

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 : biochimie de la nutrition

Thème

*Les maladies cardiovasculaires et
leur relation avec l'alimentation*

Travail réalisé par :

M^{elle} LARBI Djamila

M^{elle} HASNA Thileli

Présenté le 09/07/2017 devant le jury :

Présidente : M^{me} SENOUSSE C.

Promotrice : M^{me} ISSELNANE S.

Examinatrice : M^{me} DERMECHE S.

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 de Biochimie de la Nutrition,

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 suivant :
Les maladies cardiovasculaires et leur relation avec l'alimentation.
- une partie pratique liée au contrôle et à l'évaluation de la qualité de produits alimentaires variés.

Dédicace

Je tiens à remercier en premier lieu le *grand Dieu* le tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce travail

Mes très chers *parents* « *SAID et ROZA* » pour leur amour, sacrifice et leur soutenance tous au long de ma vie

Mes chères *frères et sœurs* pour leur amour, encouragement et pour leur présence dans ma vie

Mes chères *copines* pour leur compréhension, encouragement et soutenance

Mes remerciements s'adresse aussi à :

Madame *ISSELNANE S.* notre promotrice pour avoir accepté de nous encadrer, superviser notre travail et surtout pour ses précieux conseils et orientations

Toute l'équipe de laboratoire *LABAB* pour leur aide et leurs conseils

Tous les membres de *jury* qui ont fait l'honneur de juger notre travail

« Que toute personne contribué de proche ou de loin à la réalisation de ce travail de fin d'étude, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude »

Djamila

Dédicaces

A mes chers parents pour leur soutien inconditionnel et leur sacrifice
tout au long de mes études,

A mes grands parents pour leur soutien sans faille.

A mes frères et sœurs pour leur encouragement

A mes amis pour leur aide et leur présence.

A tous ceux que j'aime.

Thileli

Liste des abréviations

Abréviations	Abréviations
<p>AA : Acide arachidonique</p> <p>BBP : bleu de bromophenol</p> <p>ABC : ATP binding cassette</p> <p>BSA : Albumine sérique bovine</p> <p>ACAT : acylcoenzyme A-cholesterolacyltransférase</p> <p>ACE : Enzyme de conversion de l'angiotensine</p> <p>ADH : Anti diuretic hormon</p> <p>AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments</p> <p>AFSSAPS : Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé</p> <p>AG : Acides gras</p> <p>AGMI : Acides gras mono insaturés</p> <p>AGPI : Acides gras poly insaturés</p> <p>AGS : Acides gras saturés</p> <p>ALA : Acide alpha linoléique</p> <p>ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail</p> <p>AVC : Accident vasculaire cérébral</p> <p>CML : Cellules musculaires lisses.</p> <p>CoA : Co enzyme A</p> <p>COX : Cyclo-oxygénases</p> <p>CRP : Protéine C-réactive</p> <p>CRP_{us}:Protein C-réactive ultra-sensible</p> <p>DNS Acide dinitrosalicylique</p> <p>DCPIP2-6-dichlorophénolindophénol</p> <p>DHA : Acide décosahéaënoïque.</p> <p>EPA : Acide eicosapentaënoïque.</p> <p>ERO : Espèces radicalaires de l'oxygène.</p> <p>FABP: Fattyacidbindingprotein.</p> <p>FAO : organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture</p> <p>HDL-C : High density lipoproteins cholesterol</p> <p>HMG : Hydroxyméthylglutaryl</p> <p>HPLC : chromatographie liquide à haute performance</p> <p>Ig: Immunoglobuline</p> <p>IFN : Interféron.</p>	<p>IL : Interleukines.</p> <p>kDa : kolo Dalton</p> <p>LA : Acide linoléique</p> <p>LDL-C : low density lipoprotein cholesterol</p> <p>LDLox : Low density lipoproteins oxydées</p> <p>LPL : Lipoprotein lipase</p> <p>LPO : Lipoxigénase</p> <p>Lp-PLA2 : Lipoprotein-associated phospholipase A2</p> <p>LPS : Lipopolysaccharide</p> <p>m/v : Masse par volume</p> <p>MCV: Maladie cardio vasculaire</p> <p>M-CDF : Monocyte-colonystimulating factor</p> <p>MCP : Monocyte chemo-attractant protein.</p> <p>M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor.</p> <p>MCV : Maladie cardio vasculaire.</p> <p>MMP: Métallo-protéase</p> <p>MPO: Myélopéroxydase</p> <p>MP-1 : Monocyte chemotactic protein-1</p> <p>NaCl : Chlorure de sodium</p> <p>NF: Nuclear factor</p> <p>NO : Monoxyde d'azote.</p> <p>OMS : Organisation mondiale de la santé</p> <p>PAF: Plateletactivating factor</p> <p>PAF-AH: Plateletactivating factor acetylhydrolase</p> <p>PDGF: Plateletderivedgrowth factor</p> <p>PAF: Plateletactivating factor</p> <p>PAF-AH: Platelet activating factor acetylhydrolase.</p> <p>PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide</p> <p>PM : poids moléculaire</p> <p>R : coefficient de corrélation</p> <p>RL: Radicaux libres.</p> <p>SDS : Sodium dodecyl sulfate</p> <p>TCA : acide trifluoroacétique</p> <p>TG: Triglycéride.</p> <p>Tpa : activateur du plasminogène tissulaire</p>

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Anatomie du cœur	02
2	Structure des vaisseaux et des artères	04
3	Statistique sur MCV dans le monde	06
4	Mortalité en MCV en Algérie en fonction des facteurs de risque	06
5	Mécanismes d'apparition et de développement de l'athérosclérose	08
6	Structure d'une lipoprotéine	13
7	Biosynthèse des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés	19
8	structure 2D de cholestérol	22
9	structure 2D de phytosterol	22
10	Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de LOWRY et al (1951).	28
11	Structure de lactose	29
12	Réaction chimique de DNS sur les sucres réducteurs	29
13	courbe étalon de dosage du lactose par la méthode d'acide 3,5-dinitrosalicylique DNS	30
14	structure de vitamine C	30
15	Réaction de réduction de DCPIP par l'acide ascorbique	31
16	Unité chromatographique	32
17	Chromatographie d'exclusion	32
18	Unité électrophorétique	33
19	Réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide	33
20	Structure de SDS	35
21	Etapes suivie lors de l'isolement des protéines sériques à partir du lait de vache	37
22	Histogramme représente la quantité des protéines dans trois échantillons de lait (LV, LR et E2).	39
23	Histogramme représente la quantité de lactose dans différent types du lait de vache (LV, LR et E2).	40
24	Histogramme confrontant la composition en vitamine C dans différents laits de vache (LV, LVP et E2).	41
25	Chromatographie de permeation des protéines sériques bovines	42
26	Electrophorégramme en PAGE- native	42
27	Electrophorégramme en PAGE- SDS	43
28	Structure tridimensionnelle de la β - lactoglobuline (PubMed).	44
29	Localisation des sites de coupures théoriques de la trypsine dans la structure primaire de la β -Lg variant B	45
30	Structure tridimensionnelle de l' α lactalbumine du lait bovin	45
31	Localisation des sites de coupures théoriques de la trypsine dans la structure primaire de la α -La	46

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
I	Facteurs de risque cardiovasculaires	09
II	Caractéristiques des lipoprotéines	14
III	L'apport théorique journalier en lipides	16
IV	Quelques examens cliniques de diagnostics et de prévention de MCV	20
V	Quelques composés naturels à effets antiathérogènes	21
VI	Propriétés curative de certaines plantes	24
VII	Matériels utilisés	26

Liste des annexes

Annexes	Titres
Annexe 01	Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et al (1951)
Annexe 02	Dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)
Annexe 03	Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP)
Annexe 04	Chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S100
Annexe 05	Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine
Annexe 06	Electrophorèse en condition non dissociante et non dénaturante (PAGE- native)
Annexe 07	Electrophorèse en condition dissociante et dénaturante (PAGE- SDS)

Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la première cause de mortalité dans le monde et en Algérie. Dans la majorité des cas, les différents types de maladies cardiovasculaires sont la traduction clinique de la maladie athéromateuse qui se traduit par accumulation de LDL-C au niveau de l'intima. Les facteurs de risque de MCV sont l'âge, sexe, antécédents familiaux, dyslipidémie, alcool, caféine, tabac, obésité, HTA, le diabète et sédentarité. Parmi ces facteurs les facteurs alimentaires prennent une place très importante dans l'apparition de cette pathologie et elle fait l'objectif de multiples recherches dans le but de mieux prévenir et contrôler ces pathologies. Cependant, en adaptant un mode de vie sain et actif et une alimentation riche en antioxydants et en fibres alimentaires, pauvre en cholestérol, en acides gras saturés et en acides gras trans on peut prévenir le risque de survenu de MCV.

Mots clés:

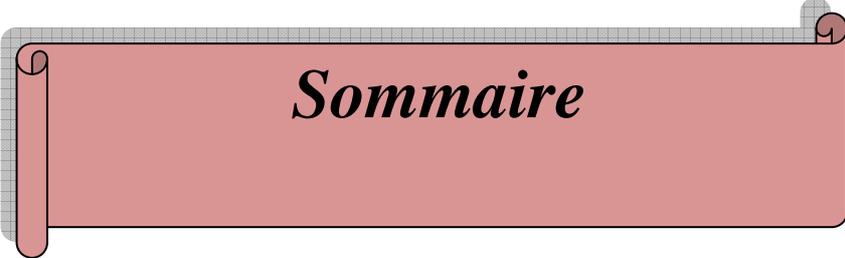
Maladies cardiovasculaires, Athérosclérose, LDL-C, Inflammation, Alimentation, Facteurs de risques.

Abstract

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in the world and in Algeria. In the majority of cases, the different types of Cardiovascular disease are clinical translation of atheromatous disease that results from the LDL-C accumulation at the level of the intima. Risk factors of CVD are the age, sex, family antecedents, dyslipidemia, alcohol, caffeine, tobacco, obesity, HTA, diabetes and sedentary life style. Among these factors, the factors food plays a very important role in the emergence of this pathology and presents the objective of multiple searches for the purpose of prevention and control of these pathologies. However, we can prevent the risk of CVD by adapting a healthy and active life style and diet rich in antioxidants, dietary fiber, low in cholesterol saturated fatty acids and trans fatty acids.

Keywords :

Cardiovascular disease, Atherosclerosis, LDL-C, Inflammation, Food, Risks Factor.



Sommaire

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

I. Partie bibliographique

Introduction 01

I.1. Généralité sur le fonctionnement du cœur

I.1.1. Anatomie du cœur..... 02

I.1.1.1. Les valvules cardiaques..... 02

I.1.1.2. Vascularisation du cœur 03

I.1.1.3. Système d'irrigation sanguine du cœur..... 04

I.2. maladies cardio-vasculaires

I.2.1. Définition et prévalence 04

I.2.2. Types des maladies cardiovasculaires..... 06

I.2.4. Les symptômes des maladies cardiovasculaires 07

I.3. Athérosclérose

I.3.1. Définition 07

I.3.2. Les étapes de développement d'athérosclérose..... 07

I.4. Facteurs de risque cardiovasculaire

I.4.1. Facteurs de risque non modifiable 09

I.4.2. Facteurs de risque modifiable 09

I.5. Les lipoprotéines et athérosclérose

I.3.6.1. Lipoprotéines de haute densité (HDL)..... 14

I.3.6.2. Lipoprotéine de faible densité (LDL) 14

I.6. Les lipides et athérosclérose

I.6.1. Les acides gras saturés 16

I.6.2. Les acides gras insaturés 16

I.6.2.1. Les acides gras monoinsaturés 16

I.6.2.2. Les acides gras polyinsaturés	17
--	----

I.7. Traitement et prévention des maladies cardiovasculaires

I.7.1. Diagnostique	20
I.7.2. Régime méditerranéen	20
I.7.3. Mode de cuisson et de préparation des aliments	21
I.7.6. Rôle de l'arginine et de la lysine	22
I.7.7. Les peptides bioactifs du lait	23
I.7.8. Chocolat	23

II. Partie pratique

Introduction	25
---------------------------	----

II.1. Matériel et méthodes	26
---	----

II.1.1. Matériel	26
------------------------	----

II.1.2. Méthodes	27
------------------------	----

II.1.2.1. Méthodes physico-chimique	27
---	----

➤ Détermination de la teneur en protéines	27
---	----

➤ Détermination de la teneur en sucres réducteurs	28
---	----

➤ Détermination de la teneur en vitamine C	30
--	----

II.1.2.2. Fractionnement des protéines sériques	
---	--

➤ La dialyse	31
--------------------	----

➤ Hydrolyse enzymatique des protéines sériques du lait bovin	31
--	----

➤ Chromatographie d'exclusion sur les protéines sériques du lait bovin	32
--	----

➤ Méthodes électrophorétiques sur les protéines sériques du lait bovin	33
--	----

- Électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturante

(PAGE-native)	35
---------------------	----

- L'électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturante

(PAGE-SDS)	35
------------------	----

- Révélation des bandes de migration électrophorétiques 36 |

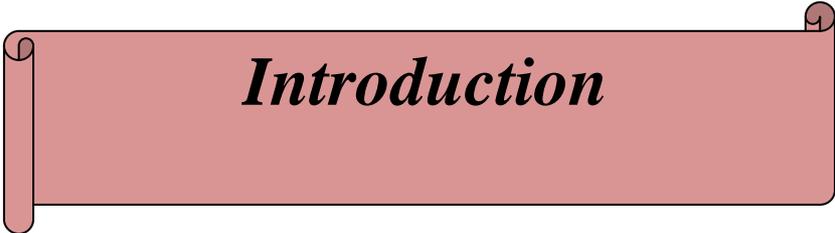
II.2. Résultats et discussions

II.2.1 Analyses physico-chimiques	38
---	----

II.2.1.1. Composition en protéines du lait de vache	38
II.2.1.2. Composition en sucres réducteurs du lait de vache	39
II.2.1.3. Composition en vitamine C du lait de vache	40
II.2.2. Analyse chromatographique des protéines sériques du lait bovin	41
II.2.2.1. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines par la trypsine	43
Conclusion	47

Références bibliographiques

Annexes



Introduction

Introduction

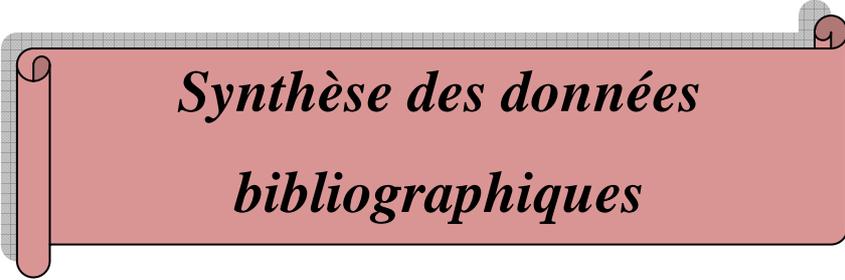
Les maladies cardiovasculaire (MCV) constituent la première cause de mortalité dans le monde avec près de 17 millions de décès chaque année. Ce chiffre est inexorablement appelé à augmenter avec le vieillissement de la population.

Dans la majorité des cas les différent types de MCV sont la traduction clinique de la maladie athéromateuse qui se traduit par une accumulation de LDL-C au niveau de l'intima de l'artère en particulier coronaire, cérébrale et des membres inférieurs qui conduisent à la survenue du thrombus.

Plusieurs facteurs de risques sont exposés à ces maladies. Certains sont indépendants de nous et sont dites modifiables comme l'âge et le sexe, d'autres sont dites modifiables comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le tabac, l'obésité, la sédentarité, ainsi que l'alimentation et notre mode de vie qui devient de plus en plus énergiques et moins nutritifs.

En agissant sur les facteurs de risques qui prédisposent aux maladies cardiovasculaires, il est possible de prévenir et de réduire la fréquence des événements cliniques et de la mortalité prématurée par les MCV en adaptant un mode de vie sain, équilibré et moins énergétique.

Cette synthèse bibliographique a pour objectif de donner un aperçu sur les causes et les conséquences de cette pathologie ainsi que de proposer des solutions en se basant sur de bonnes habitudes alimentaires et un mode de vie hygiénique et actif.



*Synthèse des données
bibliographiques*

I. Partie bibliographique

I.1. Généralité sur le fonctionnement du cœur

I.1.1. Anatomie du cœur

Le cœur est un muscle creux situé dans le thorax entre les deux poumons (LOUKAS *et al*, 2016), composé de 50% de cellules musculaires ou cardiomyocytes et 50% de cellules non musculaires ; fibroblastes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses (CML) (BONNEFOY *et al*, 2002). Le cardiomyocyte contient 20% de mitochondries ce qui explique son activité intense. Son cytoplasme est composé principalement de myofibrilles (la myosine et l'actine) entouré de reticulum sarcoplasmique (ROBERT *et al*, 1996).

Le cœur se compose de quatre cavités couplées deux par deux formant le cœur droit et le cœur gauche, soit deux pompes juxtaposées et synchronisées (figure 1). Chacun des deux cœurs est constitué de deux petites cavités ; l'oreillette ayant un rôle de réception du sang et le ventricule qui éjecte le sang dans l'artère. Le cœur droit et le cœur gauche sont séparés par le septum (SABBAH, 2015).

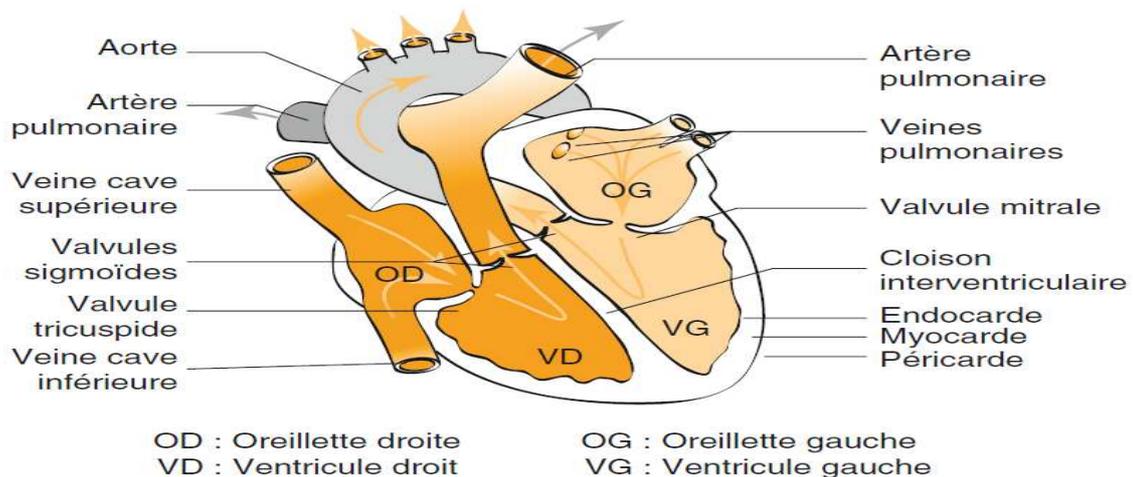


Figure 1 : Anatomie du cœur (SABBAH, 2015).

I.1.1.2. Les valvules cardiaques

Le sang circule dans la même direction grâce aux quatre valvules cardiaques :

- **la valvule tricuspide**

Située entre l'oreillette droite et le ventricule droit. Elle est constituée de trois valves qui sont appelées valves tricuspides. Elle est ouverte au moment du remplissage du ventricule droit et se referme durant la contraction du ventricule droit (SABBAH, 2015).

- **La valve mitrale**

Située entre l'oreillette gauche et le ventricule gauche et constituée de deux valves mitrales. Elle est ouverte durant le remplissage du ventricule gauche laissant le sang oxygéné provenant de l'oreillette gauche passer librement et se referme durant la contraction du ventricule gauche (LEVINE, 2015).

- **La valve pulmonaire**

Située à l'entrée de l'artère pulmonaire constituée de trois valves sigmoïdes orientées vers l'artère pulmonaire. Elle s'ouvre pendant la contraction du ventricule droit permettant ainsi l'éjection du sang pauvre en oxygène vers les poumons. Ensuite elle se referme évitant le reflux sanguin (DASSIER, 2014).

- **La valve aortique**

Composée de trois valves sigmoïdes ouvertes vers l'aorte. Elle s'ouvre à cause de la pression du sang durant la contraction du ventricule gauche (la systole) et se referme pendant le relâchement du ventricule gauche une fois que le sang oxygéné a été éjecté dans l'aorte (CABROL *et al*, 2002).

I.1.1.3. Vascularisation du cœur

Le système vasculaire est très complexe, non homogène et composé de plusieurs compartiments ; macrocirculation et microcirculation veineuse et macrocirculation artérielle. La macrocirculation artérielle ou les artères de moyen et de gros calibre (> 500 µm) sont les plus importants vu leur sensibilités au développement de la plaque d'athérosclérose et de ce fait induction des maladies cardiovasculaires (TOUSSAINT *et al*, 2003). La paroi artérielle est composée de trois tuniques comme illustré dans la figure 2 :

- **L'intima**

C'est la paroi la plus interne qui représente une monocouche très fine composée de cellules endothéliales (aplaties et jointives grâce à des jonctions serrées), de très nombreuses vésicules d'endocytose et des fibres au pôle basal riches en actine (TOUSSAINT *et al*, 2003).

La couche sous-endothéliale de l'intima est l'endroit visé par les lipoprotéines et les monocytes macrophages migrés du sang, ce qui provoque le développement des lésions d'athérosclérose (DASSIER, 2014).

- **La média**

C'est la paroi la plus épaisse, elle contient la limitante élastique interne faisant suite au sous-endothélium externe, CML, des fibres élastiques (en proportion variable selon le type de vaisseau), du collagène, des mucopolysaccharides et une limitante élastique externe (TOUSSAINT *et al*, 2003 et OUHAIBI, 2008).

- **Adventice**

C'est la tunique la plus externe de la paroi artérielle d'épaisseur variable selon les artères, riche en collagène fibrillaire, de quelques fibres élastiques et de fibroblastes vascularisé (vasovorum) et innervé (nervovorum), (TOUSSAINT *et al*, 2003).

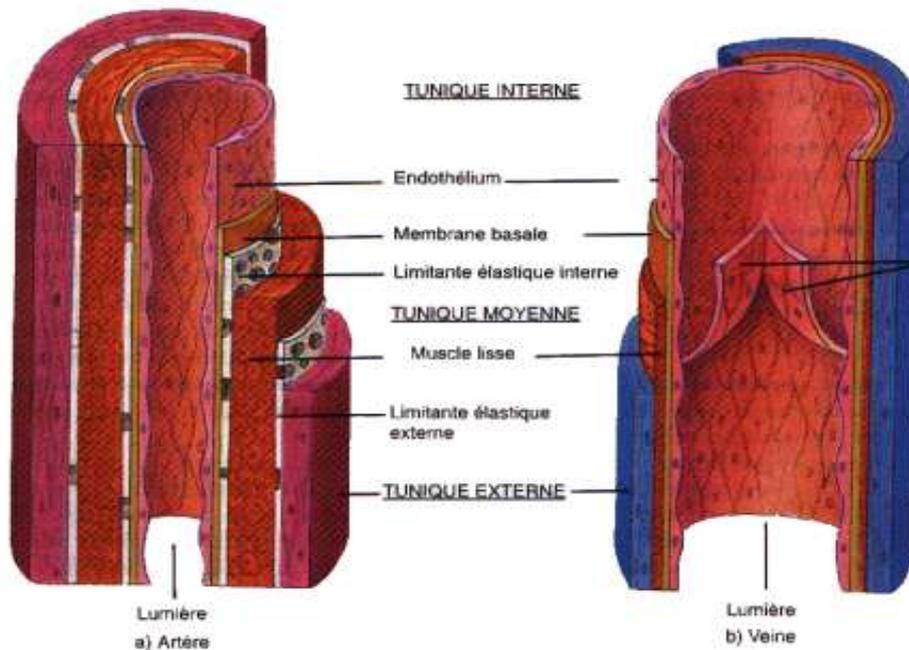


Figure 2 : Structure des vaisseaux et des artères (CHEVRIER, 2013).

Tunique interne = intima ; tunique moyenne = média ; tunique externe = adventice.

I.1.1.4. Système d'irrigation sanguine du cœur

Le sang est propulsé dans près de 100 000 Km de vaisseaux au niveau du cœur. Il circule au travers d'un système fermé et très ramifié de vaisseaux. Le cœur bat 70 fois par minute et pompe au repos 5 à 6 litre de sang par minute (SPENCER *et al*, 2014).

Selon DOOST (2016), L'oreillette droite reçoit le sang veineux pauvre en oxygène apporté par les veines caves et l'envoie vers le ventricule droit qui en se contractant envoie le sang dans les poumons via l'artère pulmonaire pour être ré-oxygéné. Le sang oxygéné ensuite revient du cœur gauche au niveau de l'oreillette gauche via les quatre veines pulmonaires. Le sang ensuite propulsé dans le ventricule gauche et doit traverser la valve mitrale qui contrôle le débit. En se contractant, le cœur propulse le sang via la valve aortique dans l'ensemble du réseau des artères (PEREZ-MARTIN, 2013).

I.1.2. maladies cardio-vasculaires

I.2.1. Définition et prévalence

Les maladies du cœur ont accompagné l'être humain depuis sa création, mais ce n'est qu'en 1768 qu'ils sont décrits et portent le nom d'angine de poitrine (BONNEFOY *et al*, 2002).

Selon l'OMS (2015), les maladies cardiovasculaires (MCV) est un ensemble de troubles affectant le cœur, les vaisseaux sanguins et le système circulatoire qui alimente les poumons, le cerveau et les reins ou d'autres parties du corps. Les MCV comptent parmi les maladies chroniques les plus fréquentes en nombre et les plus graves en termes de mortalité et de morbidité.

D'après les statistiques de l'OMS (2015), le nombre de décès est de 17,3 millions par an, un nombre qui devrait croître à plus de 23,6 millions en 2030. Parmi ces décès, on estime que 7,4 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6,7 millions à un AVC (chiffres 2012) (figure 3). Avant l'âge de 70 ans 16 million de décès sont liés aux maladies non transmissibles dans le monde et 82% dans des pays à revenu faible dont 37% sont due aux maladies cardiovasculaires.

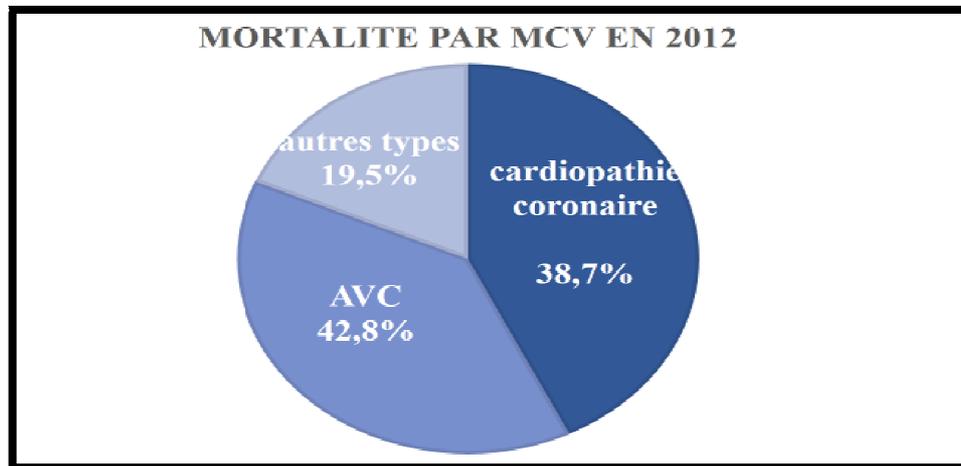


Figure 3 : statistique sur les MCV dans le monde

Les MCV constituent aussi la première cause de mortalité en Algérie et tuent deux fois plus que le cancer avec un nombre de décès près de 25000 algériens chaque année (HUFFPOST, 2014). L'infarctus du myocarde (IDM) touche 1 homme sur 5 entre 40 et 60 ans et 3 algériens sur 1000 subissent des crises cardiaques dont 22% sont des femmes (HUFFPOST, 2014).

L'évaluation de la prise en charge de l'hypercholestérolémie à Tlemcen auprès de 1000 patients a permis de mieux comprendre la répartition des principaux facteurs favorisant les maladies cardiovasculaires (YAHIA-BERROUIGUET *et al*, 2009), (figure 4).

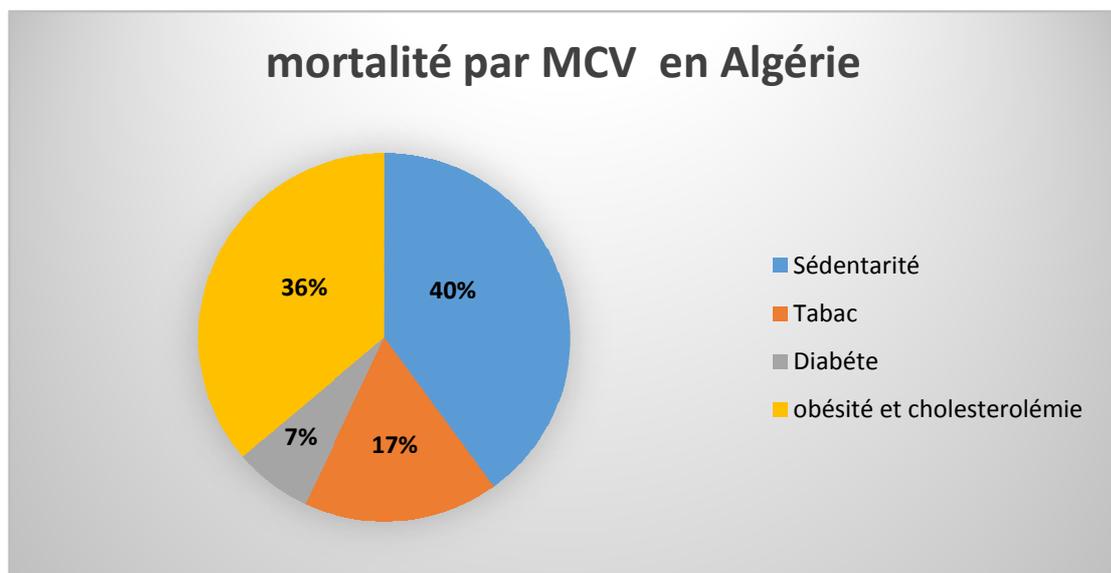


Figure 4 : Mortalité par MCV en Algérie en fonction des facteurs de risque

I.2.2. Types des maladies cardiovasculaires

En fonction d'organes affectés les MCV sont regroupés en six types (OMS, 2015)

o La cardiopathie ischémique

C'est le type le plus répandu dans les pays riches, se manifeste par une mauvaise irrigation sanguine du muscle cardiaque (ANGEHRN, 2001). Le blocage au niveau de l'artère coronaire diminue le taux d'oxygène qui arrive dans le sang provoquant ainsi l'angine de poitrine et la dyspnée (la nécrose ou myocarde dans le cas d'un blocage complet), (POITRINEAU, 2012).

o La maladie cérébrovasculaire

Se manifeste par une mauvaise circulation sanguine au niveau du cerveau. Lorsque le blocage dure moins de 24h on parle d'accident ischémique transitoire, lorsque c'est un blocage complet on parle de thrombose cérébrovasculaire ou AVC. Cette dernière a des effets à long terme (OUSMANE, 2016).

o Artériopathie périphérique

Se manifeste par une mauvaise circulation sanguine dans les jambes et les bras (OMS, 2015) ;

o L'insuffisance cardiaque

Survient lorsque l'activité de pompage du cœur ne permet pas d'atteindre le niveau de circulation sanguine dont le corps a besoin (OMS, 2015) ;

o Le rhumatisme cardiaque

Une cardiopathie rhumatismale est une atteinte des valves et du muscle cardiaques résultant de l'inflammation et des lésions cicatricielles laissées par un rhumatisme articulaire aigu. Le rhumatisme articulaire aigu est provoqué par une réponse anormale de l'organisme à une infection causée par une bactérie streptocoque et commence habituellement par une angine ou une amygdalite chez l'enfant (OMS, 2015) ;

o La cardiopathie congénitale

Due à une anomalie au niveau du cœur dès la naissance. Elle peut être simple comme une petite perforation de la paroi interne du cœur ou complexe qui attaque le poumon et la circulation sanguine. Cette anomalie peut être mortelle, s'elle n'est pas corrigée immédiatement et d'autres plus tolérantes peuvent être traitées plus tard par des interventions chirurgicales (OMS, 2015).

I.2.3. Les symptômes des maladies cardiovasculaires

Les symptômes et les signes de la maladie cardio-vasculaire sont très variés avec une large gamme de signaux à travers différentes formes de la maladie OMS (2015). Les signes les plus fréquents sont :

- douleurs ou gênes dans la partie centrale de la poitrine et au niveau du bras, de l'épaule gauche, des coudes, de la mâchoire ou du dos (plus forte chez la femme) ;
- difficultés respiratoires ou un essoufflement ;
- avoir des sensations vertigineuses ou s'évanouir, être prise de sueurs froides ou pâlir ;
- difficultés visuelles touchant un œil ou les deux ;
- malaises, fièvre, nausées et vomissements ;
- confusions, difficultés à parler ou à comprendre un discours ;
- difficultés à marcher, étourdissement, perte d'équilibre ou de coordinations ;
- céphalées sévères sans cause connue et syncope ou perte de conscience.

I.3. Athérosclérose

I.3.1. Définition

L'athérosclérose selon l'OMS (1957) est l'association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout s'accompagnant de modifications de la média (ARONOW *et al*, 2016).

I.3.2. Les étapes de développement d'athérosclérose

L'évolution de la plaque athéromateuse est un processus progressif qui peut s'écouler plus de 20 ans entre l'apparition d'une strie lipidique et un rétrécissement suffisamment serré pour induire des symptômes comme l'angine de poitrine. Ces symptômes habituellement ne surviennent que lorsque le diamètre de l'artère coronaire est réduit de 50 à 70 %. On parle alors d'ischémie silencieuse (BONNEFOY, 2002).

La première étape de l'athérosclérose est l'accumulation de LDL dans L'intima qui deviennent alors oxydées. Ces LDL-ox sont détectés par les cellules endothéliales par l'intermédiaire de récepteurs scavengers (figure 5).

Dans la deuxième phase les monocytes adhèrent à la paroi, la traversent et se différencient en macrophages puis en cellules spumeuses grâce à deux facteurs MP1 et M-CDF (LUSIS, 2000 ; BONNEFOY, 2002 ; DE CATERINA *et al*, 2006 ; COVAS, 2007).

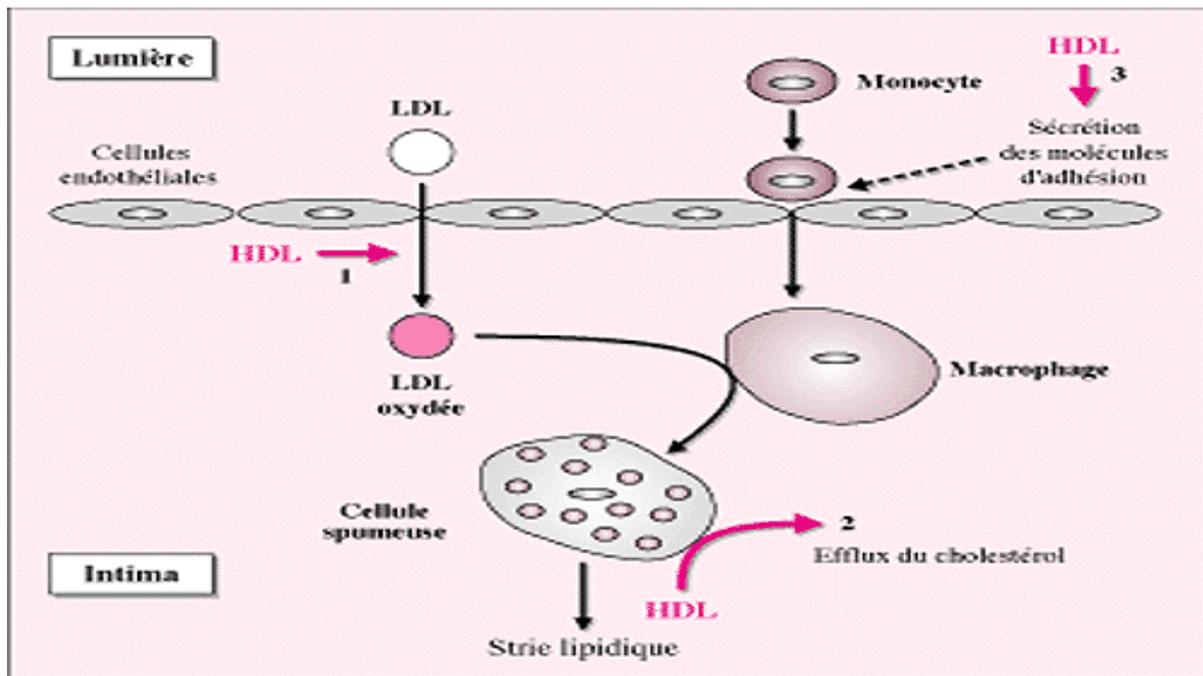


Figure 5 : Mécanismes d'apparition et de développement de l'athérosclérose (BONNEFONT-ROUSSLOT, 1998).

l'infiltration des monocytes dans l'espace endothéliale entraîne une réaction inflammatoire par production de nombreuses cytokines proinflammatoires qui augmentent l'activation endothéliale, favorisent l'adhésion de nouveaux monocytes et la dégradation de la matrice extracellulaire (DE CATERINA *et al*, 2006 ; HANSSON *et al*, 2006).

Par la suite les cellules spumeuses s'accumulent dans l'intima s'organisent en amas appelé cœur lipidique pour donner des stries lipidiques recouvert par une chape fibreuse constitué par la matrice extracellulaire (collagène, élastine, proteoglycane) et les CML de la média qui migrent vers le sous endothélium ou elles se prolifèrent sous l'influence de PDGF (platlet derived growth factor) ce qui les transforme du phénotype contractile vers phénotype sécrétoire (LUSIS, 2000 ; LECERF, 2009 ; MESNIER, 2011).

Le risque de survenue de complications est souvent un phénomène mécanique (rupture ou érosion de la plaque) provoqué soit par la production des facteurs pro-inflammatoires et pro-thrombogènes soit par des facteurs extrinsèques tels que des poussées hypertensives exerçant des contraintes supplémentaires sur l'appareil vasculaire (JEUNEMAITRE, 2014). Le thrombus rétrécit significativement la lumière artérielle sans être tous fois complètement occlusif, mais souvent se développe jusqu' à occlure complètement l'artère conduisant ainsi à un blocage de la circulation sanguine qui se traduit par une ischémie aiguë (DE CATERINA *et al*, 2006 ; BAUDIN *et al*, 2009).

I.4. Facteurs de risque cardiovasculaire

D'une façon générale le risque de développer une MCV donnée peut varier en fonction de la présence ou de l'absence de caractéristiques individuelles dites facteurs non modifiables et socio-économiques ou environnementales dites facteurs modifiables (BAUDIN *et al*, 2009), (tableau I).

Tableau I : Classification des facteurs de risques cardiovasculaires (BAUDIN *et al*, 2009)

Facteurs de risques modifiables	Facteurs de risques non modifiables
Dyslipidémie Triglycérides Alcool Caféine Tabac Obésité l'hypertension artérielle (HTA) le diabète sédentarité Syndrome métabolique	Age sexe Antécédents familiaux

I.4.1. Facteurs de risques non modifiables

On distingue trois facteurs non modifiables qui sont :

I.4.1.1. L'âge

Les risques de MCV augmentent avec l'âge chez les hommes et les femmes. Ceci est causé par la progression de l'athérosclérose qui est elle-même due à une exposition cumulée aux facteurs de risques cardiovasculaires (MAHI, 2013).

I.4.1.2. Sexe

Le sexe masculin est le plus prédisposé aux MCV, tandis que les femmes seraient protégées jusqu'à la ménopause grâce aux œstrogènes qui ont un effet direct sur l'intima des artères, ce qui empêche la progression d'athérosclérose. En combinant âge et sexe le risque de faire un AVC augmente à partir de 55 ans (BAUDIN *et al*, 2009).

I.4.1.3. Les antécédents familiaux de MCV :

Dans le cas où ces MCV se sont développées précocement chez au moins un parent du premier degré ; ces relations parentales mettent en évidence des caractères génétiques de prédisposition (MAHI, 2013).

I.4.2. Facteurs de risques modifiables

I.4.2.1. Dyslipidémie

La dyslipidémie est une anomalie du profil lipidique qui signifie un excès de LDL cholestérol (LDL-C), de triglycérides (TG) et un déficit de HDL cholestérol (HDL-C). Elle est traitée par une diététique appropriée, une augmentation de l'activité physique et un traitement médicamenteux (AFSSAPS, 2005). L'abaissement de cholestérol LDL sérique, l'augmentation du cholestérol HDL sérique et la normalisation des triglycérides sont actuellement un objectif pour la prévention du risque cardiovasculaire lié à l'athérosclérose. Les plaques d'athéromes constituent un dysfonctionnement de ce système avec une

accumulation focale de lipoprotéines riches en cholestérol dans les parois artérielles (HELKIN, 2016).

En effet, les triglycérides n'exercent pas d'effet direct sur la formation de la plaque d'athérome, mais agissent par un processus indirect. Les acides gras libres qui proviennent majoritairement du tissu adipeux semblent exercer une hépatotoxicité par l'intermédiaire de la FABP (fatty acid binding protein) dont la synthèse est accrue par une alimentation riche en graisses. La FABP permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la formation de TG, la résistance des récepteurs à l'insuline. Autant de facteurs favorisent l'instauration d'un diabète et la formation de LDL petites et denses (HELKIN, 2016).

I.4.2.2. Alcool

Une consommation excessive d'alcool provoque l'activation du système nerveux sympathique par production de corticolibérine qui stimule la production de catécholamine. La noradrénaline libérée au niveau des fibres post-ganglionnaires sympathiques peut agir sur les récepteurs α -adrénergiques des CML et provoquer une vasoconstriction. Une baisse d'activité des fibres sympathiques provoque une vasodilatation par l'action de la noradrénaline sur les récepteurs β adrénergiques et activent le système parasympathique. En outre, l'alcool aurait un effet sur les CML caractérisées par une accoutumance à l'effet aigu vasodilatateur et une sensibilisation exagérée aux effets vasoconstricteurs des catécholamines entraînant ainsi une augmentation des résistances vasculaires périphériques et une hypertension artérielle (HTA), (KLATSKY, 2009).

Selon DI CASTELNUOVO *et al* (2002) et CORRAO *et al* (2000), l'alcool multiplie le risque de fibrillation auriculaire par 2, le risque de crise cardiaque par 1,4 et le risque d'insuffisance cardiaque par 2,3. L'alcool augmente également la fréquence des AVC en particulier hémorragiques, ainsi que celle des symptômes d'insuffisance cardiaque congestive. L'hypertension qui représente à elle seule un facteur de risque majeur d'AVC favoriserait les événements cérébraux en accentuant les effets directs de l'alcool sur la morbidité par AVC et par myocardiopathie.

I.4.2.3. La caféine

En fonction de la quantité consommée, la caféine peut être bénéfique ou néfaste pour la santé. Cette substance est présente essentiellement dans le café, mais aussi dans le thé, compléments alimentaires, sodas et chocolats (BOHN *et al*, 2012). Les études de CORNELIS *et al* (2007) ont affirmé qu'une consommation excessive de caféine multiplie le risque d'infarctus par 1.49. Cet effet augmente en augmentant la dose de caféine par jour.

La caféine est une méthylxanthine stimulant du système nerveux central et des centres respiratoires. La caféine est un inhibiteur de la phosphodiesterase. Cette enzyme est responsable de l'inactivation de la 3', 5' adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En effet, la caféine peut se fixer à ces récepteurs du fait qu'elle est une structure moléculaire similaire à l'adénosine, ce qui diminue le nombre de récepteurs disponibles pour l'adénosine (MORELLI *et al*, 2010). Quand l'adénosine se fixe sur ses récepteurs, l'activité nerveuse est ralentie, ce qui favorise la somnolence. L'adénosine facilite donc le sommeil et dilate aussi les vaisseaux sanguins probablement pour assurer une bonne oxygénation lorsque nous dormons (HOLTZMAN *et al*, 1991).

L'activation de plusieurs circuits neuronaux par la caféine va amener l'hypophyse à relâcher des hormones qui vont faire produire d'avantage d'adrénaline aux glandes surrénales (ENGSTROM, 2015 ; CHRYSANT, 2017) provoquant ainsi le déclenchement de certains phénomènes physiologiques comme la dilatation des bronches, l'augmentation de la vitesse de contraction du cœur, l'augmentation d'HTA (SHATERI *et al*, 2016) et la stimulation de la synthèse des biomarqueurs de l'inflammation qui sont des facteurs de déclenchement de la plaque athéromateuse (CORNELIS *et al*, 2007).

I.4.2.4. Tabagisme

Les effets délétères du tabac sont liés à la quantité quotidienne de tabac consommé par jour, à l'âge de début et à la durée d'exposition. Le tabagisme est responsable d'environ 10% des affections cardiovasculaires. Son effet s'exprime en particulier au niveau des membres inférieurs et au niveau coronaire (MAHI, 2013).

Une cigarette contient environ un milligramme de nicotine qui stimule le système nerveux central et autonome (BENOWIT, 1988). La nicotine est une substance présente naturellement dans le tabac à des taux de concentration variables selon les parties de la plante. La nicotine, alcaloïde majeur du tabac est une base faible qui est rapidement absorbée par les membranes cellulaires car elle est à la fois hydrosoluble et lipophile. La nicotine traverse la barrière sang-cerveau, diffuse dans le système nerveux central de façon passive, se fixe sur les récepteurs nicotiques avec libération d'acétylcholine et de catécholamines (BENOWIT, 1988). Ces derniers assurent la lipolyse dans les tissus adipeux ce qui augmente les acides gras libres, stimule le métabolisme cardiaque, provoque une vasoconstriction, favorise l'agrégation plaquettaire et augmente la consommation myocardique en oxygène. Cela explique l'incidence élevée d'infarctus myocardique et d'arythmies ventriculaires chez des fumeurs en bonne santé.

L'affinité du mono-oxyde de carbone est 245 fois plus importante que celle de l'oxygène de telle façon que la délivrance d'oxygène au niveau du myocarde peut être sévèrement altérée (ASSMANN *et al*, 1998 ; MESSNER *et al*, 2014 ; AKOUDAD *et al*, 2015).

I.4.2.5. Obésité

L'obésité est considérée comme étant une maladie chronique qui résulte d'un déséquilibre entre le rapport entrées caloriques/dépenses caloriques (MARQUAND, 2009). Lorsque l'apport est supérieur aux dépenses le surplus s'accumule sous forme de graisses dans le foie, le cœur, le muscle squelettique et le tissu adipeux viscéral (KIM *et al*, 2016).

L'obésité peut intervenir dans de nombreuses maladies telles que le diabète, HTA et les maladies cardiovasculaires (POIRIER, 2008). Elle provoque une détérioration du profil lipidique incluant une diminution de la concentration de HDL-C, une augmentation de la concentration des TG plasmatiques, une augmentation de l'apoprotéine B (GHOORAH *et al* 2016). Les patients atteints d'obésité viscérale se sont révélés avoir des niveaux plus élevés d'adipocytokines pro-inflammatoires y compris le TNF-alpha, l'IL-6 et la leptine, induisant ainsi une résistance à l'insuline, un dysfonctionnement endothélial, une hypercoagulabilité et une inflammation systémique qui sont des marqueurs déclencheurs d'athérosclérose (FUSTER *et al*, 2016 ; MANDVIWALA *et al*, 2016).

I.4.2.6. L'hypertension artérielle

L'HTA est un trouble cardiaque et vasculaire associée à une diminution de la disponibilité de l'oxyde nitrique (propriétés vasodilatatrices) et à une augmentation des facteurs de constrictions tels que ; le thromboxane A2 et la prostaglandine H2 (O'DONNELL, 2008). L'HTA entraîne une rigidification de la paroi des artères du fait de la pression mécanique permanente exercée sur ces dernières. Par ailleurs, la pression artérielle augmente indirectement l'activité du cœur pour maintenir le débit sanguin constant. Cela entraîne une hypertrophie ventriculaire gauche et une perte progressive de son activité contractile pouvant évoluer en insuffisance cardiaque (STEARY *et al*, 1979).

De plus, le dysfonctionnement endothélial ainsi que l'augmentation du stress oxydatif qui accompagne une tension artérielle élevée favorisent une augmentation de la concentration des LDL-oxydées, une augmentation de l'agrégation des plaquettes sanguines, une augmentation de la prolifération des CML, un épaississement des parois des vaisseaux sanguins et une augmentation de la résistance périphérique vasculaire (MAC KEARNEY *et al*, 2005). Ces anomalies vasculaires sont associées à un état pro-thrombotique, pro-inflammatoire et à l'instabilité de la plaque d'athérosclérose ce qui augmente les risques de MCV (GODET-THOBIE *et al*, 2008).

Selon MAC KEARNEY *et al* (2005), l'HTA augmente le risque de survenue d'infarctus du myocarde à 18 %. La prévalence est plus élevée chez les hommes (34,1 %) que chez les femmes (27,8 %). Le nombre d'adultes de plus de 20 ans hypertendus est estimé à 1 milliard et devrait atteindre les 1,5 milliards d'ici 2025.

I.4.2.7. Diabète

Le diabète de type 2 est souvent associé à d'autres comorbidités dont une obésité abdominale, une hypertension artérielle, une dyslipidémie, un état pro-thrombotique. (SCHEEN *et al*, 2005). Selon PAQUOT (2003) le risque d'être atteint par MCV est multiplié par deux à six suivant les cas, ce qui fait que près de 80 % des diabétiques meurent à cause d'une maladie cardiovasculaire.

Au cours d'une hyperglycémie le glucose se greffe à de multiples protéines dont l'apo-B présente dans les LDLs entraînant ainsi son oxydation (YOUNIS *et al*, 2009). Les LDLs oxydées s'inscrivent ensuite dans le processus inflammatoire lié à leur endocytose par les macrophages de l'endothélium. De plus, l'hyperglycémie entraîne une diminution de la libération de l'oxyde nitrique, une augmentation des agents vasoconstricteurs (TAEYE *et al*, 2005).

I.4.2.8. Sédentarité

La sédentarité joue un rôle néfaste en association probable avec une mauvaise hygiène de vie. A l'inverse une activité physique pratiquée de manière modérée (minimum 30 minutes par séance, 5 jours/semaine) permettrait d'augmenter le diamètre des artères, de réduire la mortalité de 25 à 35% (KORNEICH, 2005 ; TATIANA, 2010), de limiter le poids, le risque de diabète, d'hypertension artérielle ainsi que le taux de graisses dans le sang faisant ainsi la diminution du risque cardiovasculaire (ANDRE *et al*, 2013).

I.5. Les lipoprotéines et athérosclérose

Le cholestérol est un tueur silencieux qui encrasse nos artères et s'accumule au cours du temps. Il est absorbé par les entérocytes ensuite intégré dans les chylomicrons. Leur déplacement et fonctionnement dans l'organisme nécessitent des intermédiaires qui leurs permettent de traverser les différents compartiments de l'organisme. Ces intermédiaires sont appelées lipoprotéines (SCHEEN *et al*, 2005).

Les lipoprotéines sont formées d'un corps lipidique hydrophobe contenant essentiellement des triglycérides et des esters de cholestérol et d'une surface lipidique polaire composée essentiellement de cholestérols libres, phospholipides et des apolipoprotéines (figure 6). Les lipoprotéines se distinguent les unes des autres par leur teneur et leur composition en apoprotéines et en lipides. On parvient ainsi à distinguer six classes de lipoprotéines : les chylomicrons, les VLDL, les IDL, les LDL, les HDL et la lipoprotéine (a) (Lp (a)) (Tableau II), (SAILE *et al*, 2007). Les principales lipoprotéines qui sont efficace dans le transport du cholestérol sont les lipoprotéines de haute densité (HDL) et lipoprotéine de faible densité (LDL).

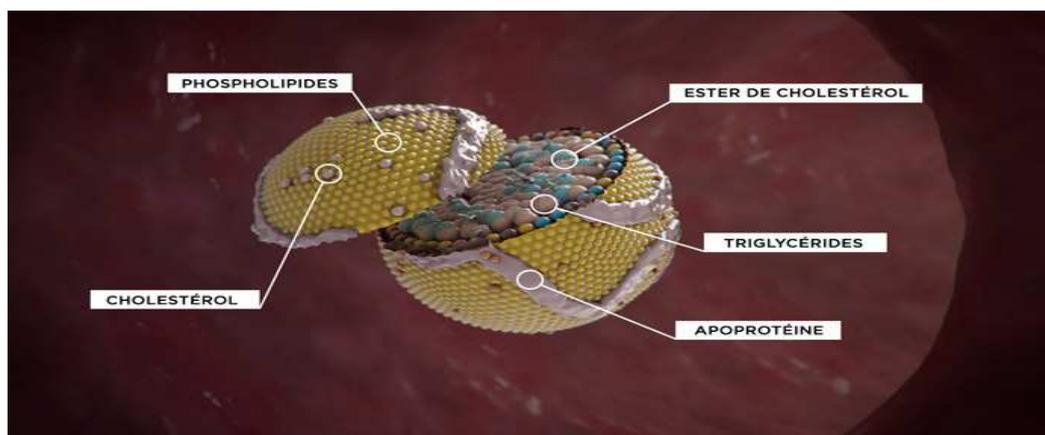


Figure 6 : Structure générale des lipoprotéines (SCHEEN *et al*, 2005).

Tableau II : Caractéristiques et classification des lipoprotéines (SAILE *et al*, 2007).

Types de lipoprotéines	Mobilité électrophorétique	Densité g/l	Taille (nm)	Proportion EC/TG	Principale apo-lipoprotéine (apo)
Chylomicron	Pas de migration	0.93	75-1200	1/19	B48, E, C
VLDL	Pré β	0.93-1.006	30-80	1/3.3	B100, E, C
IDL	B	1.006-1.019	27-35	3/3.5	B100, E
LDL	A	1.019-1.063	18-27	1/0.23	B100
HDL2	A	1.063-1.125	9-12	1/0.22	AI, AII, C
HDL3	Pré β	1.125-1.210	7-9	1/0.19	AI, AII, C
PréβHDL		1.210-1.250	< 7(disque)	Nd	AI
Lp (a)		1.040-1.115	25		B100 (a)

I.5.1. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

Synthétisé principalement dans le foie, mais aussi dans l'intestin, leur rôle est de transporter le cholestérol des cellules vers le foie puis éliminées par la bile. Les HDL sont souvent considérés comme les bons transporteurs de cholestérol vu leur action bénéfique sur la santé cardiovasculaire en prévenant l'accumulation du cholestérol au niveau de la paroi artérielle réduisant ainsi le risque d'athérome (GAUTIER *et al*, 2011 ; DANIEL *et al*, 2014).

- les HDL représentent les vecteurs de la voie de retour (transport inverse) du cholestérol vers le métabolisme hépatique et qu'elles jouent ainsi un rôle d'épurateur de la paroi artériel (MAHDI ALI *et al*, 2012)
- Les HDL attirent le cholestérol en excès dans les macrophages et empêchent leur transformation en cellules spumeuses. Ce transfert est permis par deux récepteurs ; CLA-1 et ABC-1 chez l'être humain ou s'arriment les HDL à la surface des macrophages (RADER *et al*, 2014).
- Le rôle antioxydant des HDL est expliqué par SHAH (2011) et MAHDI ALI *et al* (2012) ; dans un premier lieu les phospholipides des HDL entrent en compétition avec les phospholipides des LDL lors des phénomènes d'oxydation, les hydro-péroxydes ainsi formés pourraient être transféré depuis les LDL-ox jusqu' aux HDL natives.

Le rôle antioxydant des HDL est assuré par deux types d'enzymes qui sont la paraxonase (hydrolyse les AG à long chaines oxydé) et PAF-AH (hydrolyse les AG à courte chaines oxydé), (HERCBERG, 1998).

I.5.2. Lipoprotéine de faible densité (LDL)

Les LDL exercent un effet athérogène en favorisant le dépôt de cholestérol dans les artères (SHOKEEN *et al*, 2015). Les LDL se lient à ses récepteurs spécifiques (récepteur B/E) par l'intermédiaire de l'apoprotéine B. L'interaction du récepteur avec une lipoprotéine stimule l'internalisation du complexe ainsi formé. Les lipoprotéines captées par le récepteur sont dégradées et leurs différents composants sont recyclés (HAVEEL, 1984). La présence de cholestérol dans les cellules entraîne une diminution de la synthèse des récepteurs, une inhibition de l'activité de l'enzyme limitant la synthèse cellulaires de cholestérol (HMG COA réductase : redhydroxy- methyl-glutary-COA-réductase) et l'activation de l'ACAT (acylcoenzyme A-cholesterol acyltransférase). Le récepteur de LDL permet donc à la cellule de recevoir du cholestérol qui servira à diverses fonctions. Lorsque les LDL ne sont pas captées par leurs récepteurs spécifiques, ils peuvent être internalisés par des récepteurs non spécifiques ou éliminées par les macrophages tissulaires qui agissent comme éboueurs. C'est à ce stade que le déclenchement du processus devient possible (MADOUNI, 1999).

I.5.2.1. Oxydation des LDL

L'oxydation est responsable de plusieurs phénomènes délétères comme la peroxydation lipidique de la membrane plasmique, des mutations de l'ADN et accélération du vieillissement cellulaire. Par ailleurs le niveau de stress oxydatif est l'un des facteurs qui conditionne l'oxydation des LDL (STARY *et al*, 1995 ; NILSON *et al*, 2012).

Les LDL les moins oxydées peuvent regagner la circulation et déclenchent l'expression de molécules d'adhésion (I-CAM et V-CAM) attirant les monocytes à l'intérieur de la paroi vasculaire. Les LDL les plus oxydées présentent une affinité plus grande pour les macrophages qui vont les phagocytter et former ainsi des cellules spumeuses. L'oxydation des LDL est initiée par les AGPI qui servent à estérifier les TG, le cholestérol et les phospholipides (YOSHIDA *et al*, 2010).

Les LDL entrent dans l'endothélium et peuvent être oxydées par les cellules environnantes (cellules endothéliales, CML et macrophages) par l'intermédiaire d'enzymes incluant lipoxigénase et myelopéroxydase (DURIEZ, 2000), durant lequel un radical acide gras ainsi formé se stabilise sous forme de diène conjugué (BONNET, 2001 ; BOUBIN, 2006).

Une fois que l'oxydation est initiée, celle-ci est amplifiée grâce à une enzyme qui est la PAF-AH (platelet activating factor acetyl-hydrolase) ou encore Lp-PLA2 (lipoprotein-associated phospholipase A2) possédant une activité phospholipase A2 (Paul et Baudin, 2009). Cela aboutit à la fragmentation des AGPI avec production de cétones (éliminées) et d'aldéhydes qui se fixent sur les résidus lysine de l'Apo-B 100 (ARUOMA, 1998). Les LDL ainsi obtenues ne sont plus capables de se lier aux récepteurs des LDL mais peuvent être captées par les récepteurs scavenger des macrophages, des CML et endothéliales (AMARA *et al*, 2015).

La liaison de ces LDL oxydées aux récepteurs scavenger entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion telles que les I-CAM et V-CAM par les cellules endothéliales. A cette réaction inflammatoire va s'ajouter la formation des cellules spumeuses par phagocytose de ces LDLox (BOUDIN *et al*, 2009) ainsi que la production d'espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERN) par les cellules de la paroi artérielle qui ont pour conséquence l'altération des fonctions vasculaires et la fragilisation des plaques d'athérome (BEAUDEUX *et al*, 2006).

I.6. Les lipides et athérosclérose

Les lipides forment un groupe hétérogène de composés ayant des structures très différentes et sont tous insolubles dans l'eau ou peu solubles. Ils peuvent être d'origine endogène (Synthétisés par l'organisme) ou exogène (alimentation d'origine animal ou végétal). Cette matière existe sous forme visible (beurres, huiles, graisses, margarines...), ou invisibles (viandes, œufs, fromages, pâtisseries...), (DUPIN *et al*, 1992).

Les lipides peuvent être scindés en deux grands groupes ; les acides gras saturés et insaturés. Parmi le second groupe on peut discerner les acides gras mono-insaturés et les acides gras poly-insaturés. Les acides gras poly-insaturés possèdent deux groupes importants aux propriétés souvent antagonistes sont l'acide gras oméga 3 et l'acide gras oméga 6. Ces lipides sont indispensables pour le bon fonctionnement de notre organisme vu leurs rôle biologique, structural et énergétique (LEMARCHAL, 1992). Des taux journaliers doivent être respectés (homéostasie) et tout déséquilibre lipidique peut être expliqué par un surdosage, une carence ou une mauvaise absorption et assimilation (DUPIN *et al*, 1992).

L'apport théorique journalier en lipide chez l'adulte est résumé dans le tableau suivant :

Tableau III : Apport théorique journalier en lipides (FOSSATI, 2001a).

Lipides	Pourcentage
Graisse total	30- 35% de l'apport théorique total
Graisse saturés	10% de l'apport théorique total
Graisse mono-insaturées	15-20% de l'apport théorique total
Graisse polyinsaturés	6-7% de l'apport théorique total

I.6.1. Les acides gras saturés

Il existe 24 acides gras saturés différents qui se distinguent par la longueur de leur chaîne de carbone. Les acides gras saturés se trouvent principalement dans les produits animaux comme la viande, le lait ou le fromage mais également dans certaines huiles végétales comme l'huile de noix de coco ou de palme. Toutefois, depuis l'industrialisation les acides gras saturés sont de plus en plus présents dans l'alimentation (PAGE, 1997 ; LECERF, 2009).

Les gens pensent que les acides gras saturés sont mauvais pour la santé, mais ce n'est pas toujours le cas car des chercheurs ont étudié l'effet de la substitution d'AGS par des AGMI, AGPI ou des glucides, une réduction des lipides et une augmentation en apports végétaux. Le résultat était une réduction du risque cardiovasculaire (ANSES, 2011). Les études montrent que la substitution des AGS par des AGPI s'avère la plus favorable sur le rapport LDL/HDL (ANSES, 2011). Par contre l'augmentation de l'apport énergétique en glucides par rapport aux lipides peut s'avérer délétère en augmentant la formation de LDL (KRAUSS *et al*, 2006).

Au final même si les études commencent à démontrer que ceux-ci auraient peu d'impact sur le risque cardiovasculaire, il faut les consommer avec modération car souvent ils contiennent aussi des acides gras trans.

I.6.2. Les acides gras insaturés

I.6.2.1. Les acides gras monoinsaturés

Les AGMIs dont le représentant principale est l'acide oléique (C 18 :1) présent dans l'huile d'olive, de canola (colza), d'arachide, margarine non hydrogénée, avocats et certaines noix (amandes, pistaches, noix de cajou et noisettes), (SCHWINGSHACKL *et al*, 2012). Ces derniers entraînent une diminution de LDL-C tout en préservant le HDL-C. Ils induisent aussi la résistance à l'oxydation des particules LDL et l'inhibition d'agrégation plaquettaire à un niveau moindre que les AGPIs (LECERF, 2009 ; MARCHAND, 2010).

➤ Huile d'olive et oxydation des LDL

GUASCH-FERRE *et al* (2014) et GHEDIRA (2008) ont démontré qu'une consommation d'huile d'olive permettait une diminution de 30 % de l'incidence des événements cardiovasculaires et jusqu'à 48% pour l'huile d'olive extra vierge chez les personnes qui n'ont pas un taux de LDL-cholestérol optimal à haut risque cardiovasculaire. Les acides gras alimentaires peuvent influencer de plusieurs manières sur

l'oxydation des LDL. La quantité d'acide gras et leur nature influe sur la quantité de LDL présente dans la paroi artérielle (ENGEL, 2015). L'huile d'olive est connue par sa richesse en AGMI et en antioxydants tels que la vitamine E et les composés phénoliques tels que les flavonoïdes (ENGEL, 2015 ; KIRITSAKIS *et al*, 2017).

La feuille d'olivier est riche en triterpènes, flavonoïdes, sécoiridoïdes et en acide phénols. Elle exerce des activités antioxydantes, hypotensives, hypoglycémiantes, hypocholestérolémiant et antiseptique (GHEDIRA, 2008).

1.6.2.2. Les acides gras polyinsaturés

Les AGPI sont principalement d'origine végétale. Ils possèdent une propriété hypolipidémiant. Les plus importants sont L'acide linoléique (AA) et L'acide linoléique (ALA) qui servent de précurseurs pour la synthèse d'oméga-6 et d'oméga-3 à longue chaîne.

▪ Les Acides gras polyinsaturés oméga-3

Dérivé de l'acide α -linoléique trouvé principalement dans les huiles végétales (colza, noix et soja). Ils permettent de diminuer le taux de TG en inhibant la biosynthèse hépatique des VLDL, Inhibent l'agrégation plaquettaire en diminuant la biosynthèse du facteur endothéliales de croissance (VEGF) et réduit la formation de thromboxane A2 pro-agrégateur en inhibant la conversion de l'acide linoléique (C18 :2 n-6) en acide arachidonique (C20 : 4, n-6) (HU *et al*, 2013).

La famille des oméga-3 est représentée par trois dérivées majeures d'activités biologiques distinctes : l'acide alpha-linolénique (ALA), l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), (AFSSA, 2001). L'EPA est un intermédiaire de synthèse à partir duquel sont synthétisés des prostaglandines et leucotriènes d'activité anti-inflammatoire et anti-agrégante plaquettaire. Le DHA donne naissance à des résolvines et neuroprotectines d'autres médiateurs anti-inflammatoires (MOZAFFARIAN *et al*, 2011).

Les AGPIs présents dans la membrane plasmique servent également de substrat à la phospholipase A2 qui libèrent ces AG précurseurs de cytokines dont les prostaglandines, prostacyclines et les leucotriènes (RUSSO, 2009). Ces cytokines et eicasenoïdes pro-inflammatoires jouent un rôle important dans l'athérogenèse car leur présence augmente l'expression des protéines d'adhésion cellulaire (ICAM-1 et VCAM-1) qui permettent aux monocytes de s'infiltrer dans les tissus en cas d'inflammation. Ainsi, la diminution de l'inflammation entraînée par les AGPIs (n-3) à longue chaîne agit à différents niveaux en diminuant le nombre de monocytes s'infiltrant dans l'endothélium et l'oxydation des LDL limitant au final la formation de cellules spumeuses et au total le développement de la plaque d'athérome (MARTIN, 2001 ; MOZAFFARIAN *et al*, 2011).

➤ L'huile de poissons des mers froide

Du fait sa richesse en AGPIs de série oméga-3 (EPA, DHA), il constitue un aliment de valeur diététique et nutritionnelle très importante et permet de lutter contre les MCV. Son action consiste à :

- l'inhibition de la libération de PDGF (Plated Drived Growth Factor) provenant de l'agrégation plaquettaire et du facteur analogue provenant de l'endothélium lésé ;

facteur qui stimulent la prolifération des cellules musculaires et des cellules spumeuses formé à partir des LDL oxydé ;

- un effet sur le métabolisme des lipoprotéines par diminution des TG et des VLDL en agissant principalement sur la synthèse hépatique des TG et Apo B ;
- effet sur le cholestérol en augmentant le HDL-C avec des doses modérés et baisse de LDL-C à forte dose (FOSSATI, 2001b).

▪ **Acides gras polyinsaturés oméga-6**

Trouvé principalement dans les huiles végétales (arachide, maïs, pépin de raisin, tournesol et soja). Le mécanisme exacte sur les LDL est mal connu, mais ce qui est sûr c'est qu'ils inhibent la synthèse des VLDL et stimule le catabolisme des LDL (CZERNICHOW, 2011).

L'influence des AGPIs (n-6) sur le développement de cardiopathies liées à l'athérosclérose découle plus d'un déséquilibre entre les métabolites issus de ces AGs avec ceux provenant des AGPIs (n-3) que d'un excès isolé d'AGPI (n-6) (WANG *et al*, 2009).

En effet, les activités biologiques des AGPIs (n-3) et (n-6) ainsi que de leurs métabolites sont en équilibre et leurs actions s'opposent souvent (BIESSALSKI *et al*, 2010).

Les deux voies métaboliques agissent de concert pour créer un environnement pro-inflammatoire et anti-inflammatoire équilibré ainsi qu'une fluidité sanguine optimale. Le but de ce jeu d'opposition est de maintenir un environnement réactif en cas d'agression par l'intermédiaire du processus inflammatoire (RUSSO, 2009).

▪ **Effets de l'augmentation du ratio oméga-6 / oméga-3 sur le cœur**

Les AGPIs de ces 2 séries sont des composants importants des membranes cellulaires, ne sont pas inter-convertibles par l'Homme et appartiennent donc au groupe des AGs essentiels. (BIESSALSKI *et al*, 2010). L'apport en AGPI peut être délétère si le rapport oméga-6 / oméga-3 qui de (4/1) n'est pas respecté (HOLUB, 2002 et LECERF, 2009).

Ces deux familles entrent en compétition au niveau des $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -désaturases (figure 7). La balance penche en faveur de la voie métabolique dont le précurseur est le plus biodisponible. Un afflux de substrat oméga-6 est donc susceptible de compromettre la génération d'EPA et d'DHA à partir de leur précurseur ALA (GRIMSGAARD *et al*, 1999).

Un déséquilibre de la ration oméga-6 / oméga-3 contribue à la formation du thrombus à partir de la plaque d'athérome, désordres allergiques inflammatoires, augmente la susceptibilité peroxydative des lipoprotéines et la réactivité plaquettaire, la prolifération des cellules adipocytaires et diminution de la résistance à l'insuline. Tous ces facteurs augmentent l'incidence de MCV (ANDER *et al*, 2003 ; BIESSALSKI *et al*, 2010).

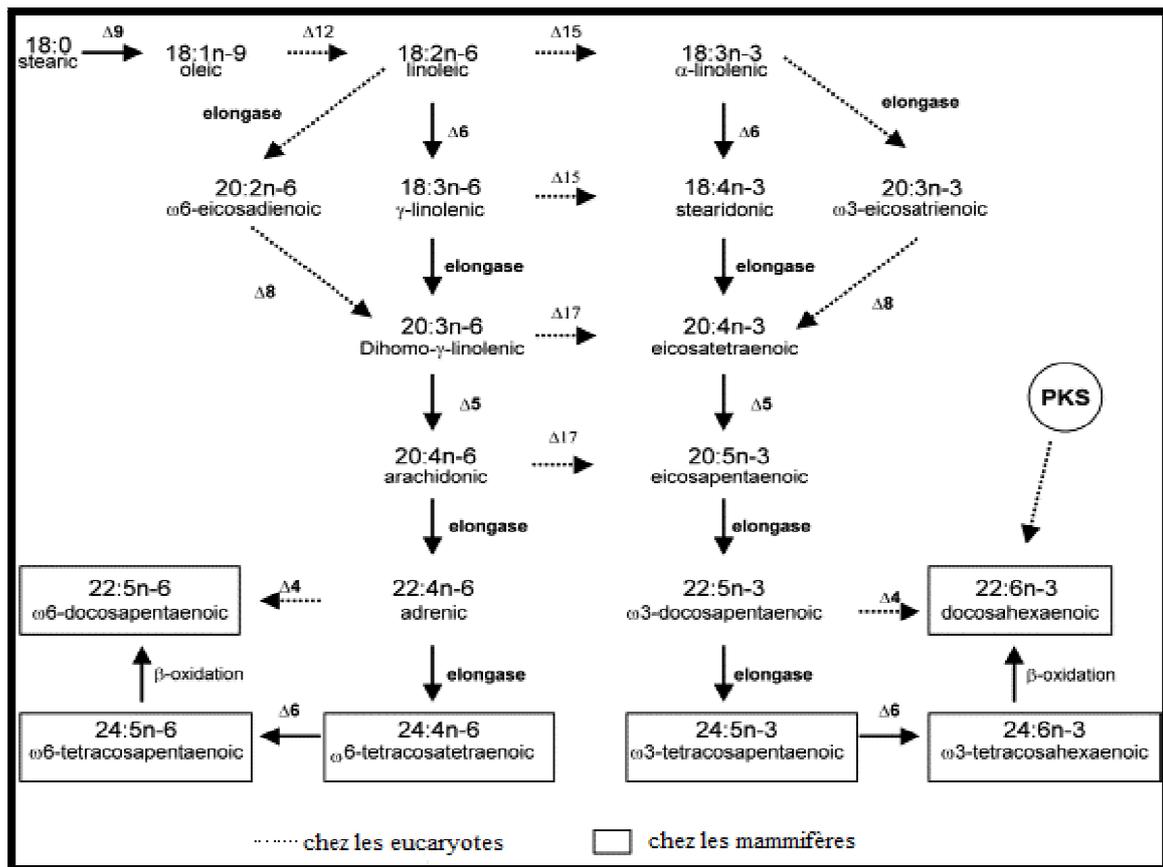


Figure 7 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés et de leurs dérivés (AFSSA, 2001).

▪ Acide gras trans (AGT)

Les acides gras trans sont des acides gras insaturés dont au moins une double liaison est en position trans (MARCHAND, 2010). Les AGTs peuvent être d'origines naturelles (produits dans l'estomac des ruminants par les bactéries qui y résident), (DE SOUZA *et al*, 2015), incorporés dans les graisses corporelles des animaux et dans leur lait ou d'origine technologique (hydrogénation) afin de donner plus de consistance aux huiles insaturées et pour en prolonger la conservation (WILLET, 2012). Les AGTs peuvent également se former lors du chauffage et de la cuisson des huiles végétales à haute température que ce soit au cours des procédés industriels de transformation ou lors de l'utilisation domestique de ces huiles (GEBAUER *et al*, 2017).

On trouve les AGTs dans les plats préparés, les confiseries, les biscuits, les viennoiseries, les pâtes à tarte, les pâtes à tartiner, les chocolats commerciaux, les pâtisseries commerciales, les croustilles, les craquelins, les céréales, les barres granulas, le beurre d'arachide (non naturel), la margarine faite d'huiles hydrogénées ou partiellement hydrogénées, le saindoux,...etc. (MOULIN, 2001).

En revanche, la consommation d'AGT est corrélée de façon continue à l'augmentation du risque cardiovasculaire (MOZAFFARIAN *et al*, 2006 ; DE SOUZA *et al*, 2015) sur une large gamme d'apports de 1,3 à 16,1g/j. Un apport en AGT supérieur à 2% de l'apport énergétique total augmente le risque de maladie cardiovasculaire (BEALDE *et al*, 2005 ; LEGER *et al*, 2005).

I.7. Traitement et prévention des maladies cardiovasculaires

« Mieux vaut prévenir que guérir ». La prévention des maladies cardio-vasculaires passe surtout par un changement des comportements, elle doit commencer le plus tôt possible et passe par une bonne hygiène de vie au quotidien l'exemple d'une activité sportive modérée, mais régulière, la suppression du tabac, la surveillance de son taux de cholestérol et le contrôle de son taux de sucre permettent de limiter les risques de MCV.

I.7.1. Diagnostic

Tableau IV : Quelques examens cliniques de diagnostic et prévention des MCV

Type de dosage	Valeurs normales	Valeurs indiquant la présence de MCV	Références
cholestérol total cholestérol HDL cholestérol LDL	< 2 g/l > 0.4-0.5 g/l entre 1 à 1,6 g/l	≥ 2 g/L < 0.4 g/l >1,6 g/l	SAILE et al, 2007 ; GIDDING <i>et al</i> , 2015
Dosage des triglycérides	entre 0, 35-1,75 g/l	> 1,75 g/l	BRUCKERT, 2013 et CUGNET-ANCEAU, 2012
Dosage de la micro-albumine	30-300 mg/24h	> 300 mg/24h	KOROSHI, 2007
Dosage de la CRP	≤ 1 mg/l	1 mg/l risque faible ; entre 1-3mg/l risque moyen ; > 3 mg / l risque élevé	PIOT <i>et al</i> , 2004
Dosage de la glycémie	entre 0,8-1,26 g/l	$\geq 1,26$ g/ l à jeun depuis 8h ; ≥ 2 g/l, 2 h après une charge orale de 75g de glucose	DROUIN <i>et al</i> , 1993

I.7.2. Régime méditerranéen

Le régime méditerranéens réduit plus de 30% le risque de maladies cardio-vasculaires et de mort subite assurant ainsi une protection similaire à celle des médicaments les plus efficace mais sans effet indésirable (ESTRUCH *et al*, 2013).

Le régime méditerranéen est caractérisé par la consommation de céréales, de légumes et de fruits frais et variés. Ce régime comportait peu de viande rouge, viande ovine et très peu de lait et de beurre, mais des fromages ou des yogourts et du poisson (ESTRUCH *et al*, 2013). Les lipides énergétiques (supérieure à 40 % de l'apport énergétique totale) y sont ajoutés sous

forme d'huile d'olive et enfin du vin rouge qui est consommé modérément au cours des repas (D'ALESSANDRO *et al*, 2015 ; DE LORGERIL *et al*, 2015 ; LIYANAGE *et al*, 2016).

Ce régime prévient et diminue le risque des MCV grâce à la forte consommation de fruits et des légumes riches en fibres, en vitamines et en micro-constituants protecteurs antioxydants, la faible consommation de graisses saturées en raison du peu de viandes, de charcuteries et de produits laitiers, l'huile d'olive riche en acide oléique, certains poissons et végétaux vecteurs d'acides gras oméga-3 (EILAT-ADAR, 2013 ; GARCIA-FERNANDEZ *et al*, 2014).

I.7.3. Mode de cuisson et de préparation des aliments

Il existe différentes techniques de cuisson qui font appel à de hautes températures. Ces dernières peuvent avoir un impact défavorable sur la santé. Il existe pour chaque type de matière grasse une température critique au-delà de laquelle il y a formation de produits toxiques dangereux ((RABER *et al*, 2016). Certaines recommandations peuvent réduire ces effets :

- **Pour les huiles** : il faut respecter le mode d'emploi car certains sont utilisés pour l'assaisonnement d'autres pour les fritures ;
 - **Huile de friture** : l'huile d'olive et l'arachide sont plus stables et peuvent donc être chauffées à haute température car elles sont riches en AGMI, en antioxydants naturels et contiennent des taux modérés en AGPI. Elles sont également utilisées pour l'assaisonnement (LAMRI, 2005).
 - **Huile réservée pour l'assaisonnement** : (colza, soja, noix ...), il faut éviter leur utilisation pour la cuisson car du fait de leur taux élevé en acides gras polyinsaturés (surtout l'acide linoléique) qui sont instables et risquent donc d'être transformés par oxydation et formation de peroxydes. Elles peuvent être utilisées pour des cuissons légères qui ne dépassent pas 170 °C (PAGE, 1997).

Tableau V : Quelques composés naturels à effet antiathérogène

Substances	Exemples	Sources alimentaires	Effets sur les MCV	Références
Antioxydants	Vitamine C	Poivron rouge ; fraises ; agrumes ; maïs et tournesol...	Empêchent le processus d'oxydation par la réduction de l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyles et peroxydes ; durcissement et stabilité des artères ;	FAVIER, 2003 ; KNEKT, 2004; WILLCOX, 2008 ; YE, 2008
	Polyphénols (acides phénoliques,	Fruits et légumes (les éplucheurs en particulier) ;	Inhibition de l'agrégation plaquettaire; réduction des dépôts lipidiques ; réduction des pressions sanguines ;	NIJVELDT <i>et al</i> , 2001 ; MINK <i>et al</i> , 2007 ; KAWAI

	flavonoïdes et les lignanes)	café ; céréales, thé ; vin...	inhibition de l'expression des récepteurs scavengers, qui sont des acteurs importants dans la formation des cellules spumeuses (Kawai et al, 2008a)	<i>et al</i> , 2008 ; MC-CULLOUGH, 2011
Phytostérols	β -sitostérol ; sitostanol ; campestérol	céréales complètes, les légumes secs, l'huile de graine de tournesol, ou encore incorporés dans certains aliments comme des vinaigrettes, des margarines et des spécialités laitières.	Diminution de la cholestérolémie (jusqu' à 10-15 %) avec une diminution du taux de LDL sans incidence sur le taux de HDL, cet effet est du à la ressemblance structurale du cholestérol et des phytostérols où ces derniers entre en compétition avec le cholestérol pour la formation des micelles au niveau des anthérocytes ;	LING <i>et al</i> , 1995 ; LECERF, 2006 ; GUPTA <i>et al</i> , 2011 ; EILAT-ADAR, 2013

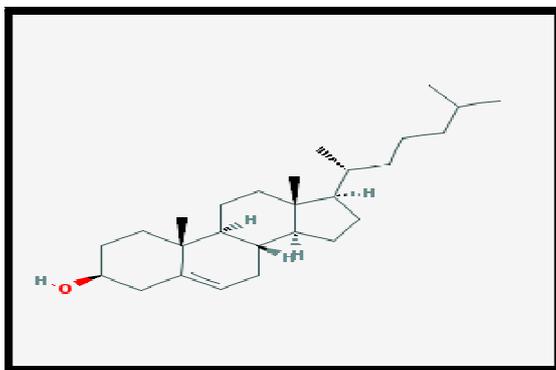


Figure 8 : Structure 2D de cholestérol

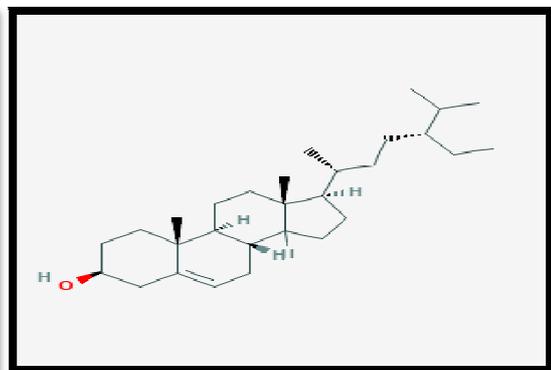


Figure 9 : Structure 2D des phytostérols

I.7.4. Rôle de l'arginine et de la lysine

L'arginine est un acide aminé basique précurseur spécifique de l'oxyde nitrique (NO). L'oxyde nitrique est un dérivé de l'endothélium apparaît être une molécule endogène antiathérogène par une action vasodilatatrice et a un effet inhibiteur de l'adhérence des éléments sanguins circulants à la paroi vasculaire. L'arginine a la capacité de rétablir la réactivité des troncs artériels qui ne présentent pas de plaque à une stimulation vasodilatatrice

cholinergique. Cette action est liée à la production de NO à partir de l'arginine par la NO synthétase endothéliale (FAVIER, 2003).

MADOUNI, (1999) a montré l'effet inhibiteur de la lysine sur le transport membranaire de l'arginine ainsi qu'une action inhibitrice directe sur l'enzyme NO synthétase endothéliale. Ces données suggèrent qu'un apport excessif en lysine pourrait réduire la production de NO induisant de nombreux effets toxiques ; réduction du tonus vasomoteur, augmentation de l'adhésion des plaquettes aux cellules endothéliales et augmentation de l'inhibition de l'oxydation des lipoprotéines. Or ces éléments sont impliqués dans la première étape de la formation de la plaque d'athérome et semble en faveur d'un rôle important de la lysine par sa capacité à entrer en compétition avec le transport cellulaire et le métabolisme d'arginine.

I.7.5. Les peptides bioactifs du lait

Les protéines du lait sont des précurseurs de peptides à activité anti-oxydante grâce à leur richesse en certains acides aminés comme l'histidine, et en acides aminés hydrophobes. L'action de ces peptides est leur capacité à inhiber la peroxydation des lipides en piégeant les radicaux libres. Par exemple, un peptide dérivé de la β -caséine de séquence Lys-Val-leu-Pro-Val-Pro-Gln-Lys, est l'un des peptides les plus efficaces dans l'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique.

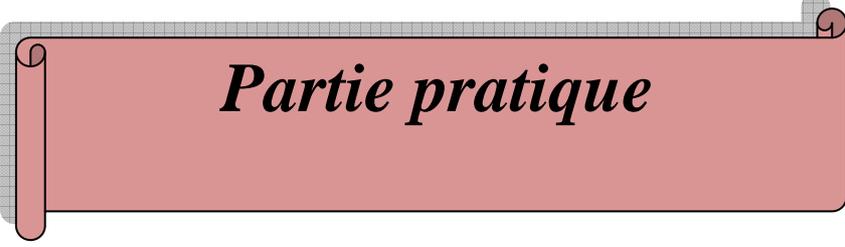
Un autre peptide du lait issu de la β -lactoglobuline a un effet hypocholestérolémiant en réduisant significativement le taux de cholestérol. C'est la lactostatine (séquence Ile-Ile-Ala-Glu-Lys). Le mécanisme postulé serait que la lactostatine en se fixant sur les acides biliaires, limiterait leur adsorption et donc diminuerait le taux de cholestérol dans le sang. Elle intervient aussi dans la modulation de la transcription de l'enzyme cholestérol-7- α -hydroxylase qui intervient dans la métabolisation hépatique du cholestérol (LEONIL, 2014).

I.7.6. Chocolat

Le chocolat contient une quantité importante de polyphénols complexes qui ont une propriété antioxydants en provoquant la relaxation des vaisseaux et diminuent la sensibilité des LDL à l'oxydation protégeant ainsi contre la formation des lésions athéromateuses (DING, 2006). IL convient aussi de rappeler que le chocolat qui est d'origine végétale ne contient pas de cholestérol (il contient du cholestérol apporté par le lait). De plus les phytostérols contenu dans le cacao entravent l'absorption du cholestérol alimentaire, il contribue donc à nous protéger contre l'athérosclérose (GALLEANO, 2009).

Tableau V : Propriétés curatives et préventives de certaines plantes médicinales

Plantes	Propriétés	Doses	Contre-indications	Références
Aubépine	<ul style="list-style-type: none"> - Hypotensive - régulatrice du rythme cardiaque - vasodilatatrice - tonocardiaque - sédative du système nerveux central - antispasmodique - prévenir et traiter diverses affections cardiaques - atténuer les troubles liés à la nervosité 	<ul style="list-style-type: none"> - Infusion : utiliser 20 gr de feuilles (ou baies ou fleurs séchées) pour 1 litre d'eau bouillante et laisser infuser 15 à 20 minutes, pour obtenir une dose efficace en substances actives - boire 2 à 3 tasses de tisane par jour, de préférence après le repas du soir ou juste avant de se coucher. En cas d'utilisation prolongée, réduire de moitié la dose d'Aubépine dans l'infusion 	<ul style="list-style-type: none"> - Légers troubles digestifs, des maux de tête et des étourdissements - l'aubépine, et de trop fortes doses provoquent des troubles cardiovasculaires. Il est donc conseillé de ne pas dépasser les doses recommandées et si la cure est poursuivie sur le long terme, il est indispensable d'entrecouper les phases de prise par des phases de repos - les effets de l'aubépine peuvent s'ajouter à ceux d'autres plantes ayant une action sur le cœur, et à ceux de médicaments tels que les antihypertenseurs, les médicaments contre les arrêts cardiaques, les vasodilatateurs ou encore les tranquillisants et les anxiolytiques - l'aubépine est déconseillée en cas de grossesse ou d'allaitement, et ne doit pas être consommée sans avis et suivi médical 	SHEEMAEKER (2011)
Ail	<ul style="list-style-type: none"> - diminue la tension artérielle (fructosanes, potassium, magnésium et adénosine) - fluidifie le sang (prostaglandines de type A1 ; l'ajoène ; allicine) - dilate les artères (les peptides y-glutamyl et d'ajoène l'adénosine) - de baisser le taux d'homocystéine dans le sang (vitamines B6, B9 et B12). - anti oxydants (ca, Cu, br, Mg, P, K, Fe, Zn, sélénium, soufre) 	<ul style="list-style-type: none"> - Ail frais. Consommer de 1 à 2 gousses (de 4 g à 8 g) par jour. - Ail séché. Prendre de 0,5 g à 1 g par jour - extrait normalisé : Prendre de 200 mg à 400 mg, 3 fois/J - ail vieilli. Prendre de 600 mg à 900 mg/J - huile d'ail (distillation à la vapeur d'eau). Prendre de 5 mg à 8 mg/J. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aucune contre-indication connue, sauf pour les personnes atteintes de porphyrie - éviter la consommation de quantités importantes d'ail avant et après une intervention chirurgicale en raison de ses effets anticoagulants qui pourraient augmenter les saignements - légers malaises gastro-intestinaux occasionnels à la suite d'une forte consommation d'ail - possibles réactions de la peau ou des muqueuses résultant de l'application topique d'ail frais 	DIONNE (2009) OLIVIER (2015) SAOZEDDE, (2017)

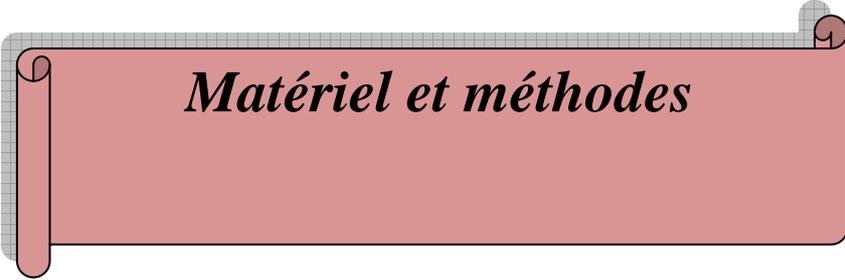


Partie pratique

Introduction

La qualité d'un produit alimentaire se définit comme étant l'ensemble des propriétés et des caractéristiques qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés par les consommateurs, d'où la nécessité de son contrôle.

L'évaluation des paramètres physico-chimiques des produits alimentaires constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité de ces derniers. L'analyse des aliments passe par la séparation et la quantification des différents constituants présents dans les aliments. La séparation permet leur identification ultérieure (nature et fonction des constituants) et la quantification permet de déterminer leur teneur relative et ceci se fait par différentes méthodes ; titrimétriques (dosage de la vitamine C), spectrophotométriques (dosage des protéines, des glucides...etc), électrophorétiques et chromatographiques.



Matériel et méthodes

II. Partie pratique

II.1. Matériel et méthodes

Cette étude a été réalisée entièrement au laboratoire pédagogique de Biochimie Analytique et Biotechnologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

II.1.1. Matériel

Tableau VIII : Matériels utilisés

Matériels biologiques	Produits chimiques	Verreries et appareillages
<p>- Echantillons Lait de vache Lait reconstitué Lait UHT</p> <p>- Matériels biologiques Sérum albumine bovine Trypsine</p>	<p>-Solvants Acide acétique, acide chlorhydrique, éthanol, glycérol, méthanol, hydroxyde de sodium ...</p> <p>-Réactifs et colorants Acide ascorbique, acrylamide, bleu de bromophénol, bleu de coomasie, dodécyl sulfate de sodium, glycine, lactose, 2-mércaptoethanol, N, N'-méthylène- bis- acrylamide, persulfate d'ammonium, réactif de folin-ciocalteu, rouge de méthyl, TEMED, 2-6-dichlorophénolindophénol, acide 3,5 dinitrosalicylique...</p> <p>-Sels et tampons Carbonate de sodium, chlorure de potatium, tartrate de sodium et de potatium, TRIS, Hydroxyde de sodium, CuSO45H2O ...</p>	<p>- Verreries Tubes, béchers, burette, éprouvette gradué, fioles jugées, micro seringue, pipettes et micropipette graduées</p> <p>-Appareillage Agitateur magnétique de palliasse, vortex, balance de précision à 0.01g, bain-marie, centrifugeuse (8000×g), étuve, lyophilisateur à plateaux, pH mètre, spectrophotomètre UV-visible, unité d'électrophorèse sur minicuve verticale, unité de chromatographie basse pression...</p> <p>Autres matériels Barreaux magnétiques, coupelles, éppendorfs, gants et masques, laine de verre, membranes de dialyse, poires, Porte tubes...</p>

II.1.2. Méthodes

II.1.2.1. Méthodes physico-chimiques

➤ Détermination de la teneur en protéines

En fonction de leur solubilité à pH 4,6 les protéines du lait peuvent être réparties en deux catégories : les caséines (insolubles à pH 4,6) et les protéines du lactosérum solubles à pH 4,6 (ALAIS, 1984).

Il existe divers méthodes qui permettent de quantifier la concentration totale en protéines dans un échantillon ; chimique (méthode de KJELDAHL, DUMAS, KOFRANYI, dosage des acides sialiques, LOWRY *et al*, 1951) méthodes par titrages au formaldéhyde, méthodes turbidimétriques, méthodes électrophorétiques, méthodes chromatographiques, méthodes immunologiques et par action d'exopeptidases (GUILLOU *et al*, 1986).

La méthode de KJELDAHL (1883) et celle de LOWRY *et al* (1951) sont les plus utilisés au niveau des laboratoires d'analyses et de recherches classiques et spécialisés. Pour notre recherche on a utilisé celle de LOWRY *et al* (1951) qui présente l'avantage d'être rapide, simple, facile à mettre en œuvre est très adapté au dosage des protéines dans le lait. Contrairement à la méthode de KJELDAHL qui est applicable à tous les produits alimentaires et souvent utilisée pour sa répétabilité élevée et présente une bonne corrélation malgré le fait qu'elle soit fastidieuse (GUILLOU *et al*, 1986).

○ Principe de la méthode de LOWRY *et al* (1951)

Il s'agit d'un dosage colorimétrique basé sur deux réactions simultanées : une réaction de type Biuret, par laquelle les molécules peptidiques qui contiennent au moins quatre groupements (-CO-NH-) donnent en milieu alcalin un complexe cuivrique coloré et une réaction par laquelle les noyaux phénoliques de la tyrosine et le tryptophane et à un degré moindre de cystéines et histidines, réduisent l'acide phosphomolybdo-tungstique de Folin. A l'aide de spectrophotomètre on mesure la densité optique (DO) à une longueur d'onde $\lambda = 750\text{nm}$ (WATERBORG, 2002). La concentration des protéines inconnues est déterminée on se référant à une courbe d'étalonnage, $DO = f [C]$ établie avec l'albumine sérique bovine comme standard protéique (figure 10). Le mode opératoire est donné en annexe (01).

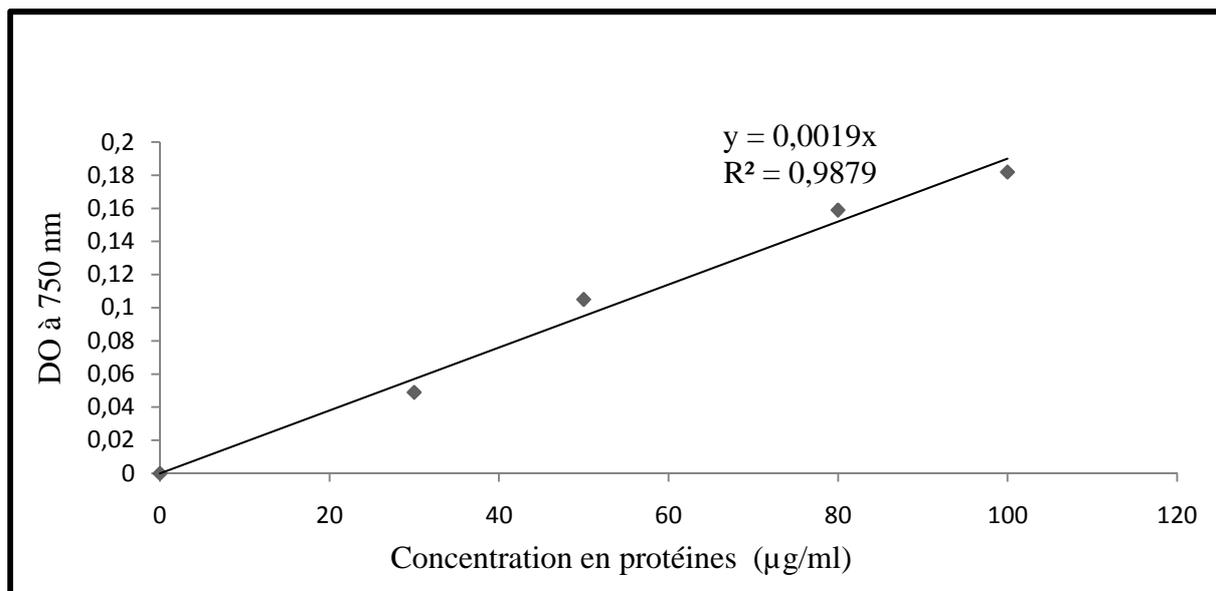


Figure 10 : Courbe étalon pour le dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al* (1951). L'albumine sérique bovine (BSA) utilisée comme protéine de référence.

➤ Détermination de la teneur en sucres réducteurs

La détermination de la teneur en glucides dans un échantillon se fait par divers méthodes : chimiques (réactif de Fehling, à l'Orcinol, acide 3.5 dinitrosalicilique,...), physiques (polarimétrie, réfractométrie), enzymatiques (glucose oxydase, analyseur à enzymes immobilisées), chromatographiques (HPLC)...etc. (GUSAKOV *et al*, 2011).

La méthode de Fehling est la méthode référentielle utilisée pour le dosage des sucres réducteurs. Cette méthode de dosage repose sur la réduction de liqueur de Fehling qui est un mélange d'une solution de sulfate de cuivre et de sel de Seignette en présence de soude par les sucres. Cependant, aujourd'hui cette méthode devient obsolète et on lui préfère des méthodes telles que l'HPLC ou par spectrophotométrie IR utilisées dans l'industrie (GUSAKOV *et al*, 2011).

Pour notre analyse on dose les sucres réducteurs (principalement le lactose qui est le sucre le plus abondant dans le lait de vache (figure 11)) grâce à leurs propriétés réductrices en milieu alcalin et à chaud vis-à-vis de l'acide 3-5 dinitrosalicilique (3,5-DNS). Cette dernière reste la méthode la plus recommandée et qui domine les laboratoires vu sa rapidité et facilité d'emploi bien qu'elle est moins précise et moins sensible (GUSAKOV *et al*, 2011).

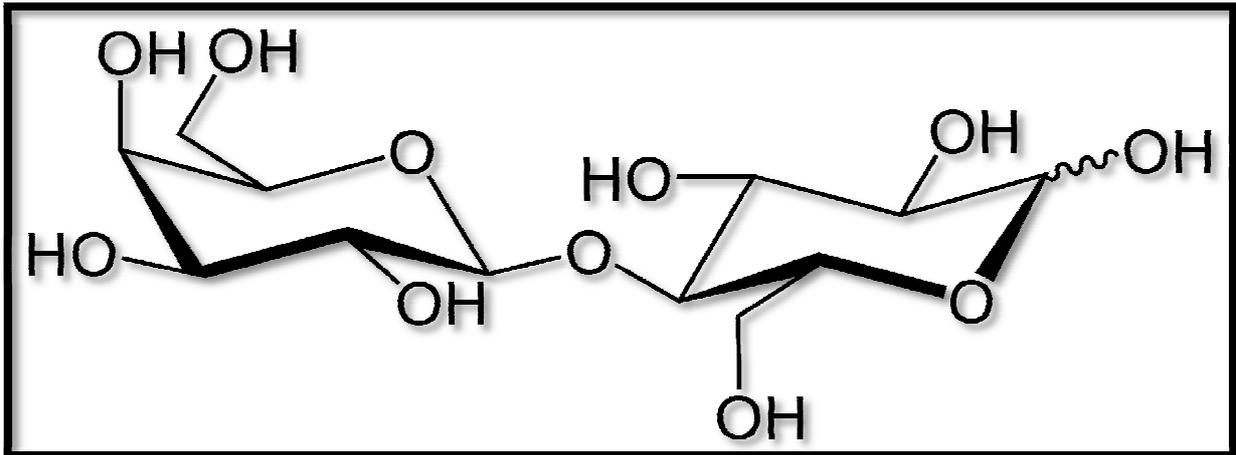


Figure 11 : Structure de lactose, β -D-galactopyranosyl; (1 \rightarrow 4) β -D-glucopyranose.

o **Principe de la méthode**

En milieu alcalin et à chaud l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitrosalicylique en présence de sucres réducteurs. Le composé obtenu est rouge orangé à reflets pourpres (figure 12). Il peut être dosé par spectrophotométrie (MILLER, 1959).

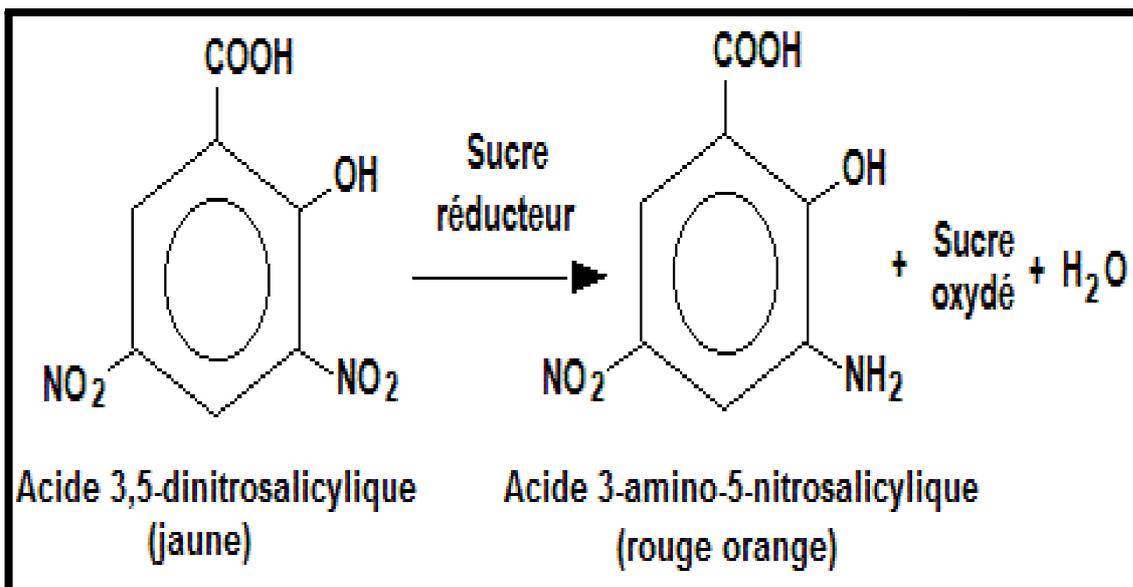


Figure 12 : Réaction chimique de DNS sur les sucres réducteurs (ALARCON *et al*, 2009).

La concentration des sucres réducteurs des échantillons est mesurée à partir d'une courbe d'étalonnage $DO=f$ [Lactose] réalisé avec une solution de lactose à 1g/l (figure 13). Les conditions expérimentales sont représentées en annexe (02).

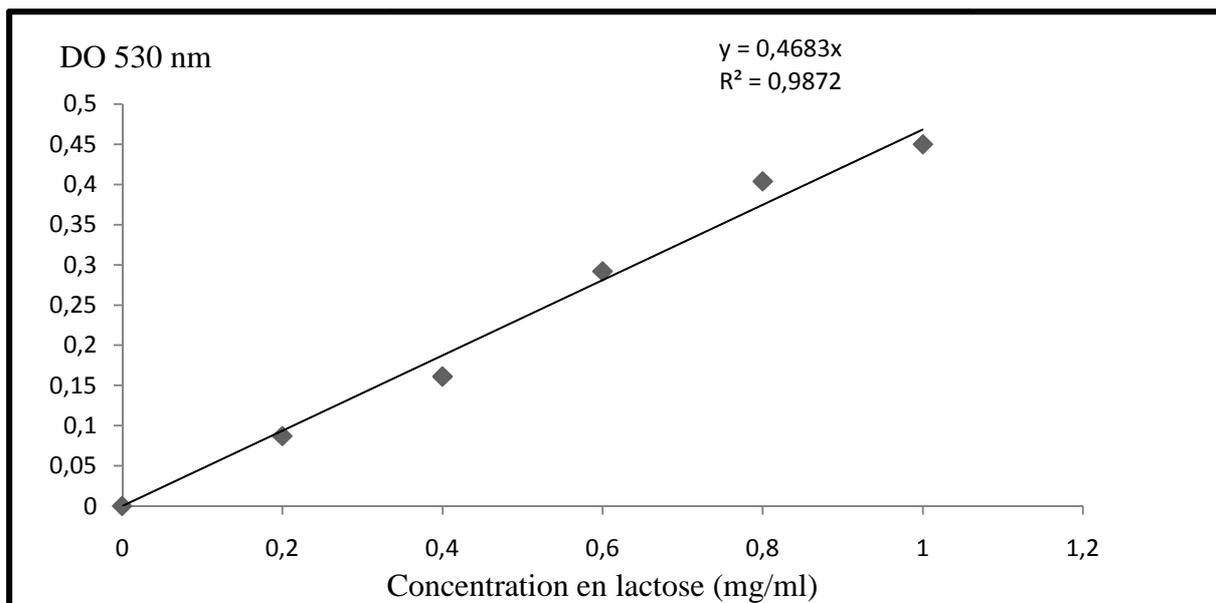


Figure 13 : courbe étalon pour le dosage des sucres réducteurs par la méthode d'acide 3,5-dinitrosalicylique DNS avec la solution de lactose comme étalon.

➤ Détermination de la teneur en vitamine C

La vitamine C ou l'acide ascorbique est une lactone d'un acide hexonique comporte une fonction ènediol (figure 14). De part sa structure chimique elle est relativement stable en milieu acide mais elle est facilement oxydée en milieu basique par des oxydants. C'est sur son pouvoir réducteur, sa principale propriété chimique que sont basées la plupart des techniques de dosage (MOSER *et al*, 1990 ; LUO, 2015).

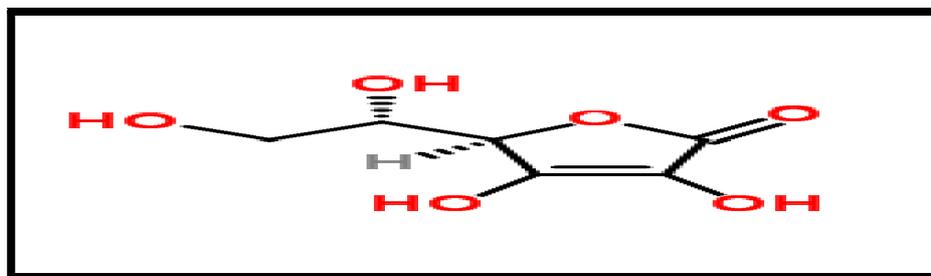


Figure 14 : structure de la vitamine C, (R)-3,4-dihydroxy-5-((S)-1,2-dihydroxyéthyl)furan-2(5H)-one

Actuellement on utilise deux méthodes chimiques pour ce dosage ; la méthode de TILLMANN et P. HIRSCH (1932) qui indique que l'acide ascorbique réduit et décolore une solution de 2,6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) et la méthode de E. MARTINI et A. BONSIGNORE (1934) qui utilise la propriété de l'acide ascorbique à décolorer sous l'influence de la lumière blanche une solution de bleu de méthylène (BURUIANA, 1939).

La première méthode quoique très répandue n'est pas spécifique, par contre la deuxième méthode est de loin la plus spécifique mais ils n'ont pas trouvé dans les liquides biologiques

des substances capables dans les conditions de travail, de la méthode, de décolorer la solution de bleu de méthylène sous l'influence de la lumière blanche (BURUIANA, 1939).

○ Principe de la méthode de DCPIP

Cette méthode consiste à la réduction du colorant de 2,6 DCPIP par l'acide ascorbique en milieu acide. En présence d'acide ascorbique qui est un bon agent réducteur, la couleur bleu du DCPIP est réduite en un composé incolore. Cette réaction est une réaction redox : l'acide ascorbique est oxydé en acide déshydroascorbique et le DCPIP est réduit en un composé incolore DCPIPH. (figure 15), (CABELLO, 2009). Les conditions expérimentales sont représentées en annexe (03).

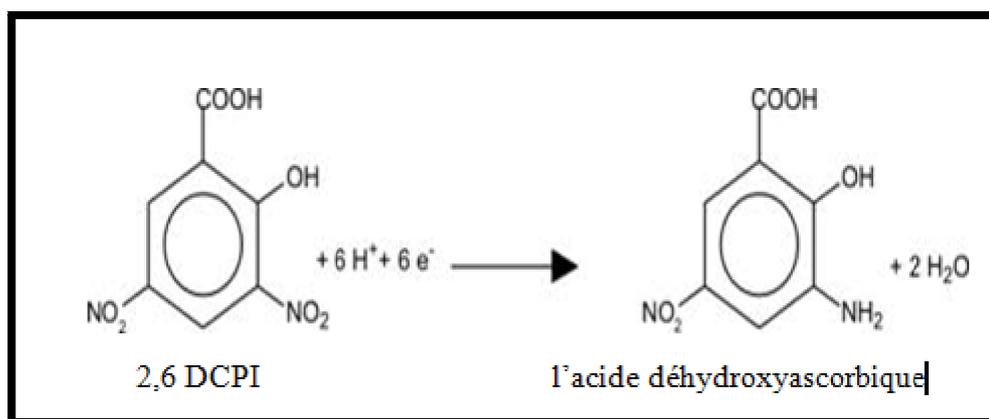


Figure 15 : Réaction de réduction de DCPIP par l'acide ascorbique (DURUPHTY, 2005).

II.1.2.2. Fractionnement des protéines sériques bovines

Le lait cru à partir du moment où il subit un écrémage par centrifugation (20mn, 5°C, 4000×g), le pH du lait est amené de 8 à 4,6 par addition d'HCL (4N). On a obtenu deux phases ; un surnageant (représente les protéines sériques) et un culot (représente les caséines). Les protéines sériques ainsi récupérées sont dialysées à 4°C pendant 24 heures contre de l'eau distillée sous agitation pour accélérer le phénomène puis lyophilisées (figure 21).

➤ La dialyse

La dialyse est un procédé de séparation par membrane des molécules ou des ions basée sur les principes régissant la diffusion à travers une membrane perméable ou semi-perméable. Les molécules diffusibles vont traverser la membrane selon le gradient de concentration (déplacement net des molécules du côté le plus concentré vers le côté le moins concentré). À l'équilibre, les concentrations de chaque espèce diffusible seront égales de part et d'autre.

➤ Hydrolyse enzymatique par la trypsine

L'objectif de l'hydrolyse enzymatique est de remplacer les molécules synthétiques, la recherche de molécules bioactives ainsi que de tester la sensibilité des protéines sériques à l'action de la trypsine.

La trypsine (EC 3.4.21.4) est une peptidase du suc pancréatique participant à la digestion des protéines, son poids moléculaire est de 24000 Da et elle est active à pH 8 (SZMOLA *et al*, 2003). Elle s'agit d'une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique Lys-|-Xaa ou Arg-|-Xaa engage sa fonction acide (BERNARD *et al*, 2006), sauf dans le cas où l'acide aminé suivant (schématisé ici par "Xaa") est une Proline). Elle coupe en C-terminal de ces acides aminés (figure 13). En d'autres termes, elle transforme les chaînes polypeptides en chaînes peptique pour permettre la digestion (BHAGWWANDIN *et al*, 2003). Des volumes appropriés de la trypsine sont ajoutés aux protéines sériques afin d'obtenir un rapport molaire enzyme/ substrat (E/S) équivalent à 2%. La réaction d'hydrolyse a été arrêtée par chauffage à 100°C.

L'hydrolyse enzymatique par la trypsine a été réalisée à une température de 40°C en présence d'un tampon TRIS-HCL à raison 10^{-3} N, les hydrolysats de protéines sériques ainsi obtenus sont prélevés à différents temps (T0 : 0mn, T1 : 15mn, T2 : 30mn, T3 : 60mn, T4 : 120mn), puis sont lyophilisés.

➤ Chromatographie d'exclusion

Ce type de chromatographie aussi appelé tamisage moléculaire ou gel-filtration (figure 16) vise à séparer les molécules en fonction de leur masses moléculaires et leur formes moléculaires à travers une phase stationnaire appropriée qui permet d'éluer les protéines par ordre décroissant en faisant passer les molécules les plus petites en dernier et les plus grosses en premier (HONG, 2012), (figure 17).

Les protéines sériques du lait de vache ont été séparées par chromatographie de perméation sur gel de sephacryl S100 qui est un gel préparé par réticulation covalente d'un allyle de dextrane avec N, N' méthylène bis-acrylamide. Ce gel a une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre 10^3 et 10^5 Da. Le gel est mis en contact du tampon de départ (TRIS-HCL, 0,02 M et pH 8,4), ensuite dégazé sous vide puis introduit dans la colonne (20×1cm) en une seule fois. L'élution a été faite à température ambiante avec le tampon TRIS-HCL avec un débit de 0,46 ml/min.

Les protéines sériques lyophilisées (100 mg) sont solubilisées dans 2 ml de tampon TRIS-HCL (0,02 M et pH 8,4), ensuite déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à des débits constants. Des fractions de 2 ml sont recueillies pour les identifier. Le protocole expérimental est représenté en annexe (04).



Figure 16 : Unité chromatographique

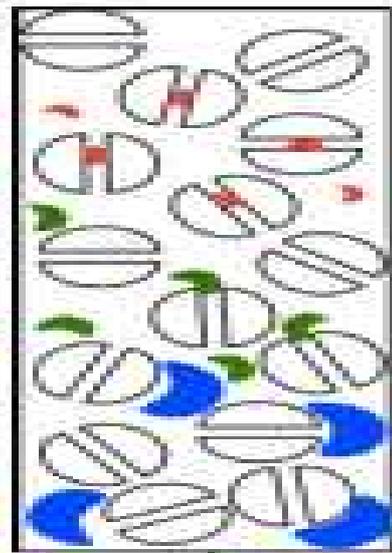


Figure 17 : Chromatographie d'exclusion (RITCHIE, 2012).

➤ Méthodes électrophorétique

L'électrophorèse est une méthode utilisée pour le fractionnement des molécules biologiques ionisées (Acide aminés, Acide nucléiques). Les molécules migrent dans un champ électrique à des vitesses différentes en fonction de la masse moléculaire et la charge électrique. Les molécules anioniques migrent vers l'anode et les molécules cationiques se déplacent vers la cathode (AGNESE, 1994), (figure 18).

Cette technique est très utilisée en immunologie et dans l'étude des protéines car elle permet après la séparation des différentes protéines leur transfert sur une membrane de nitrocellulose ou de polyfluorure de vinylidène afin d'être identifiées par le biais d'anticorps spécifiques. Cependant son inconvénient réside dans la difficulté d'extraire tous le matériel dans l'échantillon original. Elle permet aussi de traiter simultanément plusieurs échantillons en même temps (DUNBAR, 1987).

Une électrophorèse verticale est réalisée sur un gel de polyacrylamide qui permet la migration différentielle des protéines. Ce dernier est l'un des supports électrophorétique les plus utilisés pour ces séparations en raison de ses différents avantages qui sont la transparence et la reproductibilité, mais des précautions de manutention doivent être prise car le polyacrylamide est neurotoxique (TILSON, 1981). Grâce à ces mailles il joue le rôle de tamis qui freinent les protéines proportionnellement à leurs tailles (PM). Les protéines les plus grosses restent proches de leur points de dépôts alors que les petites migrent plus loin (CHRAMBACH, 1971).

La propriété de tamis des gels de polyacrylamide est liée à leurs structures particulière en réseau tridimensionnel de fibres et de pores ; résultant du griffage d'unité de N, N-méthylène-bisacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$) bi-fonctionnelle sur des chaînes de polyacrylamide ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) adjacente (HAMES, 1981), (figure 19). La structure du

gel est défini par les indices T (rapport (%) (acrylamide + bisacrylamide) sur le volume du gel) et C (rapport (%) (bisacrylamide / acrylamide + bisacrylamide)). Sa porosité est ajustée en faisant varier les concentrations relatives de a et b. La taille effective des pores d'un gel est d'autant plus petite que sa concentration en acrylamide est élevée (CHRAMBACH, 1971).

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

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

a : acrylamide (g) ; b : N, N-méthylène –bisacrylamide (g) ; v : volume du tampon (ml).

La polymérisation est en général initiée par du persulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ en présence de l'accélérateur TEMED (N, N, N', N'-tétraméthylènediamine). Le TEMED (sous sa forme basique, ce qui implique un pH suffisamment élevé) catalyse la formation de radicaux libres à partir du persulfate et initie donc la polymérisation (BIO-RAD, 2000).



Figure 18 : Unité électrophorétique

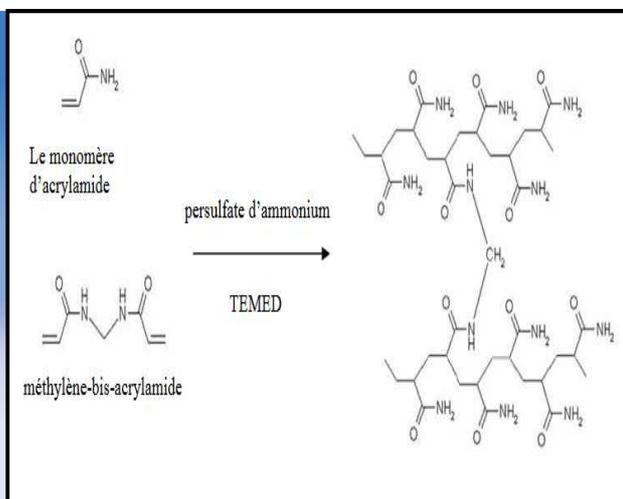


Figure 19 : Réaction de polymérisation entre l'acrylamide et le bisacrylamide

L'oxygène étant un inhibiteur de polymérisation, les solutions de monomères devraient donc être dégazées avant d'être mises à polymériser (Hepworth, 1956). Le mélange acrylamide / bisacrylamide / solution tampon / réactifs d'initiation de polymérisation est coulé dans un volume défini entre deux plaques de verre et des intercalaires de faible épaisseur.

La révélation des bandes se fera par le bleu de coomassie révélant une série de bandes. La mobilité de ces protéines est inversement proportionnelle à leurs masses. On dit que la mobilité des protéines est linéairement proportionnelle au logarithme de leurs masses. Il devient donc possible de déterminer le poids des protéines par comparaison à un marqueur de poids moléculaires.

- **Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)**

Dans l'électrophorèse en conditions non dénaturantes (PAGE-native) les molécules sont séparées dans leur état le plus proche possible de leur état natif. Pour un support et un voltage donnés la vitesse de migration dépendra de la charge native de la molécule (plus la charge est importante, plus la vitesse de migration sera importante), la masse moléculaire (plus la masse moléculaire est importante, plus la vitesse de migration de la molécule sera faible) et la structure tridimensionnelle. En effet, à masse moléculaire égale, une molécule pourra selon sa forme être plus ou moins ralentie dans sa progression par le support. Par exemple, une molécule de structure globulaire sera moins ralentie qu'une molécule de structure fibreuse (NINFA, 1998).

En se basant sur la méthode de HILIER (1976), nous avons utilisé un gel de polyacrylamide à T= 12% et C=2,7%. La polymérisation est catalysée par un générateur de radicaux libres composés de persulfate d'ammonium et de TEMED.

Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0,75M et pH 8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (TRIS, 5mM ; glycine, 77mM ; pH 8,3). Les échantillons protéiques sont préparés à raison de 2mg/ml dans une solution contenant le tampon de gel (1/10 V/V) dans l'eau distillé (7/10 V/V) et du glycérol 10% (V/V). Les conditions expérimentales sont représentées en annexe (05).

- **L'électrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes (PAGE-SDS)**

Le SDS est un détergent très puissant, très hydrophobe qui rompt les liaisons non covalentes (BRUNELLE *et al*, 2014), (figure 20). Le SDS se fixe sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques en dénaturant les protéines de façon réversible et se fixe dessus avec une densité linéaire approximativement constante (BRUNELLE *et al*, 2014).

Un complexe SDS-protéine ainsi se forme et comporte une charge négative ce qui rend la charge des protéines négligeables. La séparation se fait donc uniquement en fonction de la masse moléculaire (ANDREW, 2014), (voir annexe 06).

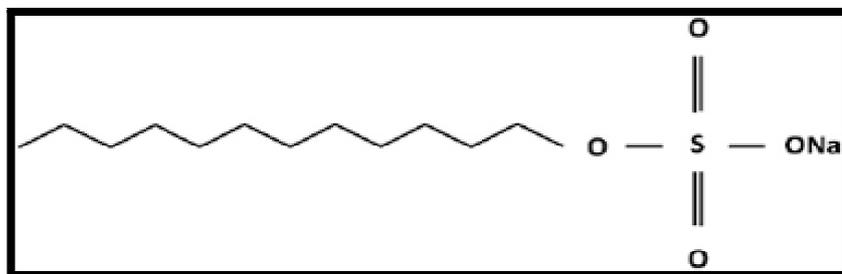


Figure 20 : Structure de SDS (dodécylsulfate de sodium)

Ce type de séparation est basé sur un système bi-phasique comprenant 2 types de gels :

- Un gel de concentration (T=4% et C=2,7%) en tampon TRIS- HCl, pH 6,8, faiblement réticulé qui n'exerce aucun effet de tamisage moléculaire et tend plutôt à concentrer les échantillons.
- un gel de séparation (T=17% et C=2,7%) en tampon TRIS-HCl, pH 8,8 à travers lequel les protéines migrent selon leur PM (LAEMMLI *et al*, 1973).

L'échantillon protéique est chauffé à 100°C pendant 5 min en présence du détergent anionique SDS (10% P/V) et d'un agent réducteur qui est le 2-mercaptoethanol (2-ME ; 4% V/V) chargé de rompre les liaisons disulfures.

- **Révélation des bandes de migration électrophorétiques**

A la fin de la migration le gel est démoulé ensuite les protéines sont fixées par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) (12%, P/V) pendant 45min puis révélées après 2 à 4h par immersion dans une solution de bleu de coomassie (0,2%, P/V), d'eau distillée (1volume) et de TCA (2%, P/V). La décoloration est effectuée par plusieurs lavages dans une solution (eau/ méthanol/ acide acétique) dans les proportions respectives 3,12/ 1,5/ 0,37(V/V/V).

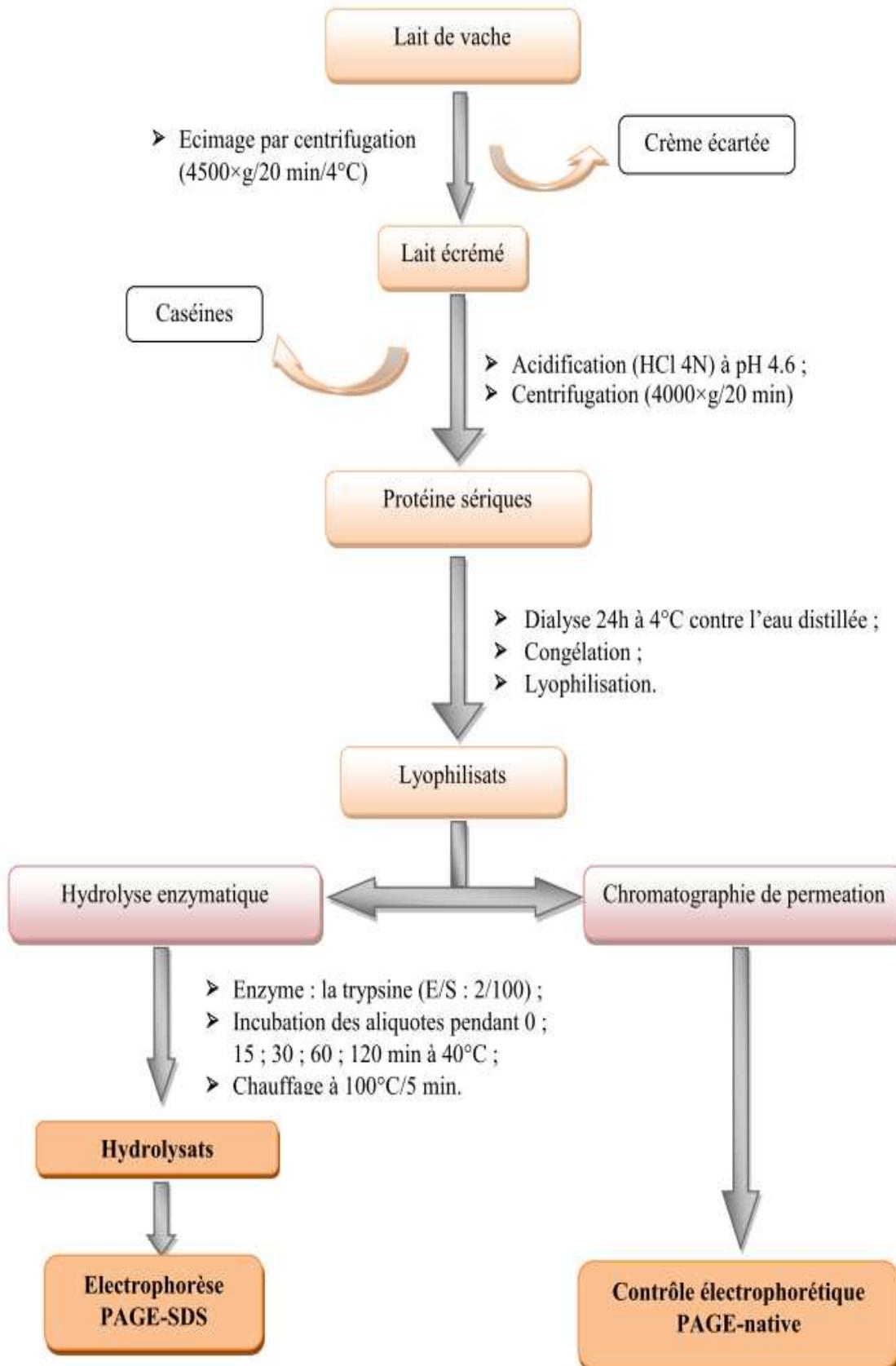
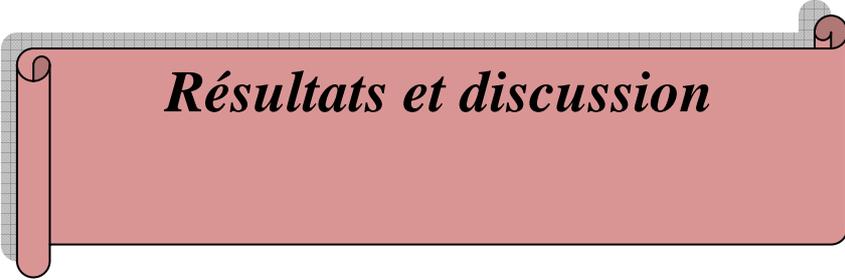


Figure 21 : Etapes suivies lors de l'isolement des protéines sériques à partir du lait de vache.



Résultats et discussion

II.2. Résultats et discussions

II.2.1 Analyses physico-chimiques

II.2.1.1. Composition en protéines du lait de vache

L'analyse des résultats présentés dans la figure 22 montre que la teneur en protéines totales est de 30,36 g/l, 23,42 g/l et 21,39 g/l pour le lait de vache cru (LV), le lait reconstitué (LR) et le lait UHT, respectivement. La teneur en protéines totales pour LR et UHT est inférieur à celle du LV.

La concentration moyenne en protéines totales du lait de vache donnée par COURTET, (2010) est de 32 g/l. Cette valeur est conforme à celle trouvé pour notre lait de vache cru (30.36 g/l). Bien que la quantité en protéines n'est toujours pas stable, plusieurs facteurs interviennent en modifiant cette valeur ; environnementaux (climat, une alimentation riche ou pauvre en plantes herbacées), espèce (vache laitières ou non) et la race, etc.

Les protéines sont des molécules sensibles à la chaleur ce qui fait que les divers traitements thermiques appliqués sur le lait en industrie peuvent avoir des effets dénaturants sur ces dernières. En effet, lors du chauffage, des réactions de dénaturation et d'agrégation de protéines se produisent et le phosphate de calcium précipite. Cet effet est en fonction de l'intensité du traitement thermique (la pasteurisation dans le cas du lait reconstitué et la stérilisation dans le cas du lait UHT) et la durée du traitement impliqué (CALVO, 1995).

La sensibilité des protéines du lait est due principalement aux protéines sériques car les caséines sont moins sensibles à la chaleur. Les différentes protéines sériques n'ont pas la même résistance face aux traitements thermiques, leur ordre de sensibilité est comme suit ; immunoglobulines > séralbumines > β -lactoglobuline > α -lactalbumine (CORREDIG *et al*, 1996). Le chauffage des protéines sériques entraîne l'ouverture des structures secondaire et tertiaire qui permet l'agrégation de ces protéines entre elles ou avec les micelles de caséine.

Les conditions du stockage et de transport influent aussi sur la teneur en protéines dans le lait et cela peut être expliqué par la prolifération des bactéries lactiques qui utilisent une partie des protéines pour initier la fermentation lactique (WAUNGANA *et al*, 1996).

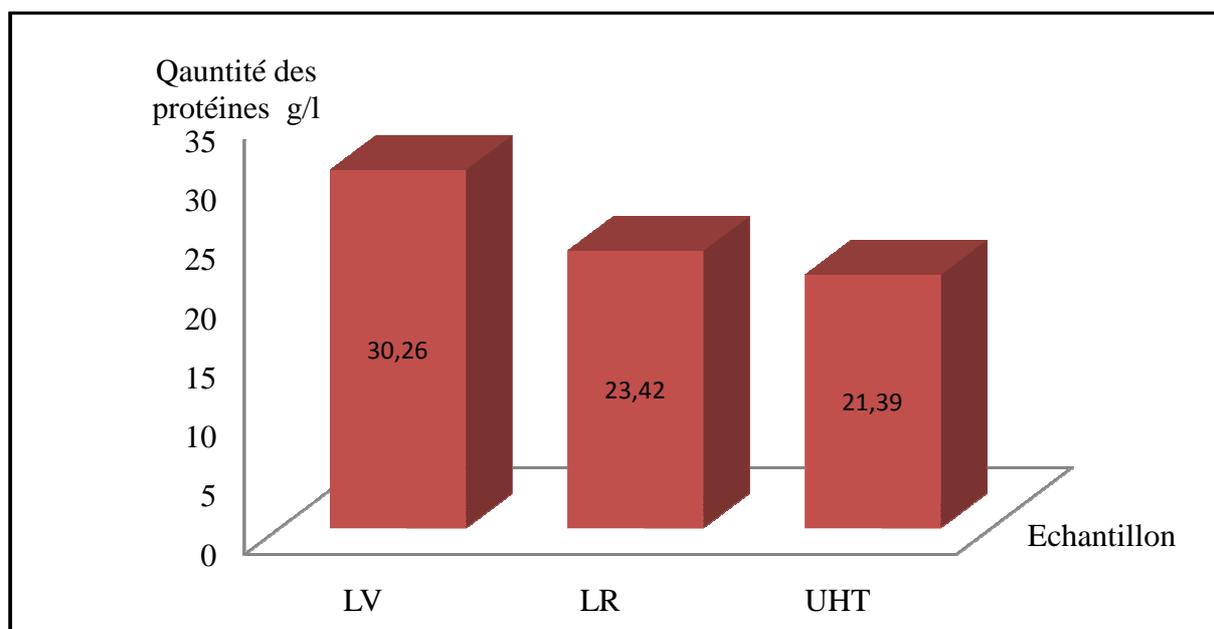


Figure 22 : Histogramme représente la quantité des protéines dans trois échantillons de lait (LV: lait de vache cru, LR : lait reconstitué et UHT).

II.2.1.2. Composition en sucres réducteurs du lait de vache

Les résultats de dosage des sucres réducteurs obtenus pour les différents échantillons analysés (figure 23) sont respectivement de 45,4 g/l, 43 g/l, et 48,5 g/l pour les laits LV, LR et UHT. La concentration en sucres réducteurs dans le lait de vache (45.4 g/l) est inférieure à celle enregistré par POUGHEON *et al* (2001) qui est de 48-50 g/l.

La teneur en sucres réducteurs dans le LR est légèrement inférieure à celle du LV. Le chauffage du lait entraîne une certaine transformation des sucres réducteurs présent dans le lait y compris le lactose qui est le sucre majoritaire dans le lait ainsi que des sucres simples tels que le glucose et galactose qui se trouvent à l'état libre où provenant de la dégradation de lactose. Les sucres réducteurs présents dans le lait sont impliqués dans deux types de réactions de dégradations, soit l'isomérisation ou la réaction de Maillard. La première est plus importante d'un point de vue quantitatif à des températures supérieures à 100 °C tandis que la seconde prédomine à des températures inférieures à 100°C (VAN BOEKEL, 1998). Cela explique la diminution légère de la quantité des sucres réducteurs dans le LR.

La quantité des sucres réducteurs dosés au niveau du lait UHT (48.5 g/l) est plus élevée par rapport au LV et LR. Ce résultat peut être expliqué par l'addition d'une quantité de sucre au cours du traitement industriel du lait dans le but d'améliorer ses qualités organoleptiques.

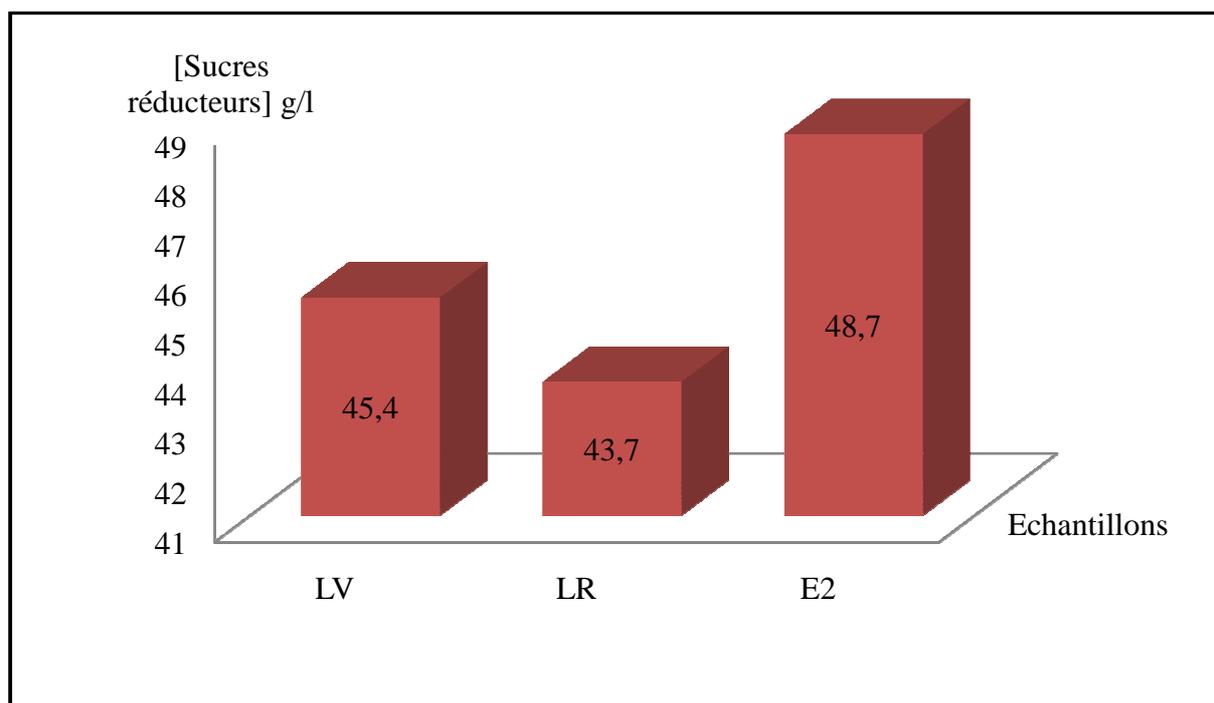


Figure 23 : Histogramme représente la quantité de lactose dans différents types de lait de vache (LV : lait de vache cru, LR : lait reconstitué et lait UHT).

II.2.1.3. Composition en vitamine C du lait de vache

D'après les résultats obtenus (figure 24) on remarque une variation de la teneur en vitamine C dans les différents laits qui sont de 20.5 mg/l, 16.4 mg/l et 8.2 mg/l pour le lait LV, LR et UHT, respectivement.

La quantité de la vitamine C dans l'échantillon du LV est un peu plus élevée par rapport au donnée de POLONOVSKY *et al* (1971) qui est de 19 mg/l pour un lait de vache provenant des races étrangères et jusqu'à 20 ± 0.6 mg/l pour un lait de vache cru local (BAAZIZ *et al*, 2004).

La quantité de la vitamine C dans le LR est légèrement inférieure à celle trouvée dans le lait LV. Cela peut être expliqué par la légère sensibilité de la vitamine C à la pasteurisation avec une perte de 10 % en vitamine C (FAO, 1995).

En revanche cette quantité diminue presque de la moitié (jusqu'à 50%) pour le lait UHT (traitement thermique intense). Cela peut être expliqué par la fragilité et la sensibilité de la vitamine C à la lumière et au traitement thermique (BLANC, 1966). D'autre part le stockage du lait au réfrigérateur (2 à 4 °C) pendant 36 heures détruit la moitié jusqu'à trois quarts de la vitamine C (FAO, 1995).

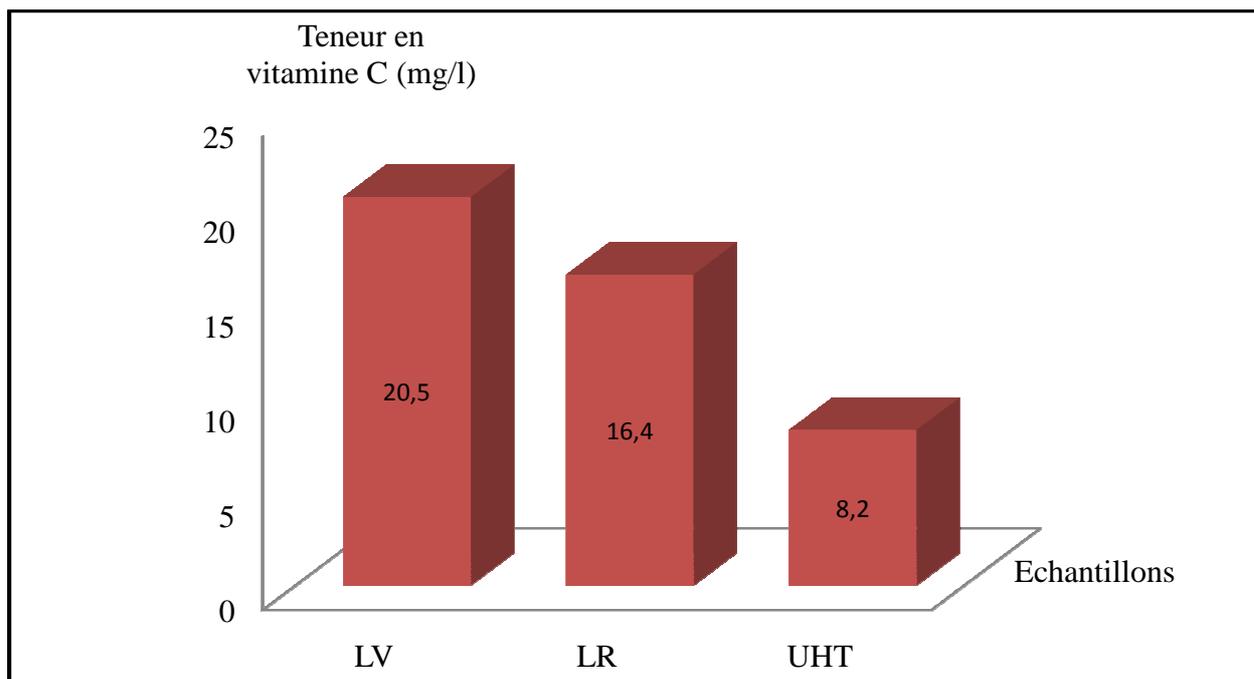


Figure 24 : Histogramme confrontant la composition en vitamine C dans différents laits de vache (LV : lait de vache cru, LR : lait pasteurisé et UHT).

II.2.2. Analyse chromatographique

L'analyse chromatographique des protéines sériques bovines sur gel de perméation (séphacryl S100) a révélée 5 pics notés F1, F2, F3, F4 et F5 de volume d'éluion différent comme il est indiqué dans le chromatogramme ci-dessous (figure 25).

Le contrôle électrophorétique en PAGE-native (figure 26) réalisé sur les fractions obtenues par chromatographie de perméation sur gel de séphacryl S100 montre l'existence de 4 bandes d'intensités différentes qui correspondent aux Igs, BSA, α -La et β -Lg migrant essentiellement selon leur charge et leur poids moléculaire.

Les fractions F1 et F5 renferment une seule bande qui correspond à la β -Lg, alors que les fractions F2 et F3 ne renferment aucune bande ce qui veut dire qu'aucune protéine n'a été éluée. La fraction F4 renferme 4 bandes qui correspondent aux Igs, BSA, α -La et β -Lg.

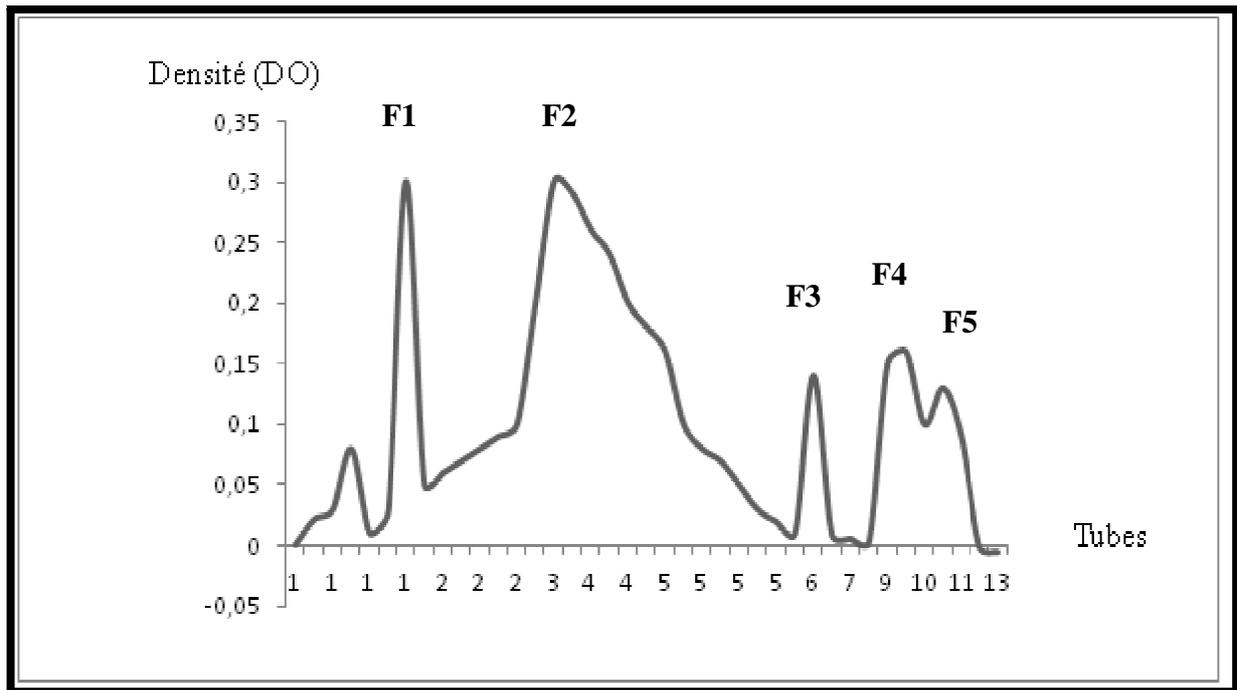


Figure 25 : Chromatographie Sur gel de perméation des protéines sériques bovines sur Séphacryl S100 ; colonne (20 × 1cm) ; Tampon Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4 ; Dépôt 50 mg de protéines ; Débit d'élution 0.46 ml/min.

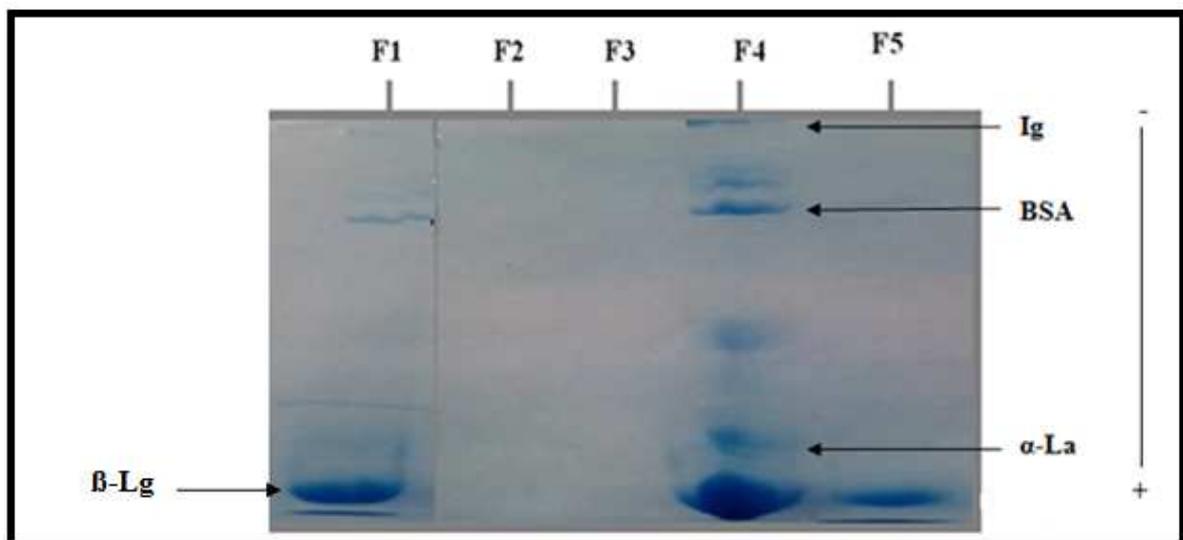


Figure 26 : Electrophorogramme en PAGE- native (T = 12 % et C = 2,7 %) et issu de la chromatographie de perméation sur gel de sephacryl S100.

(T : témoin, T1 : β-Lg= β -lactoglobuline).

La révélation des protéines est réalisée avec le bleu de coomassie R250.

L'électrophorégramme (figure 26) révèle que :

- On a pu isoler la β -Lg dans les fractions F1 et F5.
- Plusieurs protéines sériques, à savoir les Igs, la BSA, la α -La et la β -Lg étaient présentes dans la fraction F4. Ceci engendre une mauvaise séparation de ces protéines en chromatographie de perméation.

Afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines sériques bovines d'autres méthodes plus performantes sont actuellement utilisées y compris la chromatographie d'échange d'ions dans les conditions de haute performance (FPLC) qui assure une pureté de haut degré en une seule étape de séparation, ou la combinaison entre plusieurs techniques chromatographiques (de perméation, d'échangeuse d'ions d'affinité, etc.).

II.2.3. Hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines par la trypsine

Les fractions protéiques du lait de vache présentent un double intérêt nutritionnel et technologique. Les protéines constituent une source d'acides aminés indispensables avec un apport énergétique faible et comptent des peptides qui ont un rôle biologique important (MAUBOIS *et al*, 1991). Elle joue aussi un rôle fondamental dans l'industrie laitière grâce à ces propriétés moussantes, émulsifiantes, gélifiantes, etc. (CAYOT, 1998).

Après hydrolyse enzymatique des protéines sériques par la trypsine à une température de 40°C, les hydrolysats de protéines sériques obtenus sont prélevés à différents temps (T0 : 0 mn, T1 : 15 mn, T2 : 30 mn, T3 : 60 mn et T4 : 120 mn). Par la suite on a effectué un contrôle électrophorétique en PAGE-SDS. Le résultat obtenu est présenté par la figure (27).

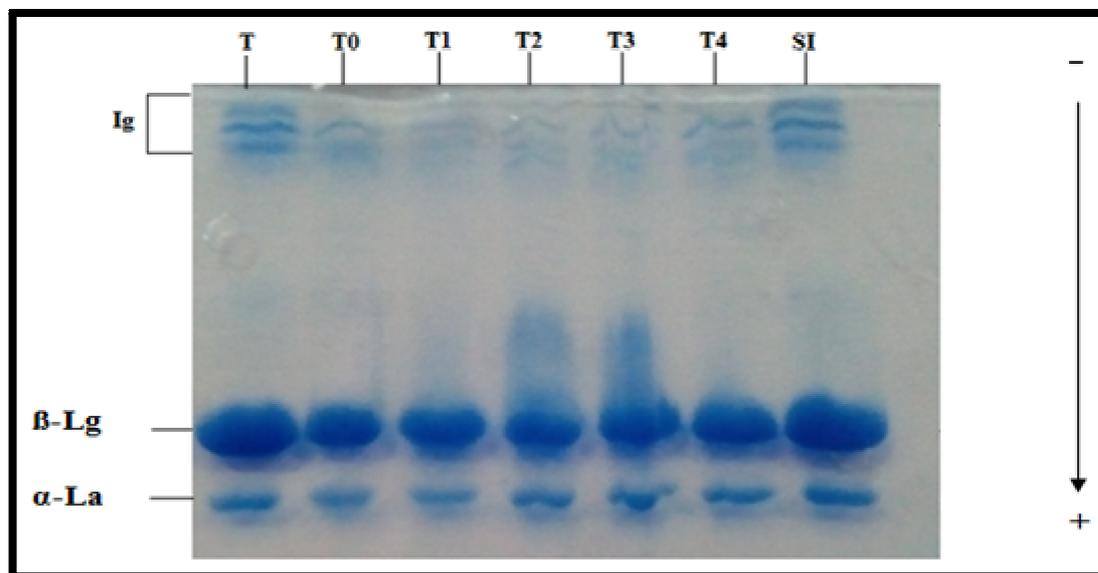


Figure 27 : Electrophorégramme en SDS-PAGE (T = 4,8 % et C = 2,7%) des fractions de l'hydrolyse enzymatique des protéines sériques bovines.

T : Protéines sériques totales ; T0, T1, T2, T3 et T4 : Prélèvement des hydrolysats enzymatiques des protéines sériques à des temps différents ; 0 min, 15 min, 30 min, 60 min et 120 min ; SI : Protéines sériques sans enzyme incubées à 40 °C pendant 120 min.

Les bandes enregistrées dans le premier puit (T : témoin) correspondent à 3 protéines (Ig, β -Lg et α -la de poids moléculaires de 150 à 1000 KDa, 18 et 14 KDa, respectivement) les mêmes bandes sont visualisées au niveau de T0 (correspond à un mélange d'échantillon protéique et enzyme sans traitement thermique). Les bandes enregistrées au niveau du dernier puit SI (Protéines sériques sans enzyme incubé à 40 °C pendant 120 min) sont comparables à ceux enregistrés au niveau de T0. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la température (40 °C) n'a aucune influence sur la structure des protéines sériques.

Les bandes correspondantes à l'Ig commencent à disparaître à partir de 15 min du fait de sa sensibilité à l'enzyme. La bande correspondante à la β -Lg devient plus fine ce qui traduit son hydrolyse.

La β -Lg est une protéine globulaire de structure compacte, composée de 162 résidus d'acides aminés et dont la masse moléculaire relative est de 18,3 kDa (BROWNLOW *et al*, 1997). La structure tertiaire de la β -Lg à l'état monomérique comprend 9 feuillets β antiparallèles (ROUFIK, 2005), (figure 28). Cette structure ne permet pas à la trypsine d'accéder facilement aux liaisons peptidiques.

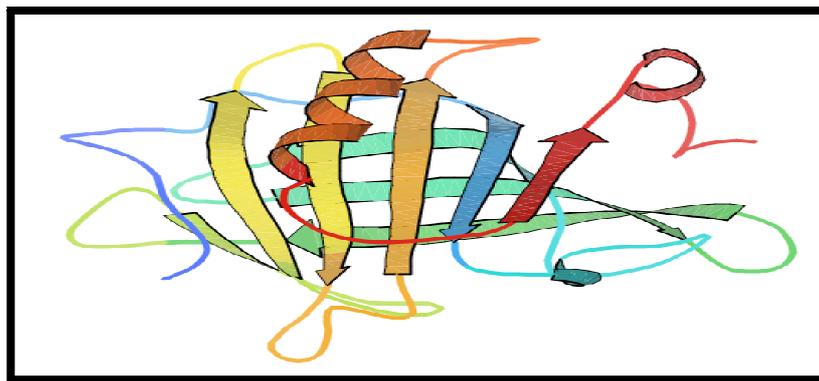


Figure 28 : Structure tridimensionnelle de la β - lactoglobuline (BROWNLOW *et al*, 1997).

CHOBERT *et al* (1991) ont démontré que la β -Lg est fortement hydrolysée par la trypsine à pH 8. L'ouverture partielle de la cavité hydrophobe de la protéine à pH alcalin (TANFORD *et al*, 1959 ; QIN *et al*, 1998a) permettrait d'expliquer l'efficacité de la trypsine à ce pH. Les sites de coupures de la trypsine sur la β -Lg sont illustrés dans la figure 29.

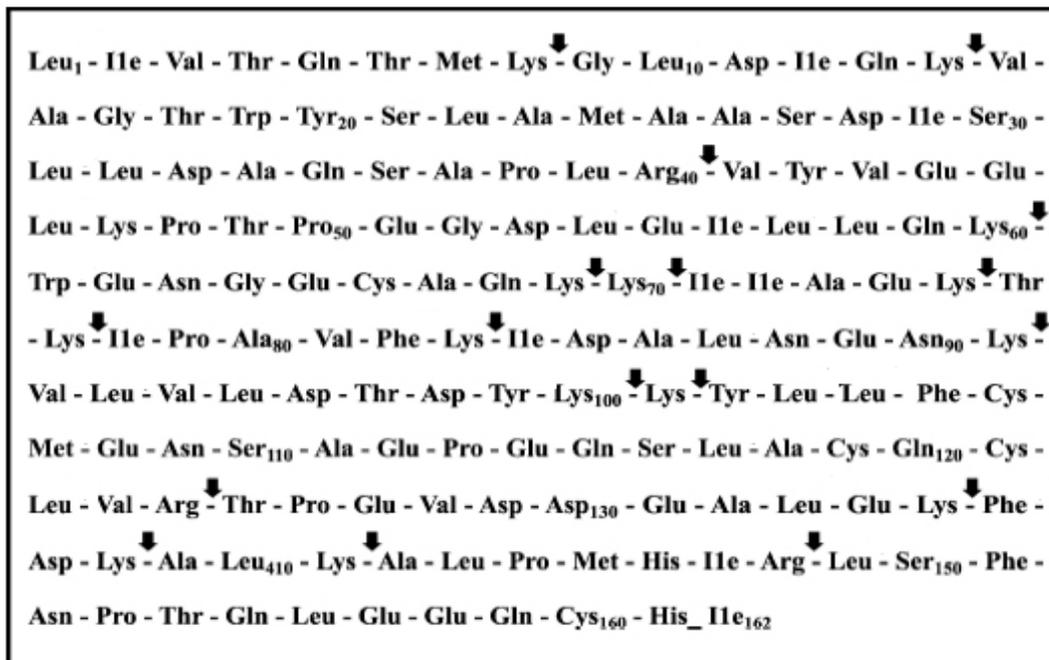


Figure 29 : Localisation des sites de coupures théoriques de la trypsine (↓ : Lys, Arg) dans la structure primaire de la β-Lg variant B.

L'α-La est une holoprotéine comportant 123 acides aminés, pour une masse de 14,2 kDa. Elle est composée de 43,1% hélice α et 13,3% feuillet β et 15,6% de coudes β (figure 30).

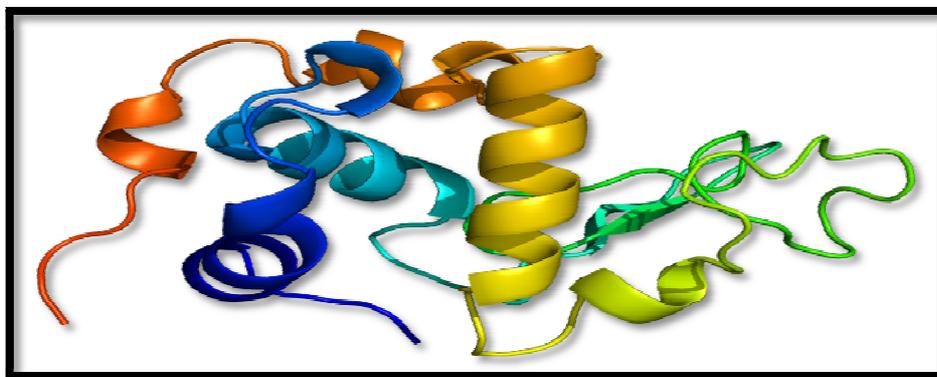


Figure 30 : Structure tridimensionnelle de l'α lactalbumine du lait bovin (JOHNKE *et al*, 2012)

L'α-La présente une structure protéique riche en lysine (faible en arginine). Ces acides aminés constituent le site de coupure de la trypsine, mais du fait de sa structure globulaire et compacte rend ces sites de coupures inaccessibles pour la trypsine. Les différents sites de coupures de la trypsine sur la α-La sont illustrés dans la figure 31.

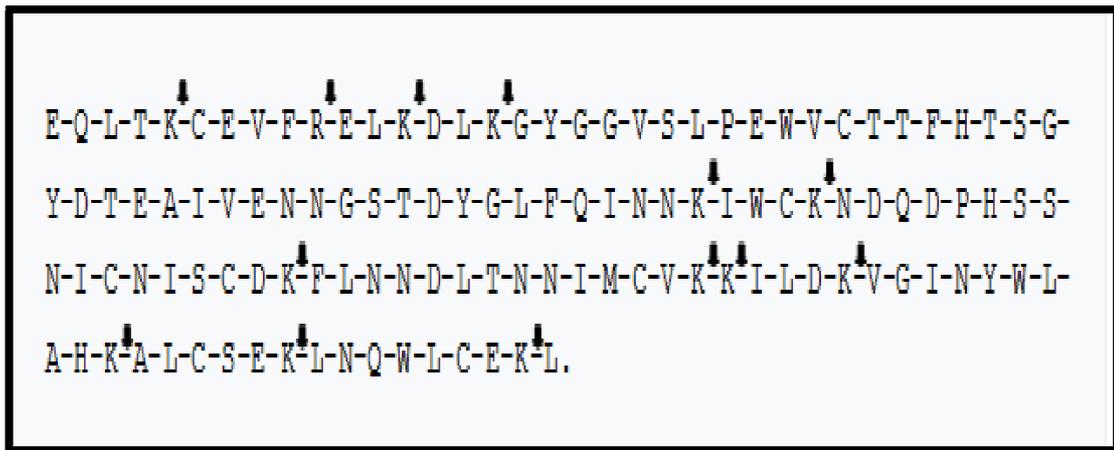
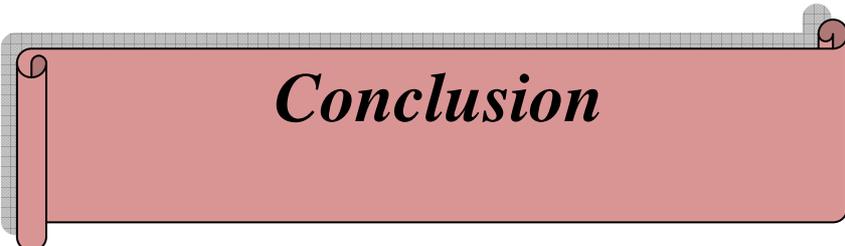


Figure 31 : Localisation des sites de coupures théoriques de la trypsine (↓ : Lys, Arg) dans la structure primaire de la α -La.



Conclusion

Conclusion

Conclusion

Plusieurs facteurs influencent sur la qualité et la disponibilité du lait bovin vu sa composition chimique complexe et microbiologique facilement altérable par l'action des bactéries lactiques d'où la nécessité des transformations industriels (pasteurisation, stérilisation...etc.) dans l'objectif d'augmenter la durée de conservation de ce produit. En revanche ces traitements influence sur sa composition en fonction du degré et la sévérité du traitement appliqué.

Les résultats obtenus dans notre stage pratique montre que :

- L'analyse du lait pasteurisé et lait UHT par la méthode de Lowry *et al*, (1951) montre une diminution dans leur composition en protéines par rapport au lait de vache cru. Ces résultats peuvent être expliqués par la sensibilité des protéines aux traitements.

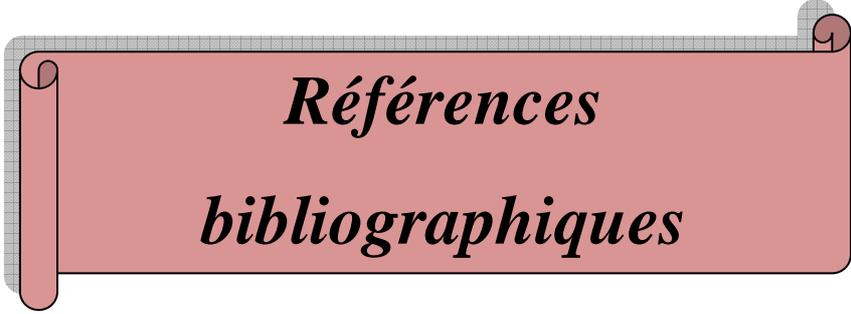
- De faibles variations en sucres réducteurs dans le lait UHT et lait reconstitué ont été trouvées en utilisant la méthode de 3,5-DNS. Cela peut s'expliquer par le fait que les sucres ne sont pas facilement détruits par la chaleur. On peut aussi l'expliquer par l'ajout de sucres au cours des transformations industrielles dans l'objectif d'améliorer sa qualité organoleptique et répondre aux besoins des consommateurs.

- Les résultats obtenus pour le dosage de la vitamine C dans le lait de vache cru, lait reconstitué et lait UHT en utilisant la méthode de 2-6-dichlorophénolindophénol (DCPIP) montrent la sensibilité de la vitamine C à la pasteurisation et à l'ultra haute température (UHT).

- Les protéines sériques bovines séparées par chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S 100 n'ont pas pu être purifiées à l'exception de la β Lg qui a pu être isolée dans les fractions F1 et F5. L'utilisation d'autres techniques notamment à hautes performances, comme la HPLC, pourra améliorer ce résultat.

- De toutes les protéines sériques, la α -La semble être résistante à l'hydrolyse trypsique qui pourrait s'expliquer par sa structure globulaire compacte maintenu par 4 ponts disulfures, ce qui pourrait masquer les sites se trouvant au cœur de la protéine.

Les méthodes utilisées sont de mise en œuvre facile, de faible coût et permettent d'obtenir des résultats fiables. Ces méthodes nous permettent un contrôle de qualité des produits alimentaires, d'assurer aux consommateurs une bonne qualité organoleptique (satisfaction), hygiénique (service), ainsi qu'une bonne qualité nutritionnelle (santé), ce qui constitue une garantie aux consommateurs.



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

AFSSAPS. (2005). Prise en charge thérapeutique du patient dyslipidémique.

AIRED W.C. (2004). Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*, 32(5), 271-9.

AGNESE J.F. (1994). Principes et analyse des données de l'électrophorèse des protéines enzymatiques. Centre de Recherches Océanologiques, Abidjan, Côte d'Ivoire.

AKOUDAD H., EI KHORB N., SEKKALI N., MECHARFI A., ZAKARI N., OUAHA L., LAHLOU I. (2015). L'infarctus du myocarde au Maroc: les données du registre FES-AMI. *Science Direct*, 64, 434–438.

ALARCON E.C., MANRIQUEZ N.R., ALVAREZ M.T., SILES E.T. (2009). Optimization of anaerobic thermophilic culture conditions for increasing xylanase enzyme production with encapsulated and free bacteria strains. *BIOFARBO*, 7(2), 51-59.

ALAIS C. (1984). Science du lait - principes des techniques laitières. Paris, Editions Sepaic. 4^{ème} éd., 814 pages.

AMARA T., BOUGHELLOUT M. (2015). Les effets protecteurs des plantes médicinales contre stress oxydant. Mémoire de fin d'étude, Université des Frères Constantine, Mentouri, Algérie.

ANDER B.P., DUPASQUIER MC., PROCIUK M.A and PIERCE G.N. (2003). Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental and Clinical Cardiolgy*, 8(4), 164–172.

ANDRE P., SIX M., GRISON C., METRON. (2013). Intérêt d'une activité physique adaptée pour la correction des facteurs de risque cardiovasculaire chez le sujet coronarien. *Kinesither Rev*, 13(135), 23–28.

ANDREW B., NOWAKOWSKI, WILLIAM J., WOBIG., DAVID H., PETERING. (2014). Native SDS-PAGE : High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics*, 6(5), 1068–1078.

ANSES. (2011). Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. disponible en ligne sur l'adresse : <http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359Ra.pdf>.

ARONOW H.D., BECKMAN J.A. (2016). Parsing Atherosclerosis : The Unnatural History of Peripheral Artery Disease. *Circulation*, 134, 438-440.

ARUOMA O.I. (1998). Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*, 75(2), 199-212.

ASSMANN G., CARMENA R., VALENCIA P.C., MUNSTER J.C., FRUCHART., LEWIS B., MANCINI M., OLSSON A., LINKOPING R., MILAN M.T. (1998). Maladie coronarienne : réduire le risque. Nouvelle Société Française d'Athérosclérose.

Références bibliographiques

BAAZIZ F et SADAT L. (2003). Analyses physico-chimique et électrophorétique des protéines, des laits de mélanges provenant de troupeaux de chèvres des régions de Ouargla, Djelfa, Illizi, et Tamanrasset. Mémoire, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

BAELDE D., BERTA J.L., BOUGNEUX P., CHARDIGHY J.M., CLOUET P., COMBE N., DU CHAFFAUT L., GERBER M., JUANEDA P., LAFAY L., LAGARDE M., LALOUX L., LEDOUX M., LEGRAND p., QUIGNARD-BOULANGE A., SCHMITT B., SEBEDIO J.L. (2005). Risques et bénéfices, recommandations pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments. Avenue du Général Leclerc, AFSSA, 27-31.

BEAUDEUX J.L., DELATTRE J., THEROND P., BONNEFONT-ROUSSELOT D. LEGRAND A., PEYNET J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno Analyse & Biologie Spécialisée*, 21, 144-150.

BENOWIT Z. (1988). Pharmacological aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med*, 319, 1318-30.

BERNARD J.P., LOMBARDO D., MAS E. (2006). Physiologie du pancréas exocrine. éd., Elsevier Masson SaS, Paris.

BHAGWWANDIN V.J., HAN L.W., MALLEN S.T., CLAIR J., WOLTERS P.J., CAUGHEY G.H. (2003). Structure and activity of human pancreatin, a novel tryptique serine peptidase expressed primarily by the pancreas. *J Biol Chem*, 278, 336-72.

BHATTARAI., SHAH S.K., LIMBU K. (2014). Conduction of sodium dodecylsulfate in presence and absence of Na₂SO₄ and ZnSO₄ in aqueous media at room temperature. *Scientific World*, 12(12), 41-43.

BIESALSKI H.K., GRIMM P. (2010). Atlas de poche de nutrition. éd., Flammarion, Paris.

BLANC B. (1966). Influence du stockage et des traitements industriels sur la teneur en vitamine du lait de vache. *Le Lait*, INRA Editions, 46(453-454), 141-158.

BROWNLOW S., MORAIS CABRAL J.H., COOPER R., FLOWER D.R., YEWDALL S.J., POLIKARPOV I., NORTH A.C., SAWYER L. (1997). Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.

BOHN SK., WARD N.C., HODGSON J.M and CROFT K.D. (2012). Effects of tea and coffee on cardiovascular disease risk. *Food Funct. PubMed*, 3(6), 575-91.

BONNEFONT-ROUSSELOT D., GARDES-ALBERT M., JORE D., DELATTRE J. (1998). High density lipoproteins and the oxidative theory of atherosclerosis. *JOHN LIBBEY EUROTEXT*, 10(3), 166-74.

BONNEFOY E., LEFEVRE G., GARBARZ E., DEVAUX J.Y., BUGUGNANI M J., MARIE P.Y., INGRAND J., DROUET L., DAUNIZEAU A., RODRIGUEZ-LAFRASSE C. (2002). Les marqueurs cardiaques. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, 27(25), 15-20.

Références bibliographiques

- BONNET J. (2001).** L'Athérosclérose. *Médecine/Sciences*, 17, 559-67.
- BOUDIN B. (2006).** Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires. *MT Cardio*, 2(1), 43-52.
- BOUDIN B., COHEN A. (2009).** Données épidémiologiques des maladies cardiovasculaires et prise en charge des accidents cardiovasculaires. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 409, 27-39.
- BROWNLOW S., MORAIS CABRAL J.H., COOPER R., FLOWER D.R., YEWDALL S.J., POLIKARPOV I., NORTH A.C., SAWYER L. (1997).** Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution-still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.
- BRUNELLE J.L., GREEN R. (2014).** One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). *Methods Enzymol*, 541,151-9.
- BURUIANA L. (1939).** Le taux de l'acide ascorbique dans le lait de quelques mammifères. *Le Lait*, 19(185), 449-454.
- CABELLO C.M., BAIR W.B., BAUSE A.S., WONDRAK G.T. (2009).** Antimeelanoma activity of redox dye DCPIP (2,6-dichlorophenolindophenol) is antagonized by NQO1. *Biomedical Pharmacologie*, 78 (4), 344-354
- CABROL C., VIALLE R., GUERIN-SURVILL H. (2002).** Anatomie du cœur humain. Niveau PCEM2 - EIA cardiologie, Université Pierre et Marie Curie.
- CALVO M.M. (1995).** Heat-Induced Interactions between Serum Albumin, Immunoglobulin, and k-Casein Inhibit the Primary Phase of Renneting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2823-2827.
- CHRAMBACH A., RODBARD D. (1971).** Electrophorèse sur gel de polyacrylamide. *Science*, 172(3982), 440-51.
- CHRYSANT S.G. (2017).** The impact of coffee consumption on blood pressure, cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Expert Rev Cardiovasc Ther*,15(3) ,151-156.
- CHOBERT J.M., DALGALRRONDO M., DUFOUR E., BERTRAND-HARD C., HAERTLE T. (1991).** Influence of pH on the structural changes of β -lactoglobulin studied by tryptic hydrolysis. *Biochemica et Biophysica Acta*, 10, 31-34.
- CORNELIS M.C and EL-SOHEMY A. (2007).** Coffee, caffeine, and coronary heart disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10, 745– 751.
- CORRAO G., RUBBIATI L., BAGNARDI V., ZAMBON A., POIKOLAINEN K. (2000).** Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. *Addiction*, 95, 1505-1523.
- CORREDIG M., DALGLEISH D.G. (1996).** Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29(1), 49-55.

Références bibliographiques

- COURTET L.F. (2010).** Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voie d'amélioration par l'alimentation, thèse de doctorat, École nationale vétérinaire d'Alfort, Alfort.
- COVAS M.I. (2007).** Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, 55, 175–186.
- CZERNICHOW S., THOMASD et BRUCKERT E. (2011).** Acides gras oméga-6 et maladies cardiovasculaires, Recommandations en matière d'apport alimentaire. *Med Sci*, 27(6-7), 614-618.
- D'ALESSANDRO A., DE PERGOLA G. (2015).** Mediterranean Diet and Cardiovascular Disease: A Critical Evaluation of *A Priori* Dietary Indexes. *Nutrients*, 7(9), 7863–7888.
- DANIEL J.R., HOVINGH G. K. (2014).** HDL and cardiovascular disease, *Lipids and cardiovascular disease 2. Lancet*, 384, 618–625.
- DE CATERINA R., ZAMPOLLI A., DEL TURCO S., MADINNA R., and MASSARO M. (2006).** Nutritional mechanisms that influence cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 421S-426S.
- DEHMOLAEI A., VAD M. (2014).** Comparative study of adsorption isotherms of vitamin C on multi wall and single wall carbon nanotube. *Orient J Chem*, 30(1), 233-236.
- DE LORGERIL M., SALEN P. (2015).** Régime méditerranéen et maladies cardiovasculaires. *Springer Link*, 13(2), 91–95.
- DE SOUZA R.J., MENTE A., MAROLEANU A., COZMA A.I., HA V., KISHIBE T., ULERKY E., BUDYŁOWSKI P., SCHUNEMANN H., BEYENE J., S ANAND S.S. (2015).** Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*, 351, 3978.
- DI CASTELNUOVO A., ROTONDO S., IACOVIELLO L., DONATI M.B., DE GAETANO G. (2002).** Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*, 105, 2836-2844.
- DOOST S.N., GHISTA D., SU B., ZHONG L., MORSI Y.S. (2016).** Heart blood flow simulation. *BioMedical Engineering*, 15(1), 101.
- DROUIN P., BLICKLE J.F., CHARBONNEL B., ESCHWEGE E., GUILLAUSSEAU P.J., PLOUIN P.F., DANINOS J.M. (1993).** Diagnostic et classification du diabète sucré les nouveaux critiques. *Diabetes & Metabolism*, 25, 72-83.
- DUNBAR B. S, (1987).** Two Dimensional Electrophoresis and Immunological Techniques. New York.

Références bibliographiques

DUPIN H., CUP J.L., MALEWIAK M.I., LEYNOUD-ROUAUD C., BERTHIER A.M. (1992). Alimentation et nutrition humaines, éd., ESF, Paris.

DURIEZ P. (2000). Aspects physiopathologiques du lien entre antioxydants et athérosclérose. *Le Courrier de l'Arcol et de la SFA*, 2(4), 160-165.

DURUPHTY A. (2005). Oxydation de l'acide ascorbique, Chimie 1reS. Hachette Education.

EILAT-ADAR S., SINAI T., YOSOFY C. and HENKIN Y. (2013). Nutritional Recommendations for Cardiovascular Disease Prevention. *Nutrients*, 5(9), 3646-83.

ENGSTROM K. (2015). Coffee Consumption and Cardiovascular Disease Risk: What Should We Tell Our Patients?. *Einstein J. Biol*, 30,34-36.

ESTRUCH R., ROS E., SALAS-SALVADO J., COVAS M.I., CORELLA D., AROS F., GOMEZ-GRACIA E., RUIZ-GUTIERREZ V., FIOL M., LAPERTA J., LAMUELA-RAVENTOS R.M., SERRA-MAJEM L., PINTO X., BASORA J., MUNEZ M.A., SORLI J.V., MARTINEZ J.A., and MARTINEZ-GONZALIZ M.A. (2013). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *The new england journal of medicine*, 368(14), 1279-90.

FAO. 1995. Le lait et produits laitiers dans la nutrition humaine. Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture. Rome, Italie.

FAVIER A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques*, 270, 108-115.

FOSSATI P. (2001a). Facteurs nutritionnels et diététique des dyslipoprotéinémies de l'athérombose. *Revue d'ARCOL : comité français de coordination des recherches sur l'athérosclérose et le cholestérol*.

FOSSATI P. (2001b). Les huiles de poissons : actualité scientifique et médical. *OCL*, 1(2), 178-179.

FUSTER J.J., OUCHI N., GOKCE N WALSH K. (2016). Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 11(8), 1786-1807.

GARCIA-FERNANDEZ E., RICO-CABANAS L., ROSGAARD N., ETRUCH R., BACH-FAIG A. (2014). Mediterranean Diet and Cardiometabolic Syndrome: A Review. *Nutrients*, 6(9), 3474–3500.

Références bibliographiques

GAUTIER T., MASSON D., LAGROST L. (2011). Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 3(4), 267-272.

HAVEL J.R. (1984). The formation of LDL : mechanisms and regulation. *Journal of Lipid Research*, 25, 1570-1576.

GHOORAH K., CAMPBELL P., KENT A., MAZNYCZKA A. and KUNADIAN V. (2016). Obesity and cardiovascular outcomes: a review. *European Heart Journal: Acute Cardiovascular Care*, 5(1), 77-85.

GEBAUER S.K., DESTAILLATS F., DIONISI F, KRAUSS R.M., BAER D.J. (2015). Vaccenic acid and trans fatty acid isomers from partially hydrogenated oil both adversely affect LDL cholesterol: a double-blind, randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(6), 1339-46.

GHEDIRA K. (2008). L'olivier. *Phytothérapie*, 6(2), 83–89.

GRIMSGAARD S., BONAA K., JACOBSEN B., BJERVE K. (1999). Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. *American Heart Association*, 34, 478-483.

GODET-THOBIE H., VERNAY M., NOUKPOAPE A., SALANAVE B., MALON A., CASTETBON K., PERETTI C. (2008). Niveau tensionnel moyen et prévalence de l'hypertension artérielle chez les adultes de 18 à 74 ans. *B.E.H Thématique*, (49-50), 478-482.

GROLEAU P.E. (2003). Étude des interactions peptide-peptide dans un mélange de peptides issu d'un hydrolysat trypsique de β -lactoglobuline et de leur influence sur le fractionnement par nanofiltration. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Québec, Canada.

GUASCH-FERRE M., B HU F.B., MARTINEZ-GONZALEZ M.A., FITO M., BULLO M., ESTRUCH R, RROS E., CORALLA D., RECONDO J., GOMEZ-GRACIA E., FIOL M., LAPETRA J., SERRA-MAJEM L., MUNEZ M.A., PINTO X., LAMUELA-RAVENTOS R.M., BASORA J., BUIL-COSIALES P., SORLI J.V., RUIZ-GUTIERREZ V., MARTINEZ J.A and SALAS-SALVADO J. (2014). Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*, 12,78.

GUILLOU H., PELISSIER J.P., GRAPPIN R. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Le Lait*, 66(2), 143-175.

GUSAKOV A.V., KONDRATYEV E.G. and SINITSYN A.P. (2011). Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 04.

GUPTA A.K., SAVOPOULOS C.G., AHUJA J., HATZITOLIOS A.I. (2011). Role of phytosterols in lipid-lowering: current perspectives. *Q J Med*, 104(4), 301-8.

Références bibliographiques

HANSSON G.K., ROBERTON A.K., SODERBERG-NAUCLER C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1, 297-329.

HELKIN A., STEIN J.J., LIN S., SIDDIQUI S., MAIER K.G., GAHTAN V. (2016). Dyslipidemia part 1-review of lipid metabolism and vascular cell physiology. *Vascular and Endovascular Surgery*, 50(2), 107-118.

HENSSEN G.K., ANNA-KARIN L.R., SAUDERBERG-NAUCLER C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. *Annual Review of Pathology*, 1, 297-329.

HERCBERG S., PREZIOSI P., BRIACON S., GALAN P., TRIOL I., MALVY D., ROUSSEL., FAVIER A. (1998). 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. *Supplementation en vitamines et minéraux antioxydants. Control Clin Trials*, 19(4), 336-51.

HOLUB B.J. (2002). 4. Omega-3 fatty acids in cardiovascular care. *Clinical nutrition. CMAJ*, 166, 608–15.

HOLTZMAN S.G, MINEMAN K.P, (1991). Role of adenosine receptors in caffeine tolerance, *J Pharmacol Exp Ther*, 256(1) : 62-8.

HONG P., KOZA S., BOUVIER E.S.P. (2012). Chromatographie d'exclusion de taille pour l'analyse des protéines biothérapeutique et leurs agrégats. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 35(20), 2923-2950.

HUFFPOST Algérie. (2014). 25 000 Algériens meurent chaque année des maladies cardiovasculaires.

HU F.B., MANSON J.E., WILLETT W.C. (2013). Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 20(1), 5–19.

JOHNKE M., PETERSEN T.E. (2012). The alpha-lactalbumin/oleic acid complex and its cytotoxic activity. Department of Molecular Biology and Genetics, University, Aarhus. Denmark.

JOUAN P. (2002). Lactoprotéines et lactopeptides: propriétés biologiques. éd., Quae, INRA, Paris.

KAWAI Y., NISHIKAWA T., SHIBA T., SAITO S., MUROTA K., SHIBATA N., KOBAYASHI M., KNAYAMA M., UCHIDA K., TERAOKA J. (2008). Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J Biol Chem*, 283, 9424-34.

KIM S.H., DESPRES J.P., KOH K.K. (2016). Obesity and cardiovascular disease: friend or foe?. *European Heart Journal*, 37(48), 3560-3568.

Références bibliographiques

KIRITSAKIS P. and SHAHIDI F. (2017). Olives and Olive Oil as Functional Foods: Bioactivity. Chemistry and Processing, 1^{ère} Ed., Oxford, UK.

KLATSKY A.L. (2009). Alcohol and cardiovascular diseases. Expert Rev Cardiovasc Ther, 7(5), 499-506.

KNEKT P., RITZ G., PERIERA M.A., O'REILLY E.J., AUGUSTSSON K., FRAZER G.E., GOLDBOURT U., SPIEGELMAN D., STEVENS J., WILLETT W.C., RIMM W.C., ASCHERIO A. (2004). Antioxydant vitamins and coronary heart disease risk : a pooled analysis of 9 cohorts. Am J Clin Nutr, 80, 1508-20.

KORNEICH., DE NUTTE N.C. (2005). The impact of regular physical activity on physical and mental health : how motivate the patient. Rev Med Brux, 26, 89-96.

KOROSHI A. (2007). Microalbuminuria, is it so important?. Department of Nephrology, 11(3): 105–107.

KRAUSS R.M., SIRI P.W. (2004). Metabolic abnormalities: triglyceride and low-density lipoprotein. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 33, 405-415.

LAMRI F., SAOUI B. (2005). Les lipides alimentaires, incidence dans l'apparition de l'athérosclérose et dans sa prévention. Mémoire de fin d'étude, Université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, Algérie.

LECERF J.M. (2006). Les phytostérols et les phytostanols : quelle place pour la prévention cardiovasculaire ?. Cah. Nutr. Diét, 41(5), 199-305.

LECERF J.M. (2009). Fatty acids and cardiovascular disease. Nutrition Review, 67(5), 273-83.

LÉGER C.L., RAZANAMAHEFA L. (2005). Risques et bénéfices pour la santé des acides gras trans apportés par les aliments, Recommandations. AFSSA, 12(1), 61-67.

LEMARCHAL P. (1992). Dossier scientifique de l'INF. Les lipides. 67-71.

LEVINE A.R., HAGEGE A.A., JUDGE D.P., PADALA M., DAL-BIANCO J.P., AIKAWA E., BEAUDOIN J., BISCHOFF J., BOUATIA-NAJI N., BRUNEVAL P., BUTCHER J.T., CARPENTIER A., CHAPUT M., CHESTER A.H., CLUSEL C. (2015). Mitral valve disease-morphology and mechanisms. Nature Reviews Cardiology, 12, 689–710.

LING H., JONES P.G.H. (1995). Dietary phytosterols: A review of metabolism, benefits and side effects. Science Directe, 57(3), 195-206.

LIYANAGE T., NINOMIYA T., WANG A., NEAL B., JUN M., WONG M.G., JARDINE M., HILLIS G.S. and PERKOVIC V. (2016). Effects of the Mediterranean Diet on Cardiovascular Outcomes-A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One, 11(8), 0159252.

Références bibliographiques

- LOUKAS M., YOUSSEF P., GIELECKI J., WALOCHA J., NATSIS K., SHANE TUBBS1 R. (2016).** History of Cardiac Anatomy : A Comprehensive Review from the Egyptians to Today. *Clinical Anatomy*, 29, 270–284.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951).** Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biochemistry*, 193, 265-275.
- LUO P., YU X., WANG W., FAN S., LI X., WANG J. (2015).** Crystal structure of a phosphorylation-coupled vitamin C transporter. *Nat Struct Mol Biol*, 22(3), 238-41.
- LUSIS AJ. (2000).** Atherosclerosis. *International Weekly Journal of Science*, 407(6801), 233-41.
- MAC KEARNEY P., WHELTON M., REYNOLDS K., MUNTNER P., WHELTON P., JIANG H. (2005).** Global burden of hypertension : analysis of worldwide data. *The Lancet*, 365, 217-223.
- MADOUNI A. (1999).** Rôle des antioxydants et la lutte contre les radicaux libre dans la pathologie cardiovasculaire, diplôme d'enseignement supérieur(D.E.S), université mouloud Mammeri, Algérie.
- MAHDI ALI K., WONNERTH A., HUBER K. and WOJTA J. (2012).** Cardiovascular disease risk reduction by raising HDL cholesterol – current therapies and future opportunities. *British Journal of Pharmacology*, 167(6), 1177-1194.
- MAHI F. (2013).** Epidémiologie des facteurs de risque de l'infarctus du myocarde à Tlemcen. Université Abou Bekr Belkai, diplôme de Master, Tlemcen, Algérie.
- MANDVIWALA T., KHALID U. and DESWAL A. (2016).** Obesity and Cardiovascular Disease: a Risk Factor or a Risk Marker?. *Curr Atheroscler Rep*, 18(5), 21.
- MARCHAND V. (2010).** Les gras trans : Ce que les médecins devraient savoir ; *Paediatr Child Health*. Jul-Aug, 15(6), 376–378.
- MARQUAND A. (2009).** Cœur et diabète. *La Lettre du Cardiologue Risque Cardiovasculaire* n° 423, Congrès Réunion, Paris.
- MARTIN A. (2001).** Apport nutritionnelle conseillés pour la population française. 3^{ème} éd., Lavoisier, Tec et Doc, France.
- MC-CULLOUGH M.L., PETERSON J.J., PATEL R., JACQUES P.F., SHAH A.R. and DWYER J.T. (2011).** Flavonoïde intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults *Am J Clin Nutr*, 95(2), 454-464.
- MESNIER N. (2011).** Biomécanique de la croissance de la plaque d'athérosclérose : contribution à l'étude des contraintes résiduelles. Thèse de doctorat, Université Grenoble Alpes, France.
- MILLER G.L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.

Références bibliographiques

MINK P.J., SCARFFORD C.G., BARRAJ L.M., HARNACK L., HONG C-P., NETTLETON J.A. and JACOBS D.R. (2007). Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: a prospective study in postmenopausal women. *American Society for Clinical Nutrition*, 85(3), 895-909.

MORELLI M., CARTA A.R., KACHRO A., SCHARZSCILD, (2010). Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Prog Brain Res*, 183, 183-208.

MOSER U, BENDICH A, (1990). Vitamin C. In: *Handbook of Vitamins*. éd., Machlin LJ, Marcel Dekker, New York.

MOULIN P. (2001). Les Hyperlipoprotéinémies. *Revue de pharmacologie*, 60, 50-53.

MOZAFFARIAN D., KATAN M.B., ASCHERIO A., STAMPFER M.J. and Walter C. WILLET W.C. (2006). Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 354,1601-1613.

NIJVELDT R., NOOD E.V., VAN HOORN D.E., BOELEN P.G., NORREN K.V. and VAN LEEUWEN P.A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition*, 74, 418–25.

NILSSON J., BJÖRKBACKA H., FREDRIKSON G.N. (2012). Apolipoprotein B100 autoimmunity and atherosclerosis-disease mechanisms and therapeutic potential. *Curr Opin Lipidol*, 23, 422-428.

NINFA A.J., BALLOU P.D, (1998). *Fundamental approaches to biochemistry and biotechnology*. Bethesda, Md : Fitzgerald Science Press,.

O'DONNELL J.C., ELOSUA R. (2008). Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study, 61, 299-310.

OMS. (2015). Maladies cardiovasculaires. Aide mémoire.

ORNSTEIN L. (1964). Disc electrophoresis.1. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci*, 121, 321-349.

OUHAIBI H. (2008). Recherche de facteurs de prédisposition génétiques du myocarde (IDM) dans la population oranaise et étude d'association du polymorphisme affectant le gène NO-synthase endothéliale (NOIII) avec l'IDM et les valeurs des pressions artérielles. Université d'ORAN ES SENIA, Oran, Algérie.

OUSMANE C., DADAH S.M.L., FATOUMA B., EI HADJI M., DIOP M.S., NGOR SIDE D., DIEYNABA S.A., MOJII B.A., KAMADOR T., NDIYAE M., AMADOU D.G., MOUHAMADOU MANSOUR N. (2016). Le profil lipidique et glucidiques des accidents cardiovasculaires cérébraux ischémique à Dakar. *Pan Afr Med J*, 27, 25- 29.

Références bibliographiques

- PAGE. C.T. (1997).** Pratique de diététiques courante. 5^{ème} éd., Masson, Paris.
- PAQUOT N., SCHEEN A.J. (2003).** Prévention cardio-vasculaire chez le patient diabétique de type 2. Rev Med Liege, 58(5), 271-274.
- PEREZ-MARTIN A., DAUZAT M., POLYTECH I.S. (2013).** Physiologie Cardio-Vasculaire. Polytech Montpellier, Montpellier.
- PIOT C., AVIGNON A. (2004).** CRP et risque cardiovasculaire. Correspondances en Risque CardioVasculaire, 2(3), 126-128.
- POIRIER P. (2008).** Adiposité et maladie cardiovasculaire : utilisons-nous la bonne définition pour caractériser l'obésité?. Médecine/Science, 24(12), 1096–1098.
- POITRINEAU O. (2012).** Principales cardiopathies. éd., Diapason 36, MSA 36-Salle du CA.
- POUGHEON S .et GOURSAUD J., (2001).** Le lait, caractéristiques physico- chimiques. Lait, nutrition et santé. éd. Tec et Doc, Paris.
- QIN B.Y., BEWLEY M.C., CRAMER L.K., BAKER H.M., BAKER E.N., JAMESON G.B. (1998).** Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. Biochemistry, 37(40), 14014-14023.
- RADER J.D., HOVINGH G.K. (2014).** HDL and cardiovascular disease. The Lancet, 384(9943), 618-25.
- RITCHIE C. (2012).** Purification de Protéine par chromatographie sur colonne. Mater Méthods, 2, 134.
- ROBERT H., ANDERSON A. NIGEL A.B. (1996).** The Anatomy of the Heart Revisited. The Anatomic Record, 246, 1-7.
- ROUFIK S. (2005).** Étude des interactions β -Lactoglobuline bovine peptides bioactifs et digestibilité in vitro des complexes. Université Laval.
- RUSSO G.L. (2009).** Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. Biochemical Pharmacology, 77, 937-946.
- SABAH L. (2015).** Cardiologie, 3^{ème} éd., Elsevier Masson SAS, Paris.
- SAILE R., TAKI H. (2007).** Cholestérol, lipoprotéines et athérosclérose : de la biochimie à la physiopathologie. Laboratoire de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose, 11(2).
- SCHAGGER H, (2006).** Tricine–SDS–PAGE". Nature Protocols. 1 (1), 16–22.
- SCHEEN A.J., VAN-GAAL L.F. (2005).** Le diabète de type 2 au cœur du syndrome métabolique: Plaidoyer pour une prise en charge globale. Rev Med Liege, 60(5-6), 566-571.

Références bibliographiques

SCHEEN A.J., VAN-GAAL L.F. (2005). Le diabète de type 2 au cœur du syndrome métabolique: Plaidoyer pour une prise en charge globale. *Rev Med Liege*, 60(5-6), 566-571.

SCHWINGSHACKL L. and HOFFMAN G. (2012). Monounsaturated Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease: Synopsis of the Evidence Available from Systematic Reviews and Meta-Analyses. *Nutrients*, 4(12), 1989–2007

SHAH P. K. (2011). Targeting endogenous apoA-I-a new approach for raising HDL. *Nat Rev Cardiol*, 8,187–188.

SHATERI Z and DJAFARIAN K. (2016). Coffee Consumption and Coronary Heart Diseases: A Mini-Review. *Journal Clinical Nutrition and Dietetics*, 2(3).

SHOKEEN D., AERI B.T. (2015). Risk Factors Associated with the Increasing Cardiovascular Diseases Prevalence in India: A Review. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 5, 331.

SPENCER D., BRIDGEMEN J.M., BROWN N.A., MOHUN T.J., ANDERSON R.H. (2014). L'anatomie et le développement des valves cardiaques. *Cardiol Young*, 24(6), 1008-22.

STARY H.C., CHANDLER A.B., DINSMORE R.E., FUSTER V., GLAGOV S., INSULL W. J., ROSENFELD M.E., SCHWARTZ C.J., WAGNER W.D., WISSLER R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *American Heart Association*, 92,1355-1374.

SZMOLA R., KUKOR Z., SAHIN-TOTH M. (2003). Human mysotrypsin is a unique digestive protease specialised of the degradation of trypsin inhibitors. *J Biol Chem*, 278, 48580-9.

TACON A.G. (1987). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Food and agriculture organisation of the united nations, Brasilia, Brazil.

TAEYE B., SMITH L.H., VAUGHAN D.E. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1: a common denominator in obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 5, 149-154.

TANFORD C., BUNVILLE L.G., NOZAKI Y. (1959). The reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemical Society*, 81, 4032-4036.

TATIANA Y., WARREN., VAUGHN B., HOOKER S.P., SUI X., CHURCH T.S. and BLAIR S.N. (2010). Sedentary Behaviors Increase Risk of Cardiovascular Disease Mortality in Men. *Med Sci Sports Exerc*, 42(5), 879–885.

TILSON H. (1981). The neurotoxicity of Acrylamide: An overview neuro. *Behav Toxicol and Terat*, 3, 455-461.

Références bibliographiques

TOUSSAINT J.F., JACOB M.P., LAGROST L., CHAPMAN J. (2003). L'athérosclérose : physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques. éd., Masson, Paris.

VAN BOEKEL M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry*, 62(4), 403-414.

WANG S., WU D., MATTHAN N.R., LAMON-FAVA S., LECKER J.L., LICHTENSTEIN A.H. (2009). Reduction in dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid plus docosahexaenoic acid ratio minimizes atherosclerotic lesion formation and inflammatory response in the LDL receptor null mouse. *Atherosclerosis*, 204, 147-155.

WAUNGANA A., SINGH H., BENNETT R.J.(1996). Influence of denaturation and aggregation of β -lactoglobulin on rennet coagulation properties of skim milk and ultrafiltered milk. *Food Research International*, 29(8), 715-721.

WELLY F.K. (2013). How Do Elevated Triglycerides and Low HDL-Cholesterol Affect Inflammation and Atherothrombosis?. *Curr Cardiol Rep*, 15, 400.

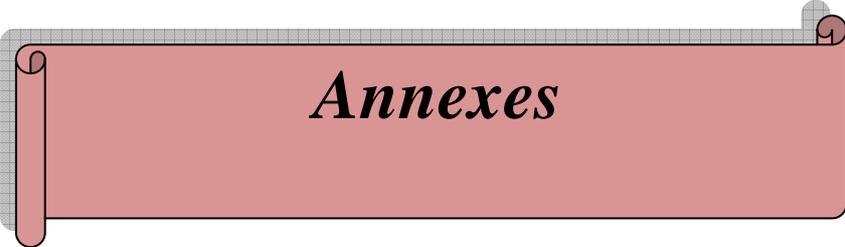
WILLCOX B.J., WILLCOX D.C., TODORIKI H., SUZUKI M. (2009). The Okinawan diet: health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *J Am Coll Nutr*, 28, 500-516.

YAHIA-BERROUIGUET A., BENYOUSSEF M., MEGUENNI K., BROURI M. (2009). Enquête sur la prévalence des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires à Tlemcen (Algérie). *Médecine des maladies Métaboliques*, 3(3), 313-319.

YE Z. and SANG H. (2008). Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease meta analysis of cohort studies. *EUR J Cardiovas Prev Rehabil*. 15(1), 26-34.

YOSHIDA H., KISUGI R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411, 1875-1882.

YOUNIS N., CHARTON-MENYS V., SHARMA R., SORAN H., DURRINGTON P.N. (2009). Glycation of LDL in non-diabetic people : small dense LDL is preferentially glycated both in vivo and in vitro. *Atherosclerosis*, 202, 162-168.



Annexes

Annexes

Annexe 01 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de LOWRY et al (1951)

1. Solutions :

- **Solution A** : Na₂CO₃ anhydre 2% dans NaOH, 0,1M ;
- **Solution B** : 2 ml de CuSO₄·5H₂O, 0,5% + 2 ml de tartrate de Na et K, 1%
- **Solution C** : 50 ml A + 1ml B.

Gamme étalon

A partir de la solution mère de BSA, des dilutions sont préparées suivant le tableau ci-dessous :

N° de tube	01	02	03	04	05
Concentration (µg/ml)	0	30	50	80	100
Solution mère d'albumine sérique bovine (BSA) (µl)	0	150	250	400	500
Eau distillée (µl)	500	350	250	100	0

2. Méthode :

- Réaction et mesure de l'absorption

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

- Ajouter 2,5 ml de la solution C et mélanger ;
- Laisser 5 à 10 min à température ambiante ;
- Ajouter 250 µl 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 750nm contre le blanc

- Détermination des teneurs protéiques

- Tracer la courbe étalon : DO = f (concentration de protéine standard : BSA)
 - Déterminer à partir de cette courbe les teneurs en protéines des échantillons inconnus
- NB : il faut préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons inconnus (10⁻¹ , 10⁻² ...) dans la cas où ils sont concentrés (leurs DO à 750nm après la réaction doit être incluse dans la gamme étalon).

Annexe 02 : Dosage des sucres réducteurs par la méthode utilisant l'acide 3,5 dinitrosalicylique (DNS)

2. Méthode :

- 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 ;

Annexes

- 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.

NB : afin de déterminer la quantité de sucres réducteurs présente dans les échantillons inconnus :

- ✓ réaliser une courbe d'étalonnage avec une solution de lactose à 1g/l.
- ✓ préparer les dilutions nécessaires pour les échantillons ($10^{-1}, 10^{-2}, \dots$) dans le cas où ils sont concentrés (leurs DO à 530 nm après la réaction doit être incluses dans la gamme étalon).

Gamme étalon

N° de tube	01	02	03	04	05	06
Solution de glucose (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

Annexe 03: Détermination de la teneur en vitamine C par la méthode de de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP)

1. Solutions

- **Solution de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) à 0,5 g/l** : Dissoudre 0,5 g du 2,6 dichlorophénol indophénol et 0,2 g de bicarbonate de sodium dans 300 ml d'eau distillée chaude. Refroidir et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

- **Préparation d'une solution titrée d'acide ascorbique à 0,5 g/l** : Dissoudre 0,5 g d'acide ascorbique pur dans 200 ml d'eau distillée. Ajuster le volume à un litre.

2. Protocole

- **Préparation du blanc (témoin)** : Prendre 5 ml de la solution de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) à 0,5 g/l dans un bêcher, et titrer par l'acide ascorbique (pour 20 ml d'acide ascorbique + Ajouter 5 ml d'acide acétique glacial). Prendre le volume d'acide ascorbique nécessaire ayant réagi avec la solution du DCPIP (décoloration total du DCPIP).

- **Dosage de la vitamine C contenue dans des échantillons variés de lait de vache** : Prendre 5 ml de la solution de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) à 0,5 g/l dans un bêcher, et titrer par le lait. Prendre le volume de lait nécessaire ayant réagi avec la solution du DCPIP.

- **Evolution de la teneur en Vit C dans différentes conditions de traitement** :

Préparer une série de 4 tubes A, B, C, et D. Mettre 20 ml de la solution d'acide ascorbique à 0,5 g/l dans chacun de ces tubes. Traiter ces tubes comme indiqué ci- dessous :

Annexes

A : laisser 15 min à température ambiante et exposer à la lumière ;

B : laisser 15 min à température ambiante et mettre à l'abri de la lumière ;

C : porter 15 min au bain marie à 40 C° ;

D : porter 15 min au bain marie à 80 C°.

NB : (Pour 20 ml d'acide ascorbique + Ajouter 5 ml d'acide acétique glacial). Prendre le volume d'acide ascorbique nécessaire ayant réagi avec la solution du DCPIP (décoloration total du DCPIP). Noter les volumes correspondants.

- Etalonnage de la solution d'acide ascorbique :

L'étalonnage de la solution d'acide ascorbique est fait à l'aide d'une solution étalon de concentration $C_1=0,04$ g/l. elle correspond à une chute de burette V_1 (ml).

3. Expression des résultats :

- La teneur en vitamine C exprimé en mg/l est donnée par la relation suivante :

$$C_2 = (C_1 \times V_2 / V_1) \times 1000$$

Où :

C_1 est la concentration en acide ascorbique de la solution étalon ($C_1=0,04$ g/l) ;

C_2 est la concentration en vitamine C dans le lait inconnu ;

V_1 est la chute de burette mesurée dans le cas de la solution étalon ;

V_2 est la chute de burette mesurée dans le cas du lait.

Annexe 04 : Chromatographie de permeation sur gel de sephacryl S100

1. solutions

- Gel de sephacryl S100 (environ 5 g) prêt à l'emploi
- Tampon Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4
- Echantillons : protéines sériques lyophilisées (100 mg)

2. Méthodes

Le gel de sephacry S100, est mis en contact du tampon de départ (Tris-HCl 0.02 M, pH 8.4) pendant 30 mn. Il est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne (20 x 1cm) en une seule fois. Après stabilisation par l'éluant, à un débit de 1ml/min, le volume mort de la colonne (V_0) est déterminé par injection de bleu dextrane à la concentration de 1 mg/ ml.

Les protéines sériques lyophilisées (100 mg) sont solubilisées dans 5 ml de tampon Tris-HCl (0,02 M ; pH 8.4), déposées en haut de la colonne et éluées dans ces conditions à débit constant. Des fractions de 5 ml sont recueillies pour les besoins de leur identification.

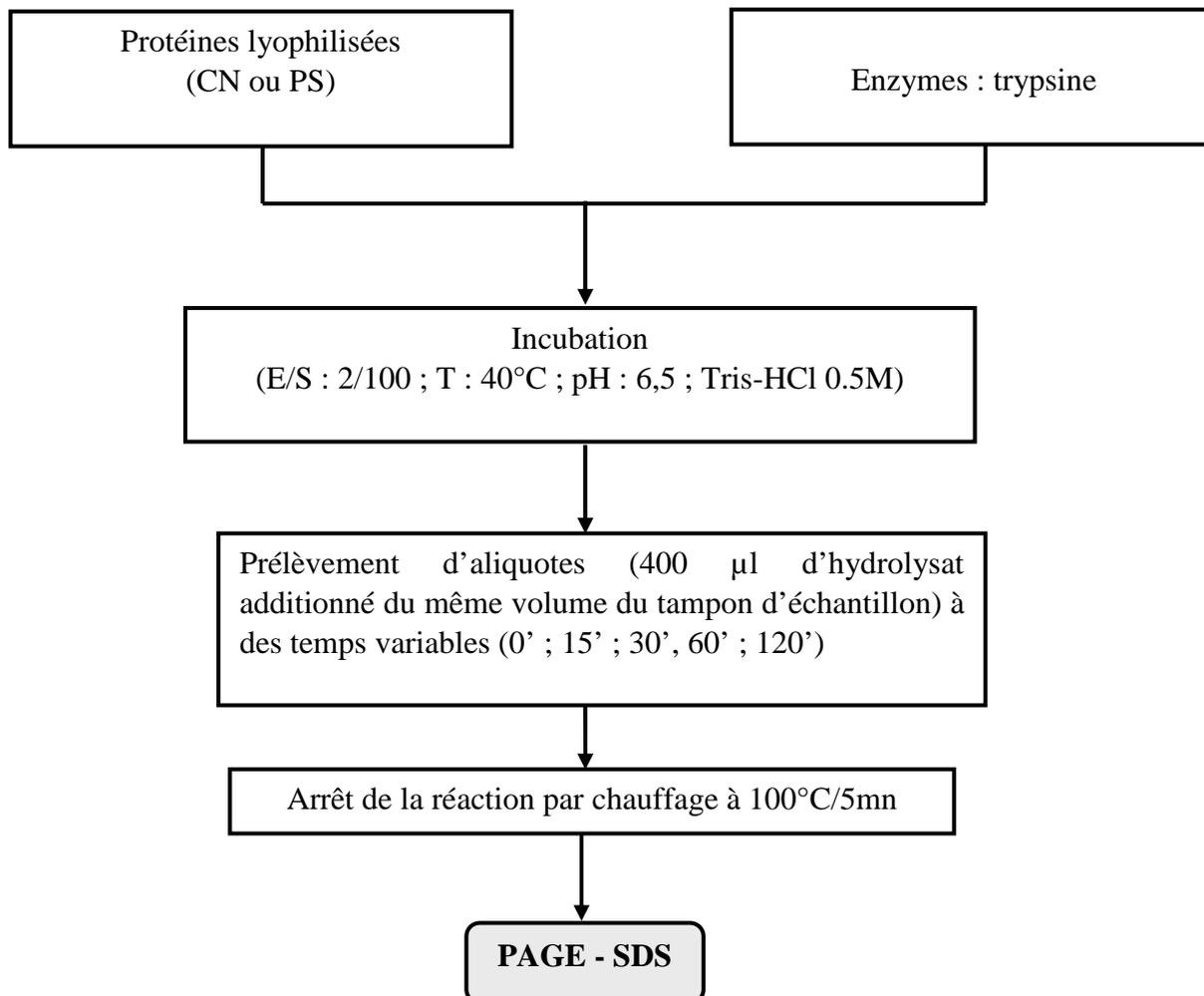
Annexes

Annexe 05 : Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine

1. Solutions à préparer

- Tampon Tris-HCl 0.5M ; pH 6,4
- Tampon d'échantillon (Voir page 16)

2. Méthode



Etapes 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. Solutions :

- Solution d'acrylamide (prête à l'emploi)

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

- Tampon de gel (B)

Annexes

Tris.....9.14 g
Eau distillé.....100 ml

Ajuster à pH 8.9 avec de HCl 4N

- Tampon d'électrode

Tris.....1.2g
Glycine.....5.76g
SDS.....0.2 g
Eau distillée.....200 ml

- Tampon d'échantillon

Tampon du gel (B).....100 µl
Eau distillée700 µl
Glycérol 50%.....200 µl
Bleu de Bromophénol.....une tête d'aiguille

Dissoudre 1 mg de protéines lyophilisées dans 1 ml de ce tampon

2. Electrophorèse

- Préparation du gel : T = 12% et C = 2.7% (pour une plaque)

Solution (A)3.25 ml
Solution (B)5 ml
Eau distillée 1.68 ml
Dégazer le mélange (maximum 2 mn)
TEMED.....10 µl
Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75 µl

Couler et mettre le peigne immédiatement

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl

Mise sous tension : 20 mA, 250 V

Fixation : 45mn dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 07 : Electrophorèse en présence de SDS et de 2-mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

1. Solutions

- Solution d'acrylamide (prête à l'emploi)

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

- Tampon de gel de séparation

Tris.....9.25 g

Annexes

Eau distillé..... 50 ml

Ajuster à pH 8.8 avec de HCl 4N

- Tampon de gel de concentration (Solutions C)

Tris.....3 g

Eau distillé.....50 ml

Ajuster à pH 6.8 avec de HCl 4N

- Tampon d'électrode

Tris.....1.2g

Glycine.....5.76g

SDS.....0.2 g

Eau distillée.....200 ml

- Tampon d'échantillon

Solution (C).....500 µl

Eau distillé.....250 µl

SDS (10%).....250 µl

2-mercaptoéthanol.....50 µl

Dissoudre 1 à 2 mg de protéines lyophilisées dans 800 µl de ce tampon

Chauffage à 100°C pendant 4 à 5 mn puis refroidir dans un bain d'eau froide

Ajouter 200 µl d'une solution de glycérol 50% (v/v) et quelques graines de bleu de bromophénol

- Solution de fixation :

TCA.....12 g

Eau distillée.....100ml

- Solution de coloration

Bleu de Coomassie R250.....0.5 g

TCA.....4 g

Méthanol.....100 ml

Eau distillé.....100 ml

- Solution de décoloration

Acide acétique.....37.5 ml

Eau distillée.....312.5 ml

Méthanol.....150 ml

- Solution de persulfate d'ammonium

Persulfate d'ammonium.....0.1 g

Eau distillée (qsp).....1 ml

- Conduite de l'électrophorèse

Préparation du gel de séparation : T = 17 % et C = 207 % (pour une plaque)

Annexes

Solution (A).....	4.60 ml
Solution (S).....	2.51 ml
Eau distillée.....	2.73 ml
Dégazer pendant 2 mn maximum	
SDS 10%.....	100 µl
TEMED.....	13 µl
Persulfate d'ammonium 10%.....	75 µl

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).....	1.3 ml
Solution (C).....	2.5 ml
Eau distillées.....	5.8 ml
Dégazer quelques secondes	
Solution de SDS à 10%.....	100 µl
TEMED.....	20 µl
Persulfate d'ammonium à 10%.....	10 µl

Couler immédiatement sur le gel de séparation polymérisé et mettre le peigne

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 µl
Mise sous tension : 20 mA, 250 V
Fixation : 45 minutes dans la solution de fixation
Coloration : 1 heure dans la solution de coloration
Décoloration : dans la solution de décoloration.