise (32g/l) et rentre dans la fourchette donnée par FRICKER et POUSSER (1999) qui varie entre 30 à 35g/l. Selon POUGHEON et GOURSAUD (2001), cette teneur en protéines est variable selon : la race, l'âge, la saison, le stade de lactation de la vache, le nombre de traite, la nourriture, le climat, la saison et les critères génétiques.

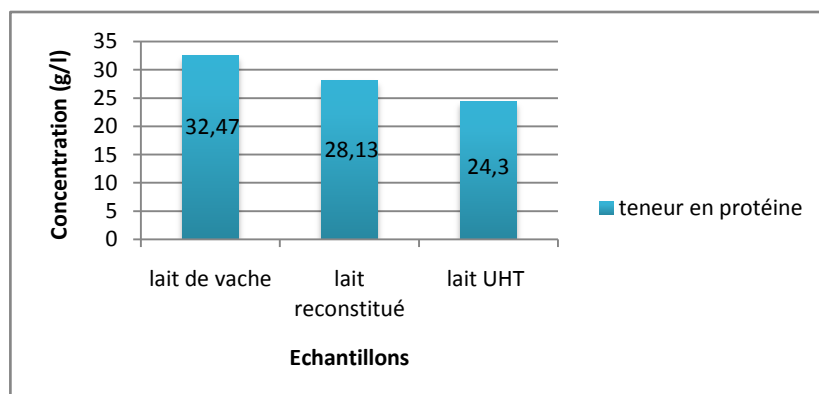


Figure 17: Teneur en protéines dans différents échantillons de lait.

II.2.1.2. Dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

Aliment complet, le lait est une émulsion de matières grasses dans un sérum aqueux qui contient en suspension des protéines (34 g/l) et en solution des glucides (49 g/l), des minéraux, des vitamines et des enzymes (POUGHEON, 2001). Le lactose est le composant le plus abondant dans le lait de vache et le lait de chèvre selon ALAIS (1984).

La Figure 18 représente les résultats du dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) des trois laits : lait de vache, lait reconstitué et lait UHT.

La teneur retrouvée dans le lait de vache est de l'ordre de $(43,55 \pm 0,007 \text{ g/l})$. Cette valeur est inférieure à celle citée par (LEBEUF et *al.*, 2002) et (FARAH et RUEGG, 1989) qui enregistrent des valeurs respectivement égales à 45g/l et 46g/l et à celle donnée par VEISSEYRE (1978) LEMMONIER et *al.* (1995) qui donnent une fourchette de variation du lactose comprise entre 45 et 50g/l. Ces variations dépendent, de la race animale et du stade de lactation (ELLOUZE et KALMOUN, 1989 ; KAMEL et *al.*, 2007). En effet, la teneur en lactose du lait bovin est faible durant le premier jour de lactation puis elle augmente jusqu'à se stabiliser à partir du 5^{ème} jour (KAMEL et *al.*, 2007)

L'analyse des résultats de la figure 21, montre que le lait de vache et le lait UHT présentent des teneurs voisines en lactose et qui sont respectivement de $(43,55 \pm 0,007 \text{ g/l})$ et $(42,68 \pm 0,0007 \text{ g/l})$, alors que le lait reconstitué reste celui qui présente la plus grande valeur qui est de l'ordre de $(50 \pm 0,097 \text{ g/l})$. Cela peut être expliqué par l'utilisation d'une poudre de lait riche en lactose.

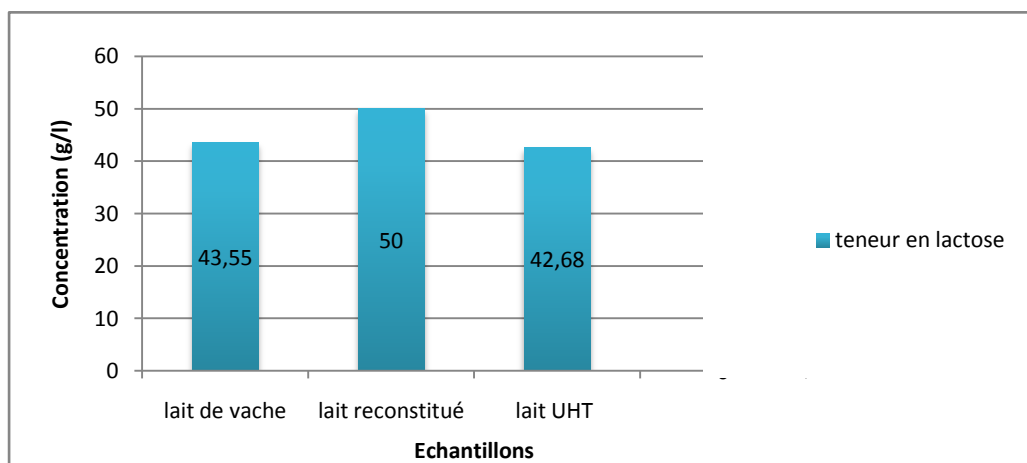


Figure 18 : Teneur en lactose dans différents échantillons de lait.

II.2.1.3. Teneur en vitamine C

Les résultats obtenus du dosage de la vitamine C dans les différents laits : lait de vache, lait de vache pasteurisé et lait UHT sont présentés dans la Figure 19.

La teneur en vitamine C est respectivement de 18,75mg/l pour le lait de vache, 15mg/l pour le lait de vache pasteurisé et 12,5mg/l pour lait UHT. La teneur de la vitamine C est réduite par l'augmentation de la température. De toutes les vitamines, la vitamine C est certainement la plus fragile. Sensible à la lumière, à la chaleur et à l'air, elle est rapidement détruite (MASSOT, 2010).

Comparativement aux valeurs rapportées par (AMIOT et *al.*, 2002) qui donne la moyenne en vitamine C pour le lait de vache à 20mg/l, la teneur qu'on a trouvée est légèrement inférieure. Toutefois, certains auteurs ont enregistré des taux plus faible : 8mg/l (COURTET LEYMARIOS, 2010) ; 14,3mg/l (FARAH et RUEGG, 1989). La concentration en vitamine C varie en fonction de la race animale, du stade de lactation où elle augmente après 180 jours de lactation (MOUHAMED, 2012).

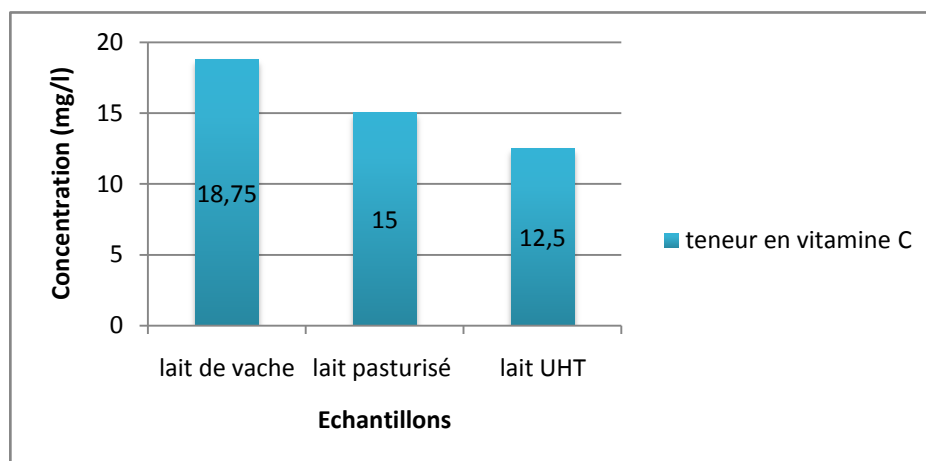


Figure 19: Teneur en vitamine C dans différents échantillons de lait.

II.2.2. Chromatographie d'exclusion moléculaire sur gel de SEPHACRYL S100

A côté des méthodes de fractionnement classiques utilisant le plus souvent la précipitation des protéines par les sels qui aboutissant généralement à des niveaux de pureté faibles, les méthodes chromatographiques sont très indiquées pour l'isolement et la purification des protéines que ce soit en basse ou à haute pression.

Dans le but d'une séparation des protéines sériques du lait de vache, on a réalisé une chromatographie sur gel de perméation (gel de Sephacryl S100) à débit de 0.46ml/min avec

une colonne de 20 cm de longueur et 1 cm de largeur à une longueur d'onde de 280 nm. Après séparation, les protéines sériques ont été éluées comme indiqué dans le chromatogramme suivant (Figure 20) caractérisé par l'apparition de cinq pics d'absorption, d'intensité et de volume différent, notés F1, F2, F3, F4 et F5. Ces dernières ont été contrôlées par une PAGE native.

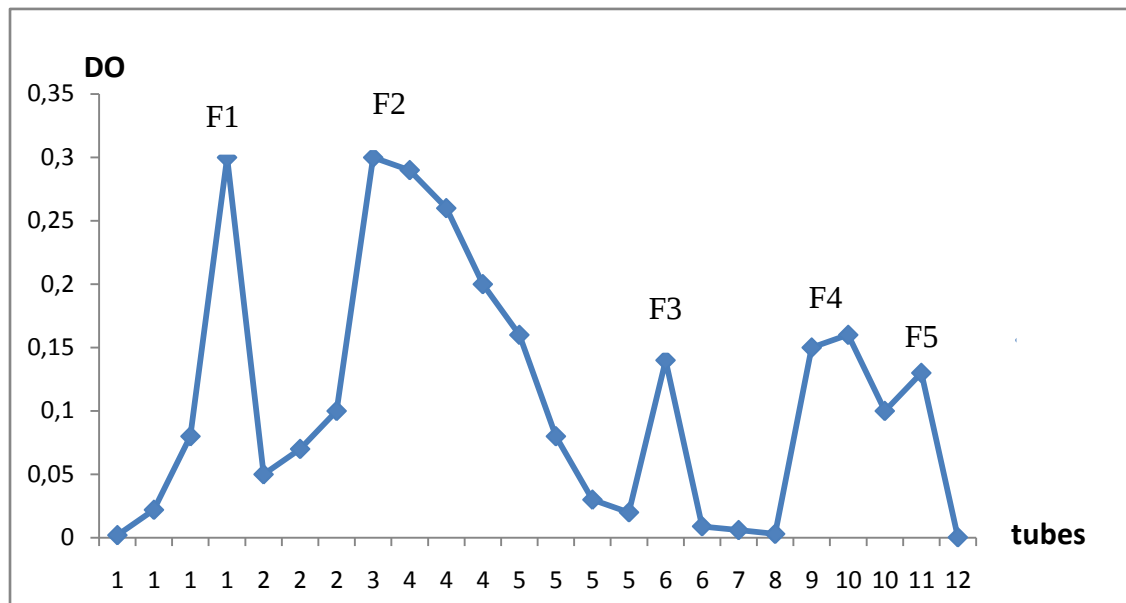


Figure 20: Chromatogramme des protéines sériques du lait de vache sur gel de Sephacryl S100 .

II.2.4. Contrôle électrophorétique en PAGE-native des fractions issues de la chromatographie de perméation

L'électrophorèse en PAGE-native permet de garder les protéines dans leur état natif, ce qui fait de la PAGE-native une technique résolutive et bien adaptée à la séparation des protéines sériques du lait bovin (MATI, 1992). Les molécules sont séparées selon leurs poids moléculaire ainsi que leur charge (WITTIG *et al.*, 2007) et apparaissent sous forme de bande de migration variant par leur position et leur intensité.

Dans ces conditions, les protéines sériques du lait de vache migrent en quatre bandes correspondant dans l'ordre croissant de leur mobilité électrophorétique aux immunoglobulines (Ig), le sérum albumine bovine (BSA), l'alpha-lactalbumine (α -La) et à la fin de migration la bêta-lactoglobuline (β -Lg).

L'électrophorèse en PAGE-native (Figure 21) des différentes fractions issues de la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S 100 montre que :

- Les fractions F1, F5 montre la présence d'une seule bande de faible intensité correspondant à la β -Lg.
- Les fractions F2 et F3 ne présentent aucune bande.
- La fraction F4 présente quatre bandes de forte intensité correspondant aux Ig, BSA, α -La et la β -Lg ;

L'électrophorègramme (figure 21) révèle que :

- on a pu isoler la β -Lg dans la fraction F1 et F5. Les Ig, BSA et α -La n'ont pas pu être isolés avec cette chromatographie ;
- plusieurs protéines sériques, à savoir les Ig, BSA, α -La et la β -Lg étaient présentes dans la fraction F4. Ceci montre une mauvaise séparation de ces protéines en chromatographie de perméation. Par conséquent, il est nécessaire de recourir à d'autres techniques chromatographiques (chromatographie échangeuse d'ions,...) pour une meilleure purification de ces protéines.

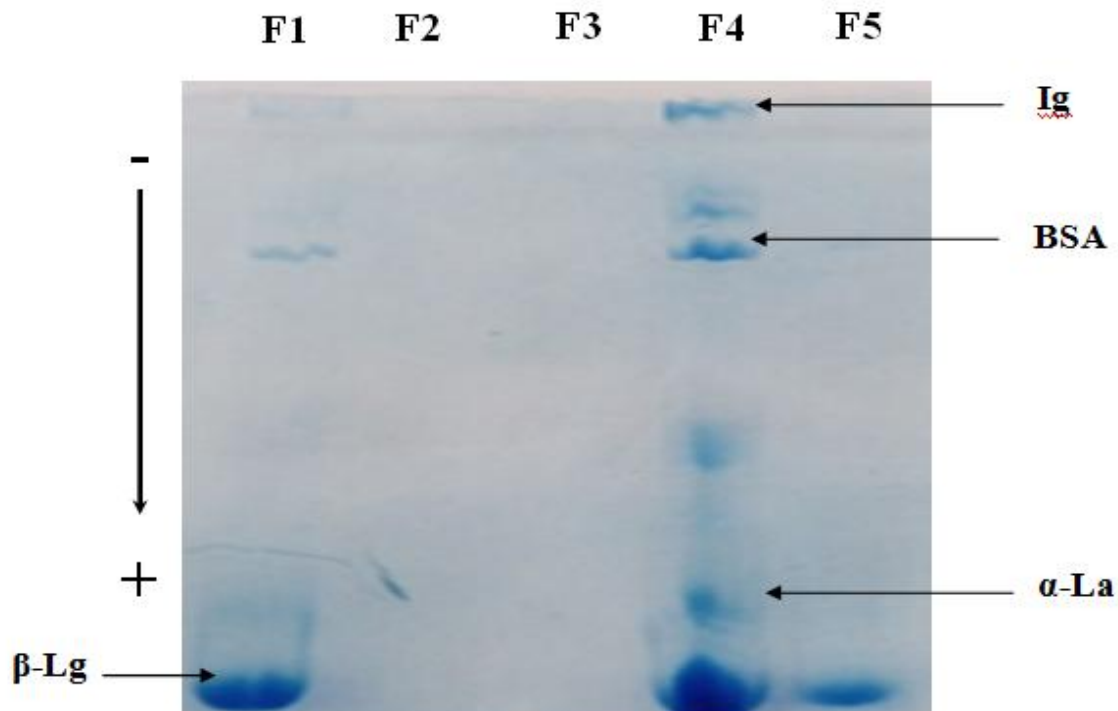


Figure 21: Electrophorègramme des fractions protéiques obtenu après une chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S100.

II.2.5. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques du lait de vache par la trypsine

L'hydrolyse enzymatique consiste à couper les protéines en plusieurs fragments de plus faibles poids moléculaires. La trypsine est une endopeptidase d'origine pancréatique. Elle est active à un pH optimal de 7,7 et à une température proche de celle du corps humain, soit entre 37 et 40°C (FRITSCHÉ, 2003) et son poids moléculaire avoisine les 24 KDa.

Des hydrolysats sont obtenus à différents temps d'incubation notés en minutes comme suit : T₀, T₁₅, T₃₀, T₆₀, T₁₂₀. La cinétique de l'enzyme est ainsi suivie par électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS).

La figure 22 qui suit représente le profil électrophorétique de la PAGE-SDS des hydrolysats protéiques obtenus sous l'action de la trypsine sur les protéines sériques du lait de vache aux différents temps d'incubation.

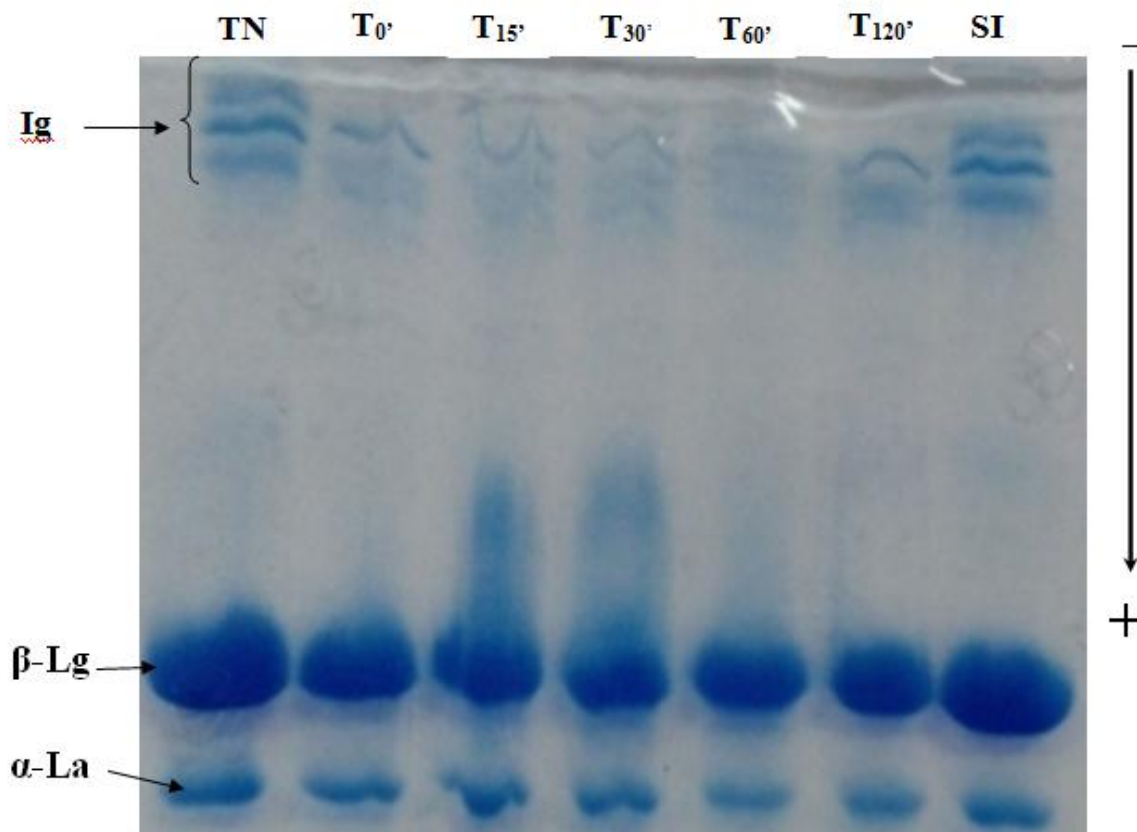


Figure 22: Electrophorègramme en PAGE-SDS des hydrolysats protéiques obtenus sous l'action de la trypsine sur les protéines sériques du lait de vache à différents temps d'incubation : T₀, T₁₅, T₃₀, T₆₀, T₁₂₀; TN : témoin négatif (protéines sériques sans enzyme et sans chauffage) et SI : protéines sériques sans enzyme incubé à 40°C pendant 120 minutes.

L'analyse du profile électrophorétique obtenu en PAGE-SDS (Figure 22) montre l'existence de bandes intenses au niveau du témoin TN et de T₀ (mélange de protéines sériques et enzyme sans chauffage) correspondant aux protéines sériques bovine (Ig, β -Lg et α -La). Cette correspondance des bandes de migration s'explique par l'inactivation de l'enzyme en dehors de sa zone de température optimale.

La température de 40°C (puits SI) n'a aucune influence sur la structure des protéines sériques. Le même profil que TN est d'ailleurs obtenu.

Les bandes correspondant aux Ig commencent à disparaître à partir de T_{15'}. La bande correspondant à la β -Lg devient plus fine ce qui traduit son hydrolyse. Par contre, la α -La semble être résistante à l'action de la trypsine même après 120 minutes d'incubation, puisque la bande correspondante reste de la même intensité. Ceci pourrait être dû à la structure globulaire compacte de la protéine qui rend le site de coupure de la trypsine inaccessible.

La β -Lg est plus sensible par rapport à α -La, du fait de sa structure globulaire moins compacte. Le site de coupure par la trypsine est de ce fait plus accessible (LUNG *et al.*, 1991).

Nos résultats sont compatibles à ceux trouvés par CUSTODIO *et al.* (2005) qui suggèrent qu'au début de la réaction, la trypsine hydrolyse partiellement la β -Lg. La α -La étant plus résistante que la β -Lg.

D'après LUNG *et al.* (1991), le degré d'hydrolyse de la β -Lg par la trypsine atteint 6 % après deux heures d'incubation. Selon ANUELA *et al.* (2000), après deux heures et demie de temps, la α -La est hydrolysée en six bandes, et la β -Lg en 5 bandes.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons essayé de comparer différents échantillons de lait en termes des caractéristiques physico-chimiques. On a également procédé à l'isolement et la purification des protéines majeurs de lait de vache et on a testé l'effet de l'enzyme trypsique sur les protéines sériques pendant une durée de 120mn. Des contrôles électrophorétiques sont effectués.

L'étude comparative, en se basant sur un certain nombre de paramètres physico-chimiques montre que :

- la teneur en protéines du lait de vache ($32,46 \pm 0,042\text{g/l}$) est la plus importante comparée aux laits reconstitué et UHT ;
- la teneur en sucres réducteurs du lait reconstitué ($50 \pm 0,0007\text{g/l}$) est la plus importante comparée aux laits reconstitué et UHT ;
- la teneur en vitamine C du lait vache ($18,75\text{mg/l}$) est la plus importante comparée aux laits pasteurisé et UHT.

Par ailleurs, les protéines sériques bovines séparées par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S100 n'ont pas pu être purifiées. Le recours à d'autres techniques chromatographiques (chromatographie échangeuse d'ions,..) ou encore les techniques de hautes performances donnera de meilleurs résultats.

La PAGE-SDS a quant à elle révélé la sensibilité des Ig et β -Lg vis-à-vis de la trypsine durant une durée d'exposition de 120mn. Par contre, la α -La semble être résistante à l'action de cette enzyme durant toute la durée d'incubation. Ceci pourrait être dû à la structure globulaire compacte de la protéine qui rend le site de coupure de la trypsine inaccessible. De meilleurs résultats d'hydrolyse peuvent être obtenus avec une optimisation portant sur l'augmentation du temps d'hydrolyse ou en augmentant le rapport enzyme / substrat.

Annexe 01

Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY *et al*, 1951

1. Préparation des solutions

Solution alcaline (A)	Solution cuivrique (B)	Solution (C)
500 ml de soude 0,1 N (02 g / 500 ml) + 10 g carbonate de sodium anhydre	02 ml de sulfate de cuivre (0,32 g /100ml) + 02 ml de tartrate de sodium et potassium (01g/100ml)	50 ml de la solution (A) + 01 ml de la solution (B)

2. Gamme étalon

A partir d'une solution mère de BSA, les dilution sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

Concentration en BSA en µg/ml	0	30	50	70	100
Solution mère de BSA (µl)	0	300	500	700	1000
Eau distillée (µl)	1000	700	500	300	0

3. Mode opératoire :

A 0,5 ml de la solution d'échantillon contenant entre 25 et 100µg de protéines :

- Ajouter 2,5 ml de solution (C) ;
- Laisser 5 à 10 min à température ambiante ;
- Ajouter 0,5 ml de réactif de folin-ciocalteu ;
- Homogénéiser rapidement et mettre les tubes 30 min à l'obscurité ;
- Après 30min, homogénéiser les solutions rapidement et lire la Do à 750 nm à l'aide d'un Spectrophotomètre UV visible.

4. Expression des résultats

Une courbe est tracée en portant sur l'axe des abscisses, les concentrations en BSA des dilutions (gamme étalon) préalablement préparées et sur l'axe des ordonnées, les DO mesurées respectivement pour chaque dilution.

La concentration en protéine inconnue X, est déterminée en portant la valeur de la DO correspondante sur l'axe des ordonnées qui est ensuite projetée sur l'axe des abscisses.

Tableau : les densités optiques obtenues lors du dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al.*, (1951).

Solution mère [BSA] (µg/ml)	0	30	50	70	100
Les densités optiques	0	0,051	0,074	0,127	0,148

Annexe 02

Dosage des glucides en utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

Réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de lactose 1g/ml

Préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , et 10^{-4})

Tableau : Gamme étalon

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

1. Mode opératoire

- Mettre 1ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans un tube à essai ;
- Ajouter 2ml du réactif (3,5 DNS) ;
- Chauffer au bain-marie bouillant pendant 5min ;
- Refroidir par écoulement d'eau sous le robinet ;
- Ajouter 7ml d'eau distillée et homogénéiser ;
- Laisser reposer pendant 15min à température ambiante ;
- Faire la lecture à 530 nm contre le blanc.

2. Expression des résultats

Une courbe est tracée $DO=f$ (concentration en lactose). Puis la quantité de sucres réducteurs présente dans les laits est déterminée.

Tableau : les densités optiques obtenues lors du dosage des sucres par la méthode utilisant le DNS

Les concentrations en lactose (g/l)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Les densités optiques	0	0,07	0,196	0,327	0,469	0,601

Annexe 03

Dosage de la vitamine C par la méthode au 2-6-DPIP

1. Préparation des solutions

➤ Solution de 2,6 dichlorophénol (DCPIP) à 0.5g/l :

Dissoudre 0.5 g du 2,6 dichlorophénol indophénol et 0.2g de bicarbonate de sodium (NaCO_3) dans 300 ml d'eau distillée chaude ;

Refroidir et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.

➤ Solution d'acide ascorbique :

Dissoudre 0.4g d'acide ascorbique pur dans 200 ml d'eau distillée. Ajuster le volume à un 1 litre.

2. Etalonnage de la solution d'acide ascorbique

-Prendre 5ml de cette solution dans un bêcher, ajouter 1 ml d'acide acétique glacial et doser par le DCPIP jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante ;

-Lire le volume sur la burette, soit V_1 (ml).

3. Mode opératoire

Dans un bêcher, introduire :

-2 ml de solution à doser ;

-ajouter 1 ml d'acide acétique glacial, mélanger ;

-titrer avec la solution du 2-6-DCPIP jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante.

-lire le volume sur la burette (chute de la burette), soit V_2 (ml).

4. Expression des résultats

La teneur en vitamine C en g/l, est donnée par la relation suivante :

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Où : C_1 : concentration de DCPIP (0,5 g/l).

C_2 : concentration en vitamine C dans les différents laits.

V_1 : volume titré de DCPIP de l'acide ascorbique.

V_2 : volume titré de DCPIP de lait.

Annexe 04

Chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100

1. préparation du tampon Tris-HCl 0,02 M avec pH 8,4 : dont la masse molaire du Tris MM=121,14 moles, pour 0,02 M peser 2,42g puis ajuster le volume à 1 litre dans une fiole jaugée.

2. préparation de la colonne :

- La colonne a été préparée avec un grand soin pour assurer un compactage homogène du gel. Le gel de Séphacryl S100 (environ 5g) est mis en contact du tampon de départ (Tris-HCl 0,02 M, pH 8,4) pendant 30min avec l'azide de sodium pour éviter toute contamination. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (20x 1cm) en une seule fois d'une façon régulière, après stabilisation de cette dernière et stabilisation du débit à 1ml/min ;

-Le volume mort $V_0 = 8$ ml est estimé avec le bleu de dextrane à la concentration de 1mg/ml qui possède une masse moléculaire de 10^6 Da et de ce fait n'est pas retenu dans le gel donc sortira au premier ;

Le volume nécessaire pour l'élution du bleu de dextrane correspond au volume du liquide qui se trouve entre les interstices ;

-Les protéines sériques bovines lyophilisées (100 mg) sont solubilisées dans 2 ml de tampon Tris-HCl (0,02 M ; pH 8,4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à un débit constant ;

-Des fractions de 5 ml sont recueillies pour les besoins de leur identification

Tableau : les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S100 (protéines sériques).

Fraction	DO
1	0.0012
1	0.022
1	0.08
1	0.3
2	0.05
2	0.07
2	0.1
3	0.3
4	0.29
4	0.26
4	0.2
5	0.16
5	0.08
5	0.03
5	0.02
6	0.14
6	0.009
7	0.006
8	0.003
9	0.15
10	0.16
11	0.13
12	0.0003

Annexe 05**Hydrolyse enzymatique des protéines du lait de vache (caséines et protéines lyophilisées)
par la trypsine****1. Préparation des solutions**

-tampon Tris-HCl 0,5 M ; pH 8,0

-pour 0,8g/100ml, pour 5ml peser 0.04g dissoudre dans 5ml de l'eau distillée, contrôlé le pH jusqu'à 8,0 par la solution de HCl 10^{-3} N ;

-pour l'enzyme : prendre 0,4 ml d'enzyme (la trypsine) pour 0,04 g de protéines lyophilisées.

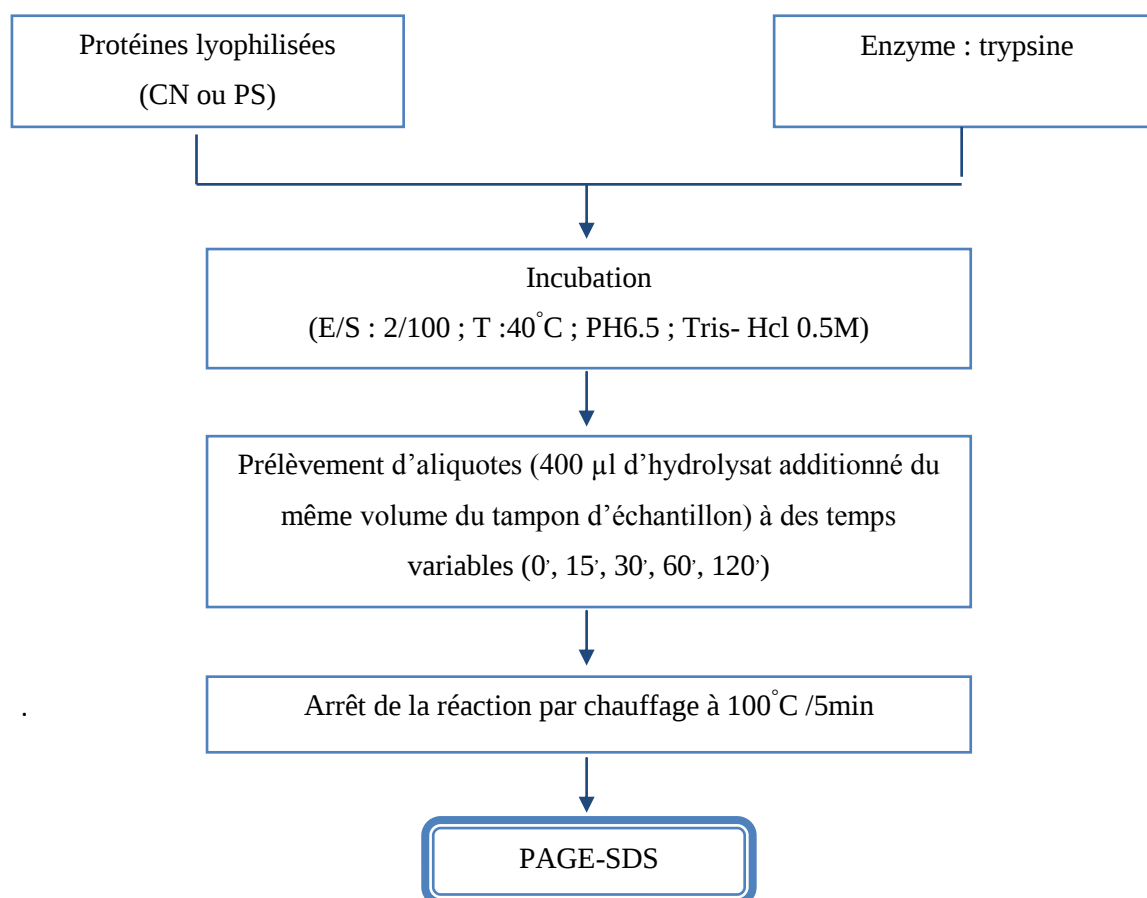
-tampon d'échantillon :

Solution(C).....500 μ l

Eau distillée.....250 μ l

SDS (10%.....250 μ l

2-mercaptoéthanol.....50 μ l

2. Méthode

Etapas suivies pour l'hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine

Annexe 06**Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE native)****1. Préparation des solutions****Solution d'Acrylamide (A)**

Acrylamide.....36g
Bisacrylamide.....1g
Eau distillée.....100ml

Tampon de gel (B)

Tris.....9,14g
Eau distillée100ml
Ajuster à pH 8,9 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode

Tris3g
Glycine.....14,4g
Eau distillée.....200ml

Tampon d'échantillon (les fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S100 des protéines sériques du lait de vache)

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

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

Solution (A).....3,25ml
Solution (B).....5ml
Eau distillée.....1,68ml
Dégazer le mélange (maximum 2min)
TEMED.....20µl
Solution de persulfate d'ammonium10%.....75µl
Couler et mettre le peigne immédiatement
Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA, 25V

Annexe 07

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

1. Préparations des solutions

Solution d'Acrylamide (A) :

Comme celle déjà préparé pour la PAGE native

Tampon de gel de séparation

Tris.....9, 25g
Eau distillée50ml
Ajuster à pH 8, 8 avec de HCl 4N

Tampon de gel de concentration (Solution C)

Tris.....3g
Eau distillée.....50ml
Ajuster à pH 6, 8 avec de HCl 4N

Tampon d'électrode

Tris3g
Glycine.....14,4g
SDS 10%.....0,5g
Eau distillée.....500ml

Tampon d'échantillon (les hydrolysats récupérer par l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques et caséines du lait de vache)

Solution (C).....500µl
Eau distillée.....250µl
SDS (10%).....250µl
2-mercaptoéthanol.....50µl

-Dissoudre 1mg de protéines lyophilisées dans 800µl de ce tampon

-chauffage à 100° C pendant 4 à 5 min puis refroidir dans un bain d'eau froide.

-ajouter 200µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelque grain du bleu de bromophenol.

Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium.....0,1g

Eau distillée (qsp).....1ml

Conduite de l'électrophorèse

Préparation du gel de séparation : T=17% et C=2,7%(pour une plaque)

Solution (A).....4,6ml

Solution (S).....2,51ml

Eau distillée2,73ml

Dégazer pendant 2 min maximum

SDS 10%100µl

TEMED.....13µl

Persulfate d'ammonium 10%.....75µl

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

Préparation du gel de concentration : T= 4,8% et C= 2,7%(pour une plaque)

Solution (A).....1,3ml

Solution (C).....2,5ml

Eau distillée.....5,8ml

Dégazer quelques secondes

Solution de SDS 10%.....100µl

TEMED.....20µl

Persulfate d'ammonium à 10%.....10µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation et mettre le peigne

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

Dépôt d'échantillon : 10 à 20µl

Mise sous tension : 20mA, 250V

Annexe 08

Révélation des bandes de migration électrophorétiques (native et SDS)

1. Préparation des solutions

Solution de fixation

TCA.....12g

Eau distillée.....100ml

Solution de coloration

Bleu de Coomassie0,2g

TCA.....2g

Méthanol.....100ml

Eau distillée.....100ml

Solution de décoloration

Acide acétique.....37,5ml

Eau distillée.....312,5ml

Méthanol.....150ml

A

ABDOUL-AZIZE S. (2013). Implication de la signalisation calcique et des MAP kinases dans la perception gustative lipidique. université Abdou Moumouni. Niamey. Niger.

AFSSA. (2002). acides gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations.

AHMAD A., MORIGUCHI T. et SALEM N. (2002). Decrease in neuron size in docosahexaenoic acid-deficient brain. *Pediatric Neurology*. 26, 210-218.

ALESSANDRI J.M., GUESNET P., VANCASSEL S., ASTORG P., DENIS I., LANGELIER B., AID S., POUMES-BALLIHAUT C., CHAMPEIL-POTOKAR G. et LAVIALLE M. (2004). Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*, 44(6), 509-38.

ALESSANDRI J.M., ASTORG P., CHARDIGNY J.M., PIFFERI F., LAVIALLE M. et GUESNET P. (2008). Acides gras polyinsaturés (AGPI)-structure, métabolisme, fonctions biologiques, apports nutritionnels recommandés et principales sources alimentaires. In : « Aliments fonctionnels » . *Tec et Doc*, 161-201.

AMIOT J., FOURNIER S., LEBEUF Y., PAQUIN P. et SIMPSON R. (2002). Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In : « Science et Technologie du lait » *ed. Presses Internationales Polytechnique*, Canada.

ANSES (2011). Rapport d'expertise collective. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Erratum.

ASTORG P., ARNAULT N., CZERNICHOW S., NOISETTE N., GALAN P. et HERCBERG S. (2004). Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids*, 39 (6), 527-35.

AUDIGIE C., DUPONT G. et ZONSZAIN F. (1995). Principes des méthodes d'analyses Biochimiques. *Bioscience et Techniques*. Tome 1, ed Doin, Paris.

B

BHAGWANDIN V. J., HAU L W.T., MALLIN S.T., CLAIR J., WOLTERS P.J. et CAUGHEY G. H. (2003) . Structure and activity of human pancreasin, a novel tryptic serine peptidase expressed primarily by the pancreas. *J. Biol. Chem.*, 278, 3363-3371.

BLONDEAU N. et SCHNEIDER S.M. (2006). Omega-3 fatty acids for mother and child health. *Nutrition clinique et métabolisme*, 68-72.

BOUGNOUX, HAJJAJI N., FERRASSON M.N., GIRAUDEAU B., COUET C. et LE FLOCH O. (2009). Improving outcome of chemotherapy of metastatic breast cancer by docosahexaenoic acid : a phase II trial, *Br. J. Cancer*, 1978-1985.

BOSCH-BOUJU C. et LAYE S. (2015). Fonctionnement cérébral : le rôle des acides gras polyinsaturés. *Nutrition infos*, 42, 38-42.

BURR G.O. et BURR M. (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J Biol Chem*, 82, 345-67..

C

CALDERON F. et KIM H.Y. (2004). Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 90, 979-988.

CHIKHI A. et BENSEGUENI A. (2006). Biochimie générale : cours et exercices corrigés: structure des glucides, lipides, protéines et acides nucléiques. ed. Dar Aktab El Fikr, Constantine, Algérie.

CHEN C.T., MA D.W., KIM J.H., MOUNT H.T. et BAZINET R.P. (2008). The low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining mouse brain polyunsaturated fatty acid concentrations. *J Lipid Res*, 49(1), 147-52.

COUET C., DELARUE J., RITZ P., ANTOINE J.M. et LAMISSE F. (1997). Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord*, 21, 637-643.

COLETTE C. et MONNIER L. (2011). Acides gras : classification, fonction et équilibre entre les différentes familles, *Médecine Mal. Métaboliques*, 237-245.

COMBE N. et BOUE C. (2001). Apports alimentaires en acides linoléique et alpha linolénique d'une population d'Aquitaine. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 8(2), 118-121.

COURTET LEYMARIOS F. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse de doctorat en sciences vétérinaires. Faculté de médecine de Creteil. Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort.

CUSTODIO M.F., GOULART A.J., MARQUES D.P., GIORDANO R.C. GIORDANO R.L.C. et MONTI R. (2005). Hydrolysis of cheese whey proteins with trypsin, chymotrypsin and carboxypeptidase A*. *Alim. Nutr.*, 105-109.

CUVELIER C., CABARAUX J.-F., DUFRANSE I., HORNICK J.-L. et ISTASSE L. (2004). Acides gras : nomenclature et sources alimentaires. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 148, 133-140.

D

DALLONGEVILLE J., MARECAUX N. et AMOUYEL P. (2010). Acides gras oméga-3 et risque cardiovasculaire. Intérêt nutritionnels et applications, 17, 232-235.

D'ANDREA S., GUILLOU H., JAN S., CATHELINE D., THIBAUT J-N., BOURIEL M., RIOUX V. et LEGRAND P. (2002). The same $\Delta 6$ -desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochem. J.*, 364: 49-55.

E

ELLOUZE S. et KAMOUN M. (1989). Evolution de la composition du lait de dromadaire en fonction du stade de lactation. *Options Méd.*, 6, 307-323.

F

FARAH Z. et RÜEGG M. (1989). The size distribution of casein micelles in camel milk. *Food Microstructure*, 8, 211-216.

FAROOQUI A.A. et HORROCKS L.A. (2006). Phospholipase A2-generated lipid mediators in the brain: the good, the bad and the ugly. *Neuroscientis*, 12(3), 245-60.

FERREIRA A., PETRETTI C. et VASINA B. (2013). Biologie de l'alimentation humaine. Collection diététique et nutrition.

FLACHS P., HORAKOVA O., BRAUNER P., ROSSMEISL M., PECINA P., FRANSSEN-VAN HAL N., RUZICKOVA J., SPONAROVA J., DRAHOTA Z., VLCEK C., KEIJER J., HOUSTEK J. et KOPECKY J. (2005). Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia*, 48, 2365-2375.

FRICKER J. et POUSSER K. (1999). Aliments. *Encycl Med Chir Endocrinologie. Nutrition*, Elsevier. Paris, 6, 10-301,

FRITSCH R. (2003). Role for technology in dairy allergy. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 89-91.

FLIESLER S.J. et ANDERSON R.E. (1983). Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79-131.

FUNK C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-1875.

G

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

GELEIJNSE J.M., GILTAY E.J., GROBBEE D.E., DONDEERS A.R. et KOK F.J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation : metaregression analysis of randomized trials, *Hypertens*, 20, 1493-1499.

GEAY F. (2011). Effets d'une alimentation végétale sur la biosynthèse des acides gras et le métabolisme du bar européen (*Dicentrarchus labrax*). Thèse de doctorat. Université de Bretagne.

GOGUS U. et SMITH C. (2010). n-3 Omega fatty acids : a review of current knowledge, *Int. J. Food Sci. Technol.*, p. 417-436.

GUESNET P., ALESSANDRI J-M., ASTORG P.; PIFFERI F. et LAVIALLE M. (2005). Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux, Corps gras et Lipides*, 12, 333-343.

H

HAAG M. (2003). Essential fatty acids and the brain. *Canadian Journal of Psychiatry*. 48, 195-203.

HERMIER D. (2010). Impact métabolique des acides gras saturés/insaturés. *Innovations Agronomiques*, 10, 11-23.

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

HARRIS W.S., GINSBERG H.N., ARUNAKUL N., SHACHTER N.S., WINDSOR S.L., ADAMS M., BERGLUND L., et OSMUNDSEN K. (1997). Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *Journal of Cardiovascular Risk*, 4, 385-391.

HARRIS RB, PALMONDON J, LESHIN S, FLATT WP, RICHARD D. (2006). Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Horm Behav*, 49(5), 615-25.

HERCBERG S., PREZIOSI P., BRIACON S., GALAN P., TRIOL I., MALVY D., ROUSSEL et FAVIER A. (2004). A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general

population: the SU.VI.MAX study-design, methods, and participant characteristics. Supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants. *Control Clin Trials*, 19(4), 336-51.

HOLMAN R.T (1970). Biological activities of polyunsaturated fatty acids. *Prog Chem fats lipids*. IX: 607-682.

HOLMAN, R.T., JOHNSON, S.B., HATCH, T.F. (1982). A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*, 35(3), 617-23.

K

KALESKIND A. (1992). Manuel des corps gras. Tec & Doc, Tome 1, ed. Lavoisier, Paris

KAMAL A.M., SALAM O.A. et EL-SAIED K.M. (2007). Change in amino acids profile of camel milk protein during the early lactation. *International Journal of Dairy Science*, 2(3), 226-234.

KAMOUN P. (1987). Appareils et méthodes en biochimie. *Médecine-science*, Flammarion, Paris

KUDA O, JELENIK T, JILKOVA Z, FLACHS P, ROSSMEISL M, HENSLER M, KAZDOVA L, OGSTON N, BARANOWSKI M, GORSKI J, JANOVSKA P, KUS V, POLAK J, MOHAMED-ALI V, BURCELIN R, CINTI S, BRYHN M AND KOPECKY J. (2009). n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*, 52, 941-951.

KRIS-ETHERTON P.M., TAYLOR D.S., YU-POTH S., HUTH P., MORIARTY K., FISHELL V., HARGROVE R.L., ZHAO G. et ETHERTON T.D. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr*, 71, 179-188.

KRIS-ETHERTON P.M., HARRIS W.S. et APPEL L.J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106, 2747-2757.

L

LAVAILLE M. et LAYE S. (2010). Acides gras poly-insaturés (omega 3, omega 6) et fonctionnement du système nerveux central. *Innovations Agronomiques*, 10, 25-42.

LAURITZEN L., HANSEN H.S., JORGENSEN M.M.H. et MICHAELSEN K.F. (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog Lipid Res*, 40, 1-94.

LAEMMLI U. K. et FAVRE H. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J. Mol. Biol*, 780, 575-599.

LERAY C. (2013). Les lipides: nutrition et santé. *Tec & Doc*, lavoisier, Paris.

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

LUNG C., PÂQUET D. et LINDEN G. (1991). Traitements De dénaturation Appliqués à la Iactoglobuline avant hydrolyse trypsique. *Lait*, 71, 385-39.

M

MACLEAN C.H., MOJICA W.A., MORTON S.C., PENCHARZ J., HASENFELD GARLAND R., TU W., NEWBERRY S.J., JUNGVIK L.K., GROSSMAN J., KHANNA P., RHODES S. et SHEKELLE P. (2004). Effects of omega-3 fatty acids on lipids and glycemic control in type II diabetes and the metabolic syndrome and on inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, renal disease, systemic lupus erythematosus, and osteoporosis. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Summ)*, 89, 1-4.

MAROUF A. et TREMBLIN G. (2009). Abrégé de Biochimie Appliquée. *EDP Science*, France.

MATTI A. (1992). Les protéose peptones dans les laits bovin, ovin et caprin: isolement, caractérisation, origine et évolution de la fraction hydrophobe contenant le composant-3. Thèse Doctorat. Université de Nancy I, France.

MARTIN A. (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. 3^{ème} éd., Tec & doc, Paris.

MARSZALEK J.R. et LODISH H.F. (2005). Docosahexaenoic acid, fatty acid interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 633-57.

MASSIERA F., BARBRY P. et GUESNET P. (2010). A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J Lipid Res*, 51, 2352-61.

MASSOT C., GÉNARD M., STEVENS R. et GAUTIER H. (2010). Fluctuations in sugar content are not determinant in explaining variations in vitamin C in tomato fruit. *Plant Physiology and Biochemistry*, 9 (48), 751-757.

MEYER B.J., MANN N.J., LEWIS J.L., MILLIGAN G.C., SINCLAIR A.J. et HOWE P.R. (2003). Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 38, 391-398.

MOATTI N. et BAUDIN B. (2007). Cétogenèse ; In : « Biochimie, hématologie », 3^{ème} éd. Paris.

MOORE S.A., HURT E., YODER E., SPRECHER H. et SPECTOR A.A. (1995). Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.*, 36, 2433-2443.

MORI T.A., BAO D.Q., BURKE V., PUDDEY I.B., WATTS G.F. et BEILIN L.J. (1999). Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70, 817-825.

N

NAFTI Y. (2011). Biochimie alimentaire, cours de 3^{ème} année biologie, option C.Q.A, ed biohay, Djelfa.

NAKAI S. et CHI A. (1970). Spectrophotometric Determination of Protein and Fat in Milk Simultaneously. *Journal of Dairy Science*, 276-278.

NAU F., GUERIN-DUBIARD C., BARON F. et THAPON J.L. (2010). Science et technologie de l'oeuf : de l'oeuf aux ovoproduits. *Tec et Doc*, Lavoisier, Paris.

NRC (1993). Nutrient Requirements of Fish N. A. o. Sciences. Washington, DC, USA.

P

POUGHEON S. (2001). Contribution a l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire Toulouse, France.

POUGHEON S. et GOURSAUD J. (2001). Le lait caractéristiques physicochimiques In : « Lait, nutrition et santé », *Tec et Doc*, Paris.

R

RAO M.B., TANKSALE A.M., GHATGE M.S. et DESHPANDE V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 597-635.

S

SAMPATH H. et NTAMBI J.M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Ann. Rev. Nutr.*, 25, 317-340..

SIMOPOULOS A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(6), 674-88.

SIMOPOULOS A.P. et SALEM N. (1986). n-3 Fatty acids in eggs from range-fed Greek chickens. *The New English Journal of Medicine*, 321, 1412.

SINGH T.U., KATHIRVEL K., CHOUDHURY S., GARG S.K. et MISHRA S.K. (2010). Eicosapentaenoic acid-induced endothelium-dependent and -independent relaxation of sheep pulmonary artery. *Eur J Pharmacol*, 636, 108-113.

SPRECHER H. (2002). The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 67, 79-81.

SVENNERHOLM L. (1968). Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.* 9, 570-579.

SZMOLA R., KUKOR Z. et SAHIN-TOTH M. (2003). Humain mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors. *J Biol Chem*, 278, 48580-9.

U

UAUY R., HOFFMAN D.R., PEIRANO P., BIRCH D.G. et BIRCH E.E. (2001). Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 36, 885–895.

V

VEISSEYRE R. (1979). Technologie du Lait : Constitution, Récolte, Traitement et Transformation du Lait. 3^e édition. La Maison Rustique, Paris.

W

WU M. et YANG S. (2012). Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stresses Mediate Apoptosis Induced by Modified LDL in Human Retinal Muller Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53:4595-4604.

WITTIG H.K.A., KARAS M. et SCHAGGER H. (2007). High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6.7, 1215-122.