

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
Spécialité : Biochimie Appliquée

THEME :

-Synthèse des données bibliographiques se rapportant au sujet suivant : Effets des polyphénols sur l'obésité.

-Compte rendu de stage pratique réalisé au niveau du Laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou

Travail réalisé par :

-LATTAB Mehdiya.
-GUIROUS Fatima.
-HADJERAS Dalila.

Présenté le 16/10/2016 devant le jury :

Présidente : M^{me} SENOUSSE-GHEZALI C
Promotrice : M^{me} MESSAOUDI- MOHAMDI D.
Examinatrices : M^{me} OULARBI- SENANI N.
M^{me} SEBBANE-ALMI D.

Maitre assistante classe A.
Maitre assistante classe A.
Maitre assistante classe A.
Maitre assistante classe A.

Année universitaire
2015-2016

Avant propos

Le mémoire de fin d'études présenté ci-après aux fins de l'obtention du diplôme de master comporte deux parties :

- Une synthèse des données bibliographiques se rapportant au thème suivant «Effets des polyphénols sur l'obésité ».
- Un compte rendu du stage pratique réalisé au niveau du Laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'université de Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

Remerciements

*Notre profonde gratitude va tout d'abords à **Mme MESSAOUDI-MOHAMDI D.**, maitre assistante classe A, pour sa précieuse orientation.*

Nous adressons nos sincères remerciements pour :

- ***M^{me} SENOUSSE-GHEZALI C.**, maitre assistante classe A, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*
- ***M^{me} OULARBI- SENANI N** et **M^{me} SEBBANE-ALMI D.**, d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

Nous remercions tous nos enseignants du département de Biochimie-Microbiologie.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À ma mère ;

À mon père ;

À mes frères et ma sœur ;

À toute ma famille proche ou éloignée.

Fatima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À ma chère maman;

À mon cher papa ;

À ma sœur Aldjia ;

À ma sœur Bahia, son mari Amar et leur beau gosse

Rayane ;

À mon frère Mustapha ;

À mon frère Rezki et sa femme Kouka ;

À mes amies Pélia ; Samira ; Katia ; Saida.

Dalila

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À ma très chère maman ;

À mon père ;

À mes deux sœurs Fatima et Lila ;

À mes nièces Linda, Amel et Dana.

Mehdiya

Sommaire

Liste des abréviations

Index des tableaux et des figures

Listes des annexes

Glossaire

Pages

PARTIE 01 : Synthèse bibliographique

Introduction 01

Chapitre 1 : Les polyphénols

I. Les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants

1.1. Introduction 02

1.2. L'oxydation 02

1.3. Les radicaux libres 02

1.4. Le stress oxydatif 04

1.5. Les antioxydants 04

II. Les polyphénols

2.1. Définition 05

2.2. Biosynthèse des polyphénols 05

2.3. Classifications des composés phénoliques 07

2.3.1. Les flavonoïdes 08

2.3.2. Les non flavonoïdes 09

2.3.3. Les tanins 12

2.4. Les polyphénols au centre de notre alimentation 12

2.5. Les propriétés chimiques des polyphénols 13

2.6. Intérêts thérapeutiques des polyphénols 14

2.7. Biodisponibilité des polyphénols 16

Chapitre 2 : Obésité

2.1. Introduction 18

2.2. Définition 18

2.3. Facteurs responsables de l'obésité 19

2.4. Épidémiologie 20

2.5. Maladies associées à l'obésité 20

2.6. Physiopathologie de l'obésité 21

2.7. Traitements 23

Chapitre 3 : Effets des polyphénols sur l'obésité

3.1. Effets des polyphénols sur la lipase pancréatique 25

3.2. Effets des polyphénols sur l'adipogenèse 27

3.3. Effets des polyphénols sur l'angiogenèse 30

3.4. Effets des polyphénols sur l'apoptose 30

3.5. Effets des polyphénols sur le métabolisme lipidique 30

3.6. Effets des polyphénols sur taux de cholestérol 34

3.7. Effets des polyphénols sur le poids corporel 35

Conclusion 37

PARTIE 02 : partie expérimentale

2.1. Matériel et méthodes	38
2.1.1. Matériel	38
2.1.1.1. Matières premières.....	38
2.1.1.2. Produits chimiques.....	38
2.1.1.3. Matières biologiques	38
2.1.1.4. Appareillages	38
2.1.1.5. Petit matériel.....	39
2.1.2. Méthodes	39
2.1.2.1. Méthodes physicochimiques	39
2.1.2.1.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford <i>et al</i> , (1976).....	39
2.1.2.1.2. Dosage des glucides par la méthode utilisant l'acide 3-5-dinitrosalicylique.....	40
2.1.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse	41
2.1.2.1.3.1. Acidité.....	41
2.1.2.1.3.2. Indice d'iode.....	41
2.1.2.1.4. Détermination de la teneur en vitamine C	41
2.1.2.2. Préparation des échantillons et leur purification.....	42
2.1.2.3. Méthodes chromatographiques.....	44
2.1.2.3.1. Chromatographie par filtration sur gel	44
2.1.2.4. Méthodes de caractérisation.....	46
2.1.2.4.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine	46
2.1.2.5. Méthodes électrophorétiques	47
2.1.2.5.1. Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)	48
2.1.2.5.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS).....	48
2.1.2.6. Révélation des bandes de migration électrophorétique	49
2.2. Résultats et discussion	50
2.2.1. Qualité physicochimique.....	50
2.2.1.1. Teneurs en protéines	50
2.2.1.2. Teneurs en sucres réducteurs dans différents types de jus de fruit en utilisant la méthode de DNS	51
2.2.1.3. Détermination des indices d'acidité et d'iode d'une matière grasse.....	51
2.2.1.3.1. Indice d'acide.....	51
2.2.1.3.2. Indice d'iode.....	52
2.2.1.4. Teneurs en vitamines C dans les différents jus commercialisés.....	52
2.2.2. Méthodes chromatographiques.....	53
2.2.2.1. Fractionnement des protéines sériques du lait bovin par chromatographie de péméation sur gel de SEPACRYLS200	53
2.2.3. Méthodes électrophorétiques	54
2.2.3.1. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native	54
2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques de lait de vache en PAGE-SDS	55
Conclusion	57
Références bibliographiques.	
Annexes.	

LISTE DES ABREVIATIONS

ACAT: Acyl-CoA Cholestéryl Acyl Transférase
ACC: Acétyl Coenzyme A (CoA) Carboxylase.
ACC1 : Acétyl-CoA Carboxylase-1.
ACC2: Acétyl-CoA Carboxylase-2.
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AMPK: La protéine kinase activée par l'AMP (AMP-activated protein kinase).
ATP: Adénosine-5'-triphosphate.
BDE: l'énergie de dissociation d'une liaison (*bond dissociation energy*).
C/EBP: CCAAT/enhancer binding proteins.
CETP : La protéine de transfert des esters de cholestérol (Cholesterylester transfer protein).
CDC : Les Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (Centers for Disease Control and Prevention).
COMT : Catéchol-O-Méthyl Transférase.
CPT-1: Carnitine Palmitoyl Transférase-1.
CPT-1 α : Carnitine Palmitoyltransferase-1 α .
DHHDP : Déhydrohexahydroxydiphénique
DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène
EGC : Gallate d'épicatéchine
EGC : Epigallocatechine.
EGCG : Gallate d'épigallocatechine.
EMA : Agence européenne des médicaments
FAS: Fatty acid synthase.
FDA : Agence Américaine des médicaments et des produits alimentaires (Food and Drug Administration)
GPAT-1 : Acyl Glycérol-3-phosphate-transférase-1.
GSE : Extrait de pépins de raisin.
HDL: Lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoproteins).
HHDP: Hexahydroxydiphénique
HMGCR: Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase.
HO•= Radical hydroxyle
H₂O₂= Peroxyde d'hydrogène
HSL: Lipase Hormono-Sensible.
HTA : Hypertension artérielle
IMC : Indice de masse corporelle.
LDL: Lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoproteins).
LPL: Lipoprotéine lipase
NHLBI: National Heart, Lung, and Blood Institute
NNE : Extrait de feuilles de *Nelumbo nucifera*.
O₂= Oxygène singulet
8-OH-dG= 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine
ONOOH= Nitroperoxyde
PF : Poids frais.
PI : Potentiel d'ionisation.
PL : Lipase pancréatique.
PKA : Protéine kinase AMPc-dépendante
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptors.
RL= Radicaux Libres
RO•= Radical alkoxyle
ROO•= Radical peroxyde

ROS: Reactive Oxygen Species (espèces réactives à l'oxygène ERO)
ROOH= Hydroperoxyde organique
RMR : Taux métabolique au repos (the resting metabolic rate)
SCD1: Stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1).
SRHW : Extrait de l'eau chaude de *Salacia. Reticulata*.
SREBP: Sterol regulatory element binding protein.
TC: Cholestérol total (Total cholesterol)
TEE : Dépense énergétique totale (The total energy expenditure)
TG: triglycérides.
UCP: Protéine découplante mitochondriale (mitochondrial uncoupling protein).
UCP2: Protéine découplante mitochondriale -2(mitochondrial uncoupling protein-2).
UCP3: Protéine découplante mitochondriale-3 (mitochondrial uncoupling protein-3).
VEGF: Facteur de croissance de l'endothéliale vasculaire (Vascular endothelial growth factor)
VEGFR: Récepteur de facteur de croissance de l'endothéliale vasculaire (Vascular endothelial growth factor recepneur).
VLDL: Lipoprotéines de très basse densité (Very low density lipoprotein).

LISTE DES FIGURES

Figure 01: les différentes sources des radicaux libres.....	03
Figure02 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.....	06
Figure03 : Les principales classes des composés phénoliques.....	07
Figure 04: Structure de base des flavonoïdes.....	08
Figure 05: Formes mésomères du phénol.....	13
Figure 06: Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères du radical aryloxy formé.....	14
Figure 07 : Effet biologiques des polyphénols.....	14
Figure 08 : Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols.....	16
Figure 09 : Régulation de la balance énergétique.....	22
Figure 10 : Effet des polyphénols sur la lipase pancréatiques.....	26
Figure 11 : mécanismes anti-obésité proposés du thé vert.....	27
Figure 12: Modèle proposée pour le mécanisme d'inhibition des polyphénols alimentaire sur l'adipogénèse.....	28
Figure 13: les mécanismes d'inhibitions des polyphénols des feuilles de mûrier sur la différenciation des adipocytes matures.....	30
Figure 14: modèle proposée pour l'effet de la curcumine sur le métabolisme énergétique des lipides.....	31
Figure 15 : Mécanisme possible du resvératrol sur la lipogénèse.....	33
Figure 16 : Mécanisme moléculaire de l'effet anti-obésité de polyphénols de cacao (CPs) dans le foie des rats.....	34
Figure 17 : réaction chimique de bleu de Coomassie G-250 sur les protéines.....	39
Figure 18 : Courbe étalon du dosage des protéines par la méthode de BRADFORD <i>et al</i> (1976), réalisée avec le BSA comme protéines de référence.....	40
Figure 19 : Réaction chimique du DNS sur les sucres réducteurs.....	40
Figure 20: courbe d'étalonnage des sucres réducteurs.....	41
Figure 21: diagramme d'isolement des caséines et protéines du lactosérum à partir du lait de vache.....	42
Figure 22 : la dialyse du lait écrémé.....	43
Figure 23 : Structure partielle des constituants du sephacryl S200.....	45
Figure 24: Photographie d'une unité de chromatographie basse pression.....	45
Figure 25 : Etapes suivies pour l'hydrolyse trypsique des protéines du lait de vache.....	46
Figure 26: Mécanisme de polymérisation du gel de polyacrylamide.....	47
Figure 27 : Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260).....	48
Figure 28 : Structure du dodécyl sulfate de sodium (SDS).....	49
Figure 29: chromatogramme des protéines sériques du lait bovin sur SEPHACRYL S200 (colonne 30cm).....	54
Figure 30 : Eléctrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T= 12%, C=2.7%.....	55
Figure 31 : Eléctrophorégramme des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache) obtenues par l'hydrolyse enzymatique (Trypsine) en PAGE-SDS ; gel de concentration (T=4% et C=2.7%), gel de séparation (T=17% et C=2.7%).....	56

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Sources de stress oxydant endogènes et exogènes.....	04
Tableau II : Tableau représentant la structure de base des principaux flavonoïdes.....	09
Tableau III : Tableau représentant la structure de base des principaux non flavonoïdes.....	11

Tableaux IV: Tableaux récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols.....	12
Tableau V : Classification du risque pour la santé en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) chez l'homme.....	19
Tableau VI : Effet des composées phénoliques des feuilles de mûrier sur l'obésité	29
Tableau VII: Concentrations en protéines totales, protéines sérique et en caséines des échantillons dosés par la méthode de Bradford et al 1976	50
Tableau VIII: les teneurs en sucres réducteur (g/l)	51
Tableau IX : Indices d'acidité et d'iode dans les huiles d'olives et tournesol	52
Tableau X : les teneurs en vitamine C dans les différents jus commercialisés.....	53

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 :** Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Bradford *et al* (1976)
- Annexe 2 :** Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)
- Annexe 3 :** Détermination de l'indice d'acide et d'iode d'une matière grasse.
- Annexe 4 :** Détermination de la teneur en vitamine C
- Annexe 5 :** les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 (protéines sériques).
- Annexe 6 :** Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-SDS)
- Annexe 7 :** Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

Glossaire

Alpha-MSH (alpha-melanocyte-stimulating hormone) : Est un polypeptide anorexigène constitué de 13 acides aminés. Il provient de l'hydrolyse de la pro-opiomélanocortine ou POMC. L' α -MSH libérée dans l'hypothalamus sous l'effet de la leptine, elle active notamment le récepteur MC4 (MC4R), ce qui conduit à une diminution de la prise alimentaire.

Acide gras synthase (FAS) : Est un complexe multienzymatique qui réalise la biosynthèse des acides gras linéaires saturés. La FAS est inhibée par le palmitoyl-CoA. Le malonyl-CoA diminue l'affinité de la FAS pour le NADPH au cours du jeûne (glucagon, cortisol).

Acétyl CoA Carboxylase (ACC) : Enzyme qui convertit l'acétyl CoA cytoplasmique en malonyl CoA.

Acyl glycérol-3-phosphate-transférase-1 (GPAT-1) : Enzyme qui estérifie les acides gras au glycérol pour former les triglycérides pour le stockage.

Adipogenèse : Est le processus de différenciation cellulaire selon lequel des pré-adipocytes deviennent des adipocytes matures.

Alkoyle : En chimie, un groupe alkoyle (souvent désigné par groupe alkoxy) est une espèce chimique de type monoradicalaire constituée d'un groupe alkyle lié à un atome d'oxygène : R-O•, H-O-R ou encore R₁-O-C_nH_{2n}-O-R₁.

Adipocytes : Sont des cellules matures différenciées, incapable de proliférer. Ces cellules présentes des activités fonctionnelles métaboliques : lipolyse, lipogenèse et sécrétions de leptine.

Adiponectine : Est une hormone produite par le tissu adipeux, qui est impliquée entre autres, dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose.

Adiposité : Etat de ce qui est adipeux, développement excessif du tissu graisseux dans une partie localisée de l'organisme.

Angiogenèse : Est la capacité de développement de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants.

Agrégation plaquettaire : Phénomène consécutif à l'adhésion des plaquettes entre elles et au collagène (protéine du tissu conjonctif, il constitue une étape initiale de l'hémostase (coagulation sanguine) lorsqu'un vaisseau est lésé.

AMP-activated protein kinase (AMPK) : Est un important régulateur du métabolisme énergétique qui est actif en réponse à une augmentation de l'AMP.

Anorexigène (ou coupe-faim ou supprimeurs de l'appétit) : sont un groupe de médicaments qui diminuent l'appétit. La plupart d'entre eux appartiennent à la famille des amphétamines, ce sont généralement des substances apparentées aux stupéfiants.

Apoptose : C'est un processus physiologique actif de mort cellulaire impliquant un programme génétiquement contrôlé d'autodestruction de la cellule.

Athérosclérose : Il s'agit de la perte d'élasticité des artères due à la sclérose, elle-même provoquée par l'accumulation de corps gras (essentiellement le mauvais cholestérol dit LDL) au niveau de la tunique interne (intima) des artères.

Bombésine : Appelé aussi GRP (Gastrin Releasing Peptid) est le neurotransmetteur par lequel le nerf vague agit sur les cellules G de la muqueuse gastrique. Cette stimulation du nerf vague provoque une sécrétion de gastrine qui agit à plusieurs niveaux dans le système de sécrétion gastrique dans le but d'augmenter l'acidité du suc gastrique.

CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP): Ce sont des facteurs de transcriptions qui possèdent, d'une part, un domaine basique de liaison à des séquences CCAAT présents dans les régions régulatrices des gènes cibles, et d'autre part, un domaine à glissière de leucine qui leur permet de une homo ou une hétéro-dimérisation . Trois isoformes de C/EBPs, α , β et γ , possèdent un rôle inducteur dans l'adipogenèse. Les C/EBPs β et γ sont induits de façon très Précoce au cours de l'adipogenèse, et jouent un rôle clé dans l'enclenchement de la maturation terminale. L'induction de C/EBP α se fait plus tardivement.

Carnitine palmitoyl transférase-1(CPT-1) : Est une enzyme localisé dans la membrane interne de la mitochondrie, elle convertie le fatty acyl CoA en acyl-CoA qui rejoint la β oxydation.

Cellules 3T3-L1 : Est une lignée cellulaire dérivée des cellules 3T3 qui est utilisée considérablement dans la recherche sur le tissu adipeux. Les cellules 3T3-L1 ont une morphologie qui ressemble à des fibroblastes, mais dans les bonnes conditions ces cellules se différencient dans un phénotype qui imite le comportement des adipocytes. Le système 3T3-L1 *in vitro* est considéré comme un complément hautement utile aux cultures humaines primaires d'adipocyte, et a été employé considérablement par des scientifiques pour déverrouiller plusieurs des mystères des maladies métaboliques. La lignée cellulaire 3T3-L1 est identifiée comme système *in vitro* très bien caractérisé et cohérent, et a servi de base à un large éventail d'études publiées.

Cellules stromales : Sont des variétés de cellules possédant les capacités des cellules-souches, appartenant en grand nombre au tissu graisseux.

Cholécystokinine (CCK) : Est une hormone peptidique gastro-intestinale sécrétée par certains entérocytes (cellules neuroendocrines) de la muqueuse du duodénum et relarguée dans la circulation sanguine en réponse à l'arrivée des lipides surtout insaturés et des protéines dans la lumière intestinale. Elle entraîne la libération d'enzymes digestives pancréatiques catalysant la dégradation des lipides, des protéines et des glucides ingérés.

Corticolibérine (CRH) : Neurohormone sécrétée par l'hypothalamus, le tissu nerveux et le placenta. Il est impliqué dans les troubles du sommeil, de l'appétit, ainsi que dans la dépression, l'inflammation et probablement dans le déclenchement de l'accouchement.

Cycle entéro-hépatique : Est la circulation en boucle des acides biliaires à partir du foie où ils sont produits et sécrétés dans la bile, jusqu'à l'intestin grêle où ils permettent la digestion des graisses et d'autres substances, avec retour vers le foie.

Cytokines : Sont des substances solubles de signalisation cellulaire synthétisées par les cellules du système immunitaire ou par d'autres cellules ou tissus, agissant à distance sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction.

Estérification : Est une réaction de chimie organique au cours de laquelle un groupe fonctionnel ester -COOR est obtenue par condensation d'un groupe acide carboxylique -COOH et d'un groupe alcool -OH. La réaction de base est la condensation d'un alcool sur un acide carboxylique avec élimination d'une molécule d'eau.

Facteurs antinutritionnels : Sont des substances même à l'état de traces réduisent totalement l'utilisation d'un élément nutritif.

Facteur de croissance de l'endothéliale vasculaire (VEGF): C'est une protéine qui déclenche la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et qui est nécessaire pour accompagner la croissance des tissus et le développement des organes. L'action des VEGF nécessite leur fixation sur des récepteurs à activité tyrosine kinase: VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3.

Glucagon-Like peptide-1 (GLP-1) : Est une hormone intestinale sécrétée par les cellules L de l'iléon en réponse à un repas. Le GLP-1 fait partie des hormones de satiété.

Glutathion : Est un tripeptide, formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : γ -L-Glutamyl-L-cystéinylglycine. Le glutathion, qui existe sous forme oxydée et réduite, intervient dans le maintien du potentiel redox du cytoplasme de la cellule. Il intervient aussi dans un certain nombre de réaction de détoxication et d'élimination d'espèces réactives de l'oxygène. À noter que le groupement amine de la cystéine se condense avec la fonction acide carboxylique en γ de l'acide glutamique.

Hépatotoxicité : Se définit par la capacité d'une substance à détruire les cellules du foie. Dans la grande majorité des cas, cette destruction est liée à la prise d'un médicament : on parle alors d'hépatotoxicité médicamenteuse.

Homozygotes : Est un individu qui porte deux allèles identiques d'un même gène.

Hormone mélanotrope : Ou mélanotropine ou mélanocortine (nom le plus utilisé) ou MSH (pour melanocyte stimulating hormone), est une hormone sécrétée par les cellules mélanotropes de l'hypophyse, elle agit sur les mélanocytes. Elle est le produit de maturation d'une pro-hormone, la POMC, par des enzymes spécifiques appelées pro-hormone convertases.

Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase HMGCR (HMGCR): Est une protéine transmembranaire appartenant à la membrane du réticulum endoplasmique, C'est une oxydoréductase intervenant dans la voie du mévalonate, dont elle régule l'intensité. La voie du mévalonate est une voie métabolique importante chez les eucaryotes supérieurs et certaines bactéries car elle produit les précurseurs du cholestérol et d'autres terpénoïdes.

Hypercholestérolémie : Un taux trop élevé de cholestérol dans le sang.

Hyperphagie : C'est le fait de manger en trop grandes quantités

Hyperplasie : Est un terme médical désignant une augmentation de volume d'un tissu ou d'un organe due à une augmentation du nombre de ses cellules.

Hypertrophie : Est le développement trop important (l'augmentation de volume) d'une partie du corps, d'un organe ou d'un tissu, mais aussi d'une cellule.

Hypolipémiant : C'est la réduction du taux de lipides dans le sang.

Hypogonadisme : Correspond à un défaut de production de fonctionnement de l'appareil reproducteur.

Ghréline : Est une hormone digestive qui stimule l'appétit : son taux augmente avant les repas et diminue après ceux-ci. Cette hormone est considérée comme l'antagoniste de l'hormone leptine, produite par les adipocytes, qui induit la satiété lorsque son taux augmente

Leptine : Est une hormone peptidique qui régule les réserves de graisses dans l'organisme et l'appétit en contrôlant la sensation de satiété. C'est une hormone anorexigène. Elle est sécrétée par le tissu adipeux blanc qui, en plus de sa fonction de stockage et de mobilisation des acides gras, possède également une activité endocrine très importante. La leptine est également sécrétée par d'autres tissus tels que l'estomac, le muscle squelettique, la moelle osseuse.

Lipase gastrique : Elle correspond à l'une des enzymes hydrosolubles qui permettent de réaliser l'hydrolyse des fonctions esters. Ces enzymes spécifiques transforment également les triglycérides en glycérol ou en acides gras, on parle alors de lipolyse.

Lipémie postprandiale : Se caractérise par une augmentation des lipoprotéines riches en triglycérides après un repas, et joue un rôle important dans la biodisponibilité des lipides alimentaires pour les tissus périphériques. En effet, une lipémie postprandiale élevée est souvent associée à l'obésité et à une dyslipidémie.

Lipogénèse : Désigne l'ensemble des processus biochimiques permettant la synthèse des lipides en général et des acides gras en particulier.

Lipolyse : Est la dégradation des lipides qui conduit à la libération des esters d'acides gras, du glycérol par hydrolyse des glycérides (triglycérides, diglycérides et monoglycérides).

Lipoprotéines : Sont de grands complexes de protéines et de lipides, hydrosolubles, qui transportent massivement les lipides dans tout l'organisme. La coque externe est une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et une ou plusieurs molécules protéiques appelées apolipoprotéines (par exemple apo-A, Apo-B, etc.) ; la partie centrale contient des triglycérides, des esters de cholestérol et de petites quantités d'autres substances hydrophobes, comme des vitamines liposolubles. Les lipoprotéines sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase. Les chylomicrons synthétisés par l'entérocyte et les VLDL, synthétisés par le foie, sont des lipoprotéines.

Lipoprotéine lipase (LPL) : Est une enzyme plasmatique spécifique, ce qui veut dire que le plasma est le compartiment dans lequel elle est active physiologiquement. La lipoprotéine lipase est l'enzyme qui permet l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines plasmatiques : chylomicrons, VLDL en acides gras libres et glycérols.

Lipoprotéines de très basse densité (VLDL) : Les lipoprotéines de très faible densité est produit dans le foie, ils sont responsables du transport lipidique du foie vers les tissus périphérique.

Masse maigre : C'est le compartiment le plus important physiologiquement, il représente 70 à 90 % du poids corporel, il est composé des os, muscles, organes et la peau.

Métabolisme de base : Corresponds aux calories que le corps brûle pour assurer son maintien en bonne santé : battements cardiaque, température corporelle, respiration, renouvellements

des tissus... Ces besoins sont très importants puisque le métabolisme de base consomme deux tiers des calories apportées à l'organisme.

Monozygotes : Proviennent de la division d'un œuf fécondé unique.

Mitochondrial uncoupling protein (UCP) : Les protéines découplante (UCP) sont des transporteurs mitochondriaux de la membrane interne.

Mitochondrial uncoupling protein-2 (UCP2): Se trouve dans l'intestin, le tissu adipeux, les muscles et le cerveau. Elle a un rôle dans la thermogénèse induite par l'alimentation ainsi que dans l'obésité (régulation du poids corporel).

Mitochondrial uncoupling protein-3 (UCP3): C'est un transporteur d'acides gras anionique de la membrane mitochondriale vers le cytoplasme, elle est exprimée dans les muscles squelettiques.

Neurogenèse : Processus de création de neurones fonctionnels à partir de cellules souches neurales.

Neuropeptide Y (NPY) : Est un peptide de 36 acides aminés, fortement exprimé dans le système nerveux central, il exerce un rôle important dans l'homéostasie énergétique.

Néphrotoxicité : Ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales induites directement ou indirectement par des substances chimiques absorbées dans l'organisme, quelle qu'en soit la voie de pénétration.

Oxygène singulet : L'oxygène singulet est un état métastable de la molécule de dioxygène. Il se forme notamment au cours de la réaction bien connue de l'eau oxygénée dans l'eau de Javel par action des ions hypochlorite ClO^- sur le peroxyde.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR): Appartient à la famille des récepteurs nucléaires hormonaux. On a 3 isoformes de PPAR α , β et γ , chacun est codé par un gène différent et caractérisé par une distribution tissulaire, des ligands, des cofacteurs et des fonctions qui leur sont propres.

Peroxydations des lipides : Est l'oxydation des lipides insaturés, soit par des espèces radicalaires de l'oxygène, soit catalysée par des enzymes.

Peroxyde d'hydrogène : est un composé chimique de formule H_2O_2 . Sa solution aqueuse est appelée eau oxygénée. Elle est incolore et légèrement plus visqueuse que l'eau. Le peroxyde d'hydrogène existe naturellement chez les êtres vivants comme sous-produit de la respiration cellulaire. Tous les organismes aérobies possèdent des enzymes, appelées peroxydases, qui catalysent la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2

Phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) : Joue un rôle dans la transduction de signal, intervenant dans le métabolisme, l'angiogénèse et la cancérogenèse

Prohormone convertase 1 (PCSK1) : Est une neuroendocrine convertase Ca^{2+} dépendante appartenant à la famille des endoprotéases à sérine de type subtilisine et est capable de cliver la protéine précurseur POMC dans les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure. D'autre part, PCSK1 entraîne la maturation de la proinsuline en insuline et du proglucagon en

glucagon dans les îlots pancréatiques. Des mutations du gène PCSK1 sont responsables d'une forme mendélienne de l'obésité chez l'homme.

Pro-opiomélanocortine (POMC) : Est le précurseur polypeptidique des hormones corticolipotropes et des endorphines. Découverte initialement dans les cellules corticotropes de l'antéhypophyse, elle s'est révélée par la suite produite dans de nombreux autres tissus, tels l'hypothalamus, le système nerveux central et la peau. Les modifications post-traductionnelles de la POMC, en particulier son clivage peptidique, permettent la synthèse des différents fragments : *adreno cortico trophic hormone* (ACTH), lipotropine (LPH), *melanocyte stimulating hormone* (MSH) et bêta-endorphine.

Récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4R) : Est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G, il joue un rôle clé dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire.

Sibutramine : Est un médicament produit par les laboratoires Abbott depuis 1997, utilisé comme traitement d'appoint contre l'obésité nutritionnelle et parfois en cas de diabète de type II ou de dyslipidémie.

Simpson-Golabi-Behmel humaine : Une maladie génétique se manifestant par une croissance excessive à la naissance.

Spumeux : La masse spumeuse se compose en majeure partie d'air emprisonné dans de petites bulles.

Stéaryl CoA désaturase1 (SCD1) : Enzyme qui catalyse une étape limitant dans la biosynthèse des acides gras insaturée (mono-insaturée) à partir des acides gras saturée.

Sterol regulatory element binding protein(SREBP): Appartient à une famille de facteurs de transcriptions décrites initialement comme contrôlant des gènes impliquée dans le métabolisme des lipides et de cholestérol.

Superoxyde dismutase (SOD) : Sont des métalloprotéines possédant une activité enzymatique : la catalyse de la dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Pour cette raison, cette enzyme est une partie importante du système de défense contre les radicaux libres. Elle est présente dans presque tous les organismes aérobies.

Thiol : Est un composé organique comportant un groupement thiol -SH (groupement sulfhydryle) attaché à un atome de carbone. Les thiols ont été découverts par William Christopher Zeise.

Thrombose : C'est un caillot de sang qui se forme dans une veine (thrombose veineuse) ou une artère (thrombose artérielle).

PARTIE I

Synthèse
bibliographique

Introduction

Un apport alimentaire équilibré en macronutriments (glucides, lipides et protéines), ainsi qu'en micronutriments (minéraux et vitamines) est indispensable en permanence pour maintenir les fonctions vitales de l'organisme (croissance, développement, reproduction...). Par contre, un déséquilibre alimentaire constitue un facteur de risque majeur de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et l'obésité.

Cette dernière, considérée autrefois comme un signe de prospérité, est regardée maintenant comme une maladie à part entière, dont la prévalence augmente à un rythme alarmant. L'obésité est devenue le problème nutritionnel majeur dans la plupart des pays, à tel point qu'on a pu parler d'épidémie mondiale (Shahzaya *et al*, 2010).

L'obésité est une maladie chronique, évolutive et multifactorielle. Les déséquilibres qui touchent la régulation de la masse corporelle, la prolifération du tissu adipeux ou encore les dépenses énergétiques, en plus, de l'expression d'une susceptibilité génétique sous l'influence de facteurs environnementaux et hormonaux avec, au premier rang la diététique et le comportement alimentaire ainsi qu'un mode de vie sédentaire sont les acteurs les plus suspectés afin d'expliquer l'installation et le développement de l'obésité, que les chercheurs exploitent afin de trouver des pistes pour lutter contre l'obésité et les pathologies qui lui sont associées (Vance et Hanning, 2004 ; De Brandt, 2004 ; Basdevant, 2008 ; Schlienger *et al*, 2009). La prise en charge de l'obésité est globale et adaptée à la situation de chaque patient: elle peut aller de simples recommandations diététiques (régimes hypocaloriques amaigrissant) pour favoriser la perte de poids, en passant par l'exercice physique, les médicaments, jusqu'à l'intervention chirurgicale (Moro *et Basile*, 2000 ; Kretschmer *et al*, 2005).

Beaucoup de chercheurs dans le domaine des sciences de la nutrition et de la diététique se sont penchés sur la médecine traditionnelle et la phytothérapie pour la recherche d'ingrédients alimentaires fonctionnels et / ou des extraits de végétaux, facilement accessibles et à moindre coût, qui peuvent empêcher l'accumulation de la graisse du corps et ainsi atteindre la perte du poids corporel (Yun *et al*, 2008).

Au cours des dernières décennies, les plantes médicinales ont largement été utilisées dans la gestion de l'obésité à cause de leur contenu en une grande variété de composants photochimiques avec différents effets antiobésité et anti-oxydants sur le métabolisme et de l'oxydation des graisses, un bon exemple est les polyphénols.

Les propriétés anti-obésités des polyphénols peuvent s'exercer suivant différents modes d'action: par effet direct sur la prise alimentaire en supprimant l'appétit et induisant la sensation de satiété, sur la dépense énergétique par l'augmentation du taux du métabolisme en activant la thermogénèse, sur l'inhibition de l'activité de la lipase pancréatique qui prévient l'absorption des lipides intestinales, par l'augmentation de la lipolyse par induction de la β -oxydation.

Notre activité de recherche bibliographique est destinée à comprendre le potentiel anti-obésité des polyphénols alimentaires et leurs mécanismes moléculaires.

Le premier chapitre est consacré aux rappels bibliographiques concernant les antioxydants et les polyphénols en particuliers, puis le deuxième chapitre porte sur l'étude de l'obésité, ses complications et ses traitements, enfin dans le dernier chapitre nous nous sommes intéressées aux effets des composés phénoliques comme composés régulateurs et /ou préventif de l'obésité.

Chapitre 1
Les antioxydants (les
polyphénols)

Synthèse bibliographique

I. Les radicaux libres, le stress oxydatif et les antioxydants

1.1. Introduction

Certaines réactions biochimiques dans le corps humain produisent des radicaux libres malfaisants à la santé à cause de leur pouvoir oxydant élevé. Ils provoquent le vieillissement prématuré, des problèmes cardio-vasculaires, l'athérosclérose, le diabète, certains cancers, etc. Concernant l'alimentation, l'oxydation des lipides est responsable de la formation de composés chimiques indésirables, résultants en goûts et odeurs désagréables et diminuant la qualité de la nourriture et pouvant être dommageables à la santé. Pour entraver ces processus non désirés, des additifs antioxydants synthétiques ou naturels sont utilisés. Cependant de nombreuses études ont démontré que ces derniers ont des effets néfastes sur l'organisme humain. Pour cette raison, on accorde actuellement un large intérêt aux antioxydants naturels, en particuliers aux produits issus des végétaux, spécialement les fruits et légumes, sans oublier les vins, en particulier le vin rouge qui est parmi des plus grandes sources de polyphénols (GEORGIEVA *et al*, 2010).

1.2. L'oxydation

L'oxydation est le phénomène chimique qui fait rouiller les métaux, qui fait flétrir les légumes et les fruits, rancir les graisses. Il modifie le goût et la couleur des aliments. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. L'organisme subit également le phénomène d'oxydation, mais il est équipé pour lutter contre ces altérations : un énorme système de défense est en permanence en place, avec des systèmes enzymatiques et/ou des systèmes de régénération de complexes mettant en jeu par exemple le glutathion. Mais ce système de défense est parfois dépassé notamment quand les agressions sont multipliées sous l'effet de la fumée du tabac, d'un effort physique intense, de stress permanent, de mauvaise alimentation, ... etc. (ROLLAND, 2004).

1.3. Les radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique qu'il soit une molécule ou un atome où plusieurs électrons sont célibataires non appariés sur l'orbital externe (GARDES-ALBERT *et al*, 2003) Les RL sont des entités très réactives car ils ont tendance à rechercher un nombre paire d'électrons afin d'apparier son électron célibataire. Ceci est rendu possible soit en arrachant ou en cédant un électron célibataire (PUY, 2012). La production de RL est permanente au sein de la cellule. Ils ont pour rôle d'abîmer les autres atomes de l'organisme et plus ils sont nombreux, plus ils sont nocifs (PUY, 2012). La présence d'un électron libre confère à ces molécules une grande instabilité donc leur durée de vie est très brève et elles peuvent réagir immédiatement avec les constituants de la cellule (ADN, protéine, lipides) et ainsi provoquer de grave altérations voir la mort de la cellule (RAMONATAXO, 2006)

1.3.1. Les radicaux libres sont la majorité des dérivés réactifs de l'oxygène

Les principaux représentants des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) sont: le radical hydroxyle ($\text{HO}\bullet$), le radical peroxyde ($\text{ROO}\bullet$), le radical alkoxyde ($\text{RO}\bullet$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'hydroperoxyde organique (ROOH), l'oxygène singulet (O_2).

Ces DRO proviennent de produits dérivés de réactions enzymatiques essentielles, principalement de processus métaboliques endogènes (Figure 1) (STEINHILBER *et al*, 2005).

Synthèse bibliographique

Les mitochondries sont la principale source de production de radicaux libres			
Mitochondries	Microsome	Peroxisome	Cytosol
45 %	20 %	30 %	5 %
Exception pour le foie, où les microsomes sont les principaux producteurs			
Mitochondries	Microsome	Peroxisome	Cytosol
15 %	45 %	35 %	5 %

Figure 1: les différentes sources des radicaux libres (PUY, 2012).

Les DRO ont évidemment aussi une importance physiologique, utilisés par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telle la vasodilatation. Par contre des radicaux comme les radicaux peroxydes (ROO°) ou surtout le radical hydroxyle (OH°) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. D'autres espèces dérivés de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH) ne sont pas des radicaux mais sont aussi réactifs et peuvent être des précurseurs de RL.

1.3.2. Actions des radicaux libres sur :

- **L'acide désoxyribonucléique ou ADN :**

L'ADN est une cible privilégiée pour les DRO. La guanine, par exemple, peut réagir avec $\cdot\text{OH}$ pour former la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliquées dans le déclenchement du cancer et le vieillissement.

- **Les protéines :**

Les acides aminés possèdent des susceptibilités différentes vis-à-vis des DRO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoquera l'oxydation de certains résidus avec, pour conséquences, l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes. La plupart des dommages sont irréparables et peuvent entraîner des modifications fonctionnelles importantes (non- reconnaissance d'un récepteur par un ligand, perte d'activité enzymatique). Certaines protéines oxydées sont peu dégradées et forment des agrégats qui s'accumulent dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire ce qui provoque des désorganisations cellulaires parfois irréversibles entraînant la mort de la cellule.

- **Les lipides membranaires :**

Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI). Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), suffisamment réactif pour arracher un H à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire. Les peroxydes générés seront neutralisés par la glutathion peroxydase ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (malondialdéhyde, 4-hydroxynonéal).

Synthèse bibliographique

- **Les lipoprotéines :**

L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL oxydées, qui seront captées par des récepteurs spécifiques des macrophages. Ces derniers se transforment petit à petit en cellules spumeuses (rôle important dans les premières étapes de l'athérosclérose). En outre, ces LDL oxydées sont immunogènes et les immuns complexes formés peuvent activer la voie classique du complément et générer la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (HALENG *et al*, 2007).

1.4. Le stress oxydatif :

Le stress oxydatif correspond à un déséquilibre entre la génération des DRO et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières. Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des DRO dans notre organisme (Tableau I). Les réactions en chaîne qui peuvent être provoquées par ces dernières affaiblissent tout l'organisme. A tel point qu'à terme il est de moins en moins résistant. Cela ne fait que renforcer l'action du stress oxydatif et les radicaux libres poursuivent leur œuvre destructrice et contribuent à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires, voir la mort cellulaire (OHLenschläger, 2010).

Tableau I: Sources de stress oxydant endogènes et exogènes (HALENG *et al*, 2007).

Mode de vie Tabagisme Faible consommation en fruits et légumes Alcool Médicaments Pilule contraceptive Exposition au soleil Exercice intense ou mal géré
Environnement Pollution Ozone Amiante Radiations Contact avec des substances cancérigènes
Mécanismes Biochimiques Xanthine-oxydase (ischémie-reperfusion) Inflammation Altération de la fonction endothéliale Surcharge en fer Oxydation de l'hémoglobine Altérations mitochondriales Biosynthèse des prostaglandines Interventions chirurgicales (circulation extra-corporelle, transplantations)

Synthèse bibliographique

1.5. Les antioxydants :

Les antioxydants sont des composés qui empêchent ou diminuent le processus d'oxydation d'autres substances chimiques et cela en se réduisant avec les radicaux aboutissant donc à leur réduction ou à leur élimination et en inhibant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

Les antioxydants sont des substances naturellement présentes dans l'organisme, ils constituent un système de défense *in vivo*, ils se composent de plusieurs lignes de protection. La principale d'entre elles consiste à inhiber la formation des radicaux libres et des dérivés réactifs de l'oxygène en isolant les ions métalliques et en détruisant l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, réduisant le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes dans chaque cellule de l'organisme. Les plantes et les animaux utilisent et produisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C, la vitamine E et les polyphénols, ou des enzymes telles la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases.

Lorsqu'il s'agit de denrées alimentaires, les antioxydants sont regroupés comme additifs alimentaires (conservateurs) qui augmentent la durée de vie de ces produits en les protégeant contre la détérioration, également utilisés pour les cosmétiques, ou encore pour préserver le caoutchouc ou l'essence (ANONYME 2, 2006).

II. Les polyphénols

2.1. Définition

Les polyphénols constituent une famille de composés qui sont omniprésents dans le règne végétal (El-HACI et al, 2012). Leurs principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, des boissons comme le vin rouge, le thé, le café, les jus de fruits, les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs (EDEAS, 2007). Ils sont caractérisés par la présence dans leur structure d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside (HANDIQUE et BARUAH, 2002). Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits (BIOZOT et CHARPENTIER, 2006).

2.2. Biosynthèse des polyphénols :

Les polyphénols représentent un groupe de métabolites secondaires complexes (COLLIN et al, 2011). Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues (MANACH et al, 2004). Selon AKROUM (2011), ils sont issus par deux grandes voies métaboliques (figure 2) : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate :

- **La voie de l'acide shikimique:** Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés. Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.
- **La voie de l'acide malonique:** La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que

Synthèse bibliographique

s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase.

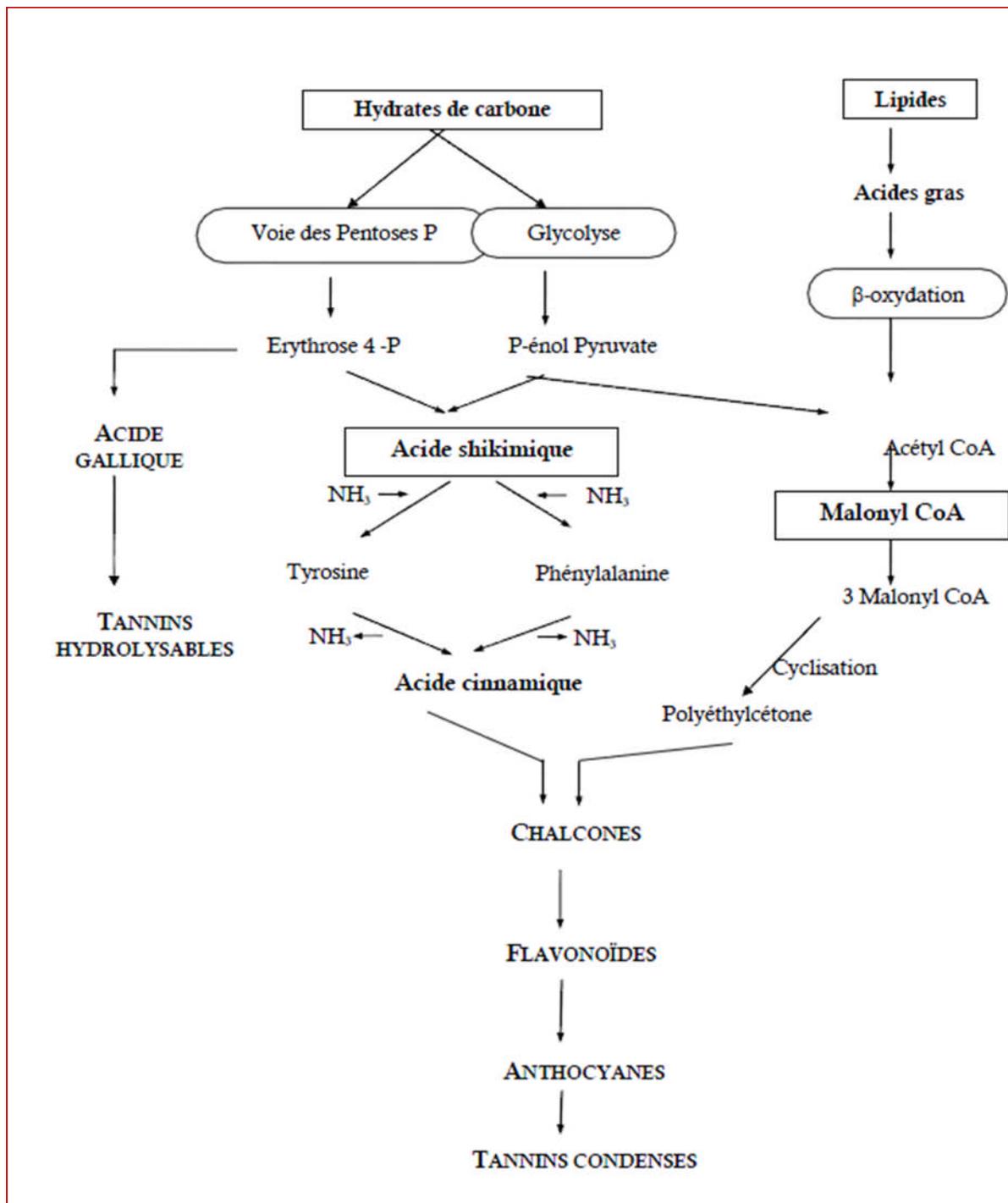


Figure 2 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (AKROUM, 2011)

Synthèse bibliographique

2.3. Classifications des composés phénoliques :

La structure des composés phénoliques va du simple noyau aromatique de faible poids moléculaire jusqu'aux tanins complexes de très haut poids moléculaire (CHIRA *et al*, 2008). Plus de 8000 structures phénoliques ont été rapportées (figure 3) et elles sont largement dispersées dans tout le règne végétal. Elles peuvent être classées en fonction du nombre et de la disposition de leurs atomes de carbone et l'on trouve couramment conjugués à des sucres et des acides organiques (CROZIER *et al*, 2006). Les composés phénoliques peuvent être répartis en deux grands groupes : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes (CHIRA *et al*, 2008).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinnamiques, Phenylpropenes	Acide caféique, acide férulique	Pomme de terre, Pomme, citrus
	Coumarines	Myristicin, eugénol	
	Isocoumarines	Scopolétine	
	Chromones	Myristicine, eugénol	
	Eugenine		
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones polyphénols	Juglone, plumbagine	Noix
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferine	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
	Anthraquinones	Anthraquinones	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes, isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine, daidzéine	Fruit, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
	Neolignanes	Eusiderine	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides	Amentoflavone	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyaux, raisin, kaki
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		

Figure 3 : Les principales classes des composés phénoliques (MACHEIX *et al*, 2006).

Synthèse bibliographique

2.3.1. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux (GHEDIRA, 2005). Ils contiennent quinze atomes de carbone dans leur structure de base: deux cycles aromatiques A et B à six atomes de carbones (figure 4) liés avec une unité de trois atomes de carbone qui peut ou non être une partie d'un troisième cycle C (TAPAS et al, 2008).

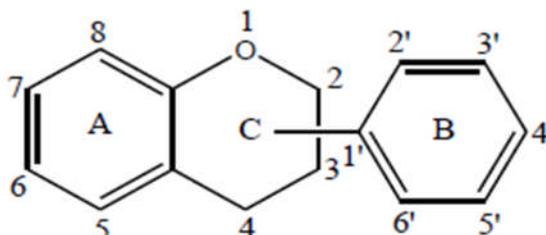


Figure 4: Structure de base des flavonoïdes.

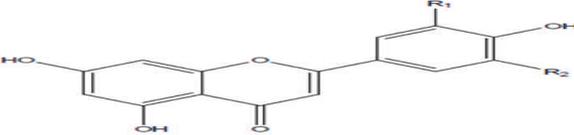
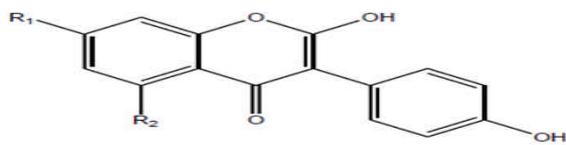
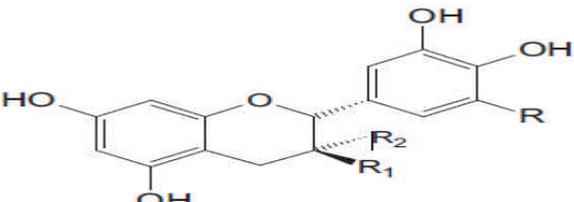
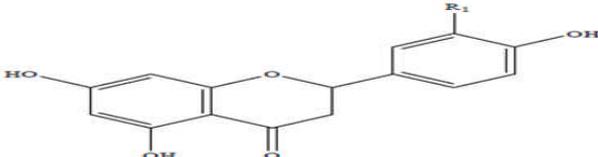
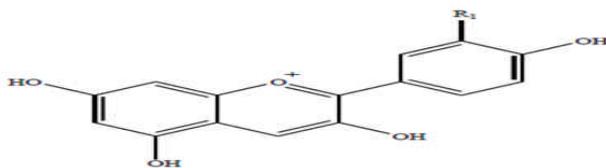
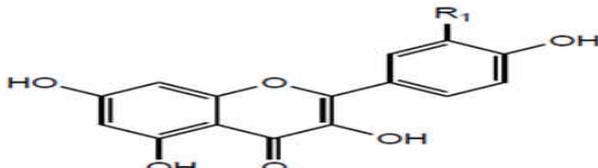
Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes des molécules dont les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les flavanones, les isoflavones, les isoflavanones, les anthocyanidines (tableau II).

- **Les flavones :** Les flavones sont structurellement très similaires aux flavonols et ne diffèrent que par l'absence d'hydroxylation en position 3 sur le cycle C. Elles sont principalement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline (FRAGA, 2009).
- **Les isoflavones :** Les isoflavones sont considérées comme des dérivés des flavones, elles représentent une sous-classe importante et très distinctive des flavonoïdes (BOUHEROUM, 2007). Contrairement à la plupart des autres flavonoïdes, les isoflavones sont caractérisées par la présence d'un cycle B fixé à C3 plutôt que la position C2. Elles ont une distribution très limitée dans le règne végétal (FRAGA, 2009).
- **Les flavan-3-ols:** Ces composés vont des simples monomères (+)-catéchine et son isomère (-)-épicatéchine, jusqu'aux oligomères et polymères de proanthocyanidines. Les catéchines se trouvent dans de nombreux fruits comme le thé vert et le vin rouge (jusqu'à à 300 mg/L) (D'ARCHIVIO et al, 2007 ; CHIRA et al, 2008).
- **Les flavanones :** Ces molécules sont caractérisées par l'absence de double liaison en 2, 3 et par la présence d'un centre d'asymétrie en 2 (PORTET, 2007). Ils sont présents à des concentrations particulièrement élevées dans les agrumes (CROZIER et al, 2006).
- **Les anthocyanes :** Leur structure commune est caractérisée par le cation flavylum (2-phenylbenzo-pyrylium) portant des fonctions hydroxyles et/ou méthoxyles. Les anthocyanidines naturels peuvent être classés en trois sous-groupes : Pelargonidine, cyanidine et delphinidine (BOUHEROUM, 2007). Ils jouent un rôle prépondérant dans la coloration des nombreux aliments (myrtilles, cacao) (COLLIN et al, 2011).
- **Les flavonols :** Les flavonols sont caractérisés par la présence d'une double liaison en position 2-3 et d'un groupement hydroxyle en C3. ils sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal et dans nos aliments, ils sont essentiellement représentés par la quercétine et la myricétine. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus végétaux sont presque toujours sous la forme conjuguée glycosylée (FRAGA,

Synthèse bibliographique

2009). Les sources les plus riches sont les oignons, le chou, les poireaux, le brocoli. (D'ARCHIVIO *et al*, 2007).

Tableau II : Tableau représentant la structure de base des principaux flavonoïdes.

Flavonoïdes (classe)	Flavonoïdes (exemples)
Flavones 	l'apigénine la lutéoline.
Isoflavones 	Genisteine daidzeine
Flavan-3-ols 	(+)-catéchine (-)-épicatéchine
Flavanones 	Naringénine Eriodictyol Hésperitines
Anthocyanes 	Pélagonidine Cyanidine
Flavonols 	Kaempférol Quercétine Isorhamnétine

II.3.2. Les non flavonoïdes

Les composés non flavonoïdes regroupent les acides phénoliques (les acides benzoïques et Les acides hydroxycinnamiques), les stilbènes dont le plus connus est le resvératrol, les lignanes, les lignines et les coumarines (tableau III).

Synthèse bibliographique

2.3.2.1. Les acides phénoliques: sont constitués de deux sous-groupes :

✓ **Acides hydroxybenzoïques C6-C1 :**

Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque. Ils sont particulièrement représentés chez les Gymnospermes et les Angiospermes d'où ils sont souvent libérés après hydrolyse alcaline du matériel végétal. Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous formes d'esters ou de glycosides (MACHEIX et *al*, 2005). Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (CHANFORAN, 2010).

✓ **Acides hydroxycinnamiques C6-C3**

Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base C6-C3 dérive de celle de l'acide cinnamique. Le degré d'hydroxylation du cycle benzénique et son éventuelle modification par des réactions secondaires sont des éléments importants de la réactivité chimique de ces molécules. (FLEURIT et *al*, 2005).

Les acides hydroxycinnamiques sont retrouvés dans toutes les parties des fruits et des légumes, quoique les concentrations les plus élevées soient observées dans la partie externe du fruit mûr. (DE LA ROZA, 2009). L'acide chlorogénique (ou acide 5-Ocaféoylquinique) est la forme combinée de l'acide caféique, il est retrouvé en forte concentration dans le café (CROZIER et *al*, 2008).

2.3.2.2. Les stilbènes

Les stilbènes représentent une famille de molécules dont un motif structural à l'état monomérique ou polymérique. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés (monomères et oligomères de resvératrol), méthylés (pterostilbène), estérifiés, glycosylés (picéïdes) ou même prenylés (chiricanines) (JEAN-DENIS, 2005).

Le resvératrol (3-4'-5 trihydroxystilbène) est le seul stilbène identifié dans notre alimentation. C'est le composé typique du vin rouge (de 0,3 à 2 mg/g) (DERBEL et GHEDIRA, 2005).

2.3.2.3. Lignines

La lignine est un polymère fortement ramifié, formé par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes; la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine (HOPKINS, 2003).

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations (HOPKINS, 2003).

2.3.2.4. Les lignanes

Le terme de lignanes désigne des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones B des liaisons latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8'). Ils répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)₂.

L'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques (PETERSON et *al*, 2010). Ils sont très répandus dans les végétaux, leur principale source alimentaire étant les céréales complètes, les fruits, les baies et les légumes contiennent des lignanes en moindre quantité que les céréales mais constituent un apport important dans une alimentation variée (ROBERFROIDE et *al*, 2007)

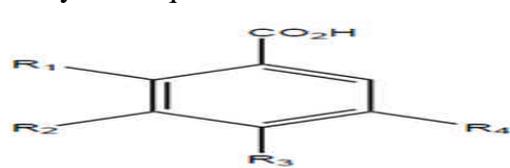
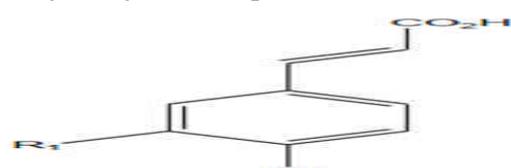
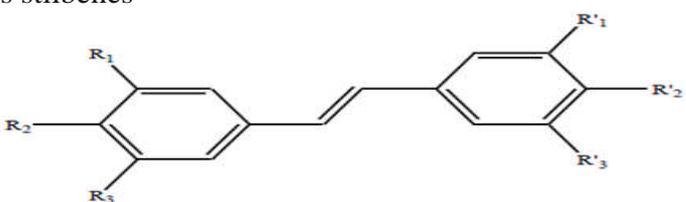
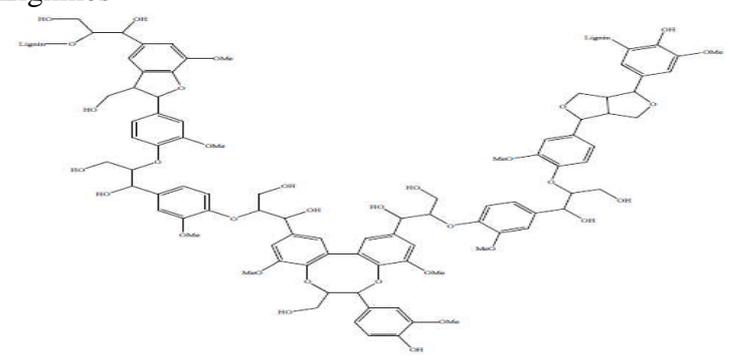
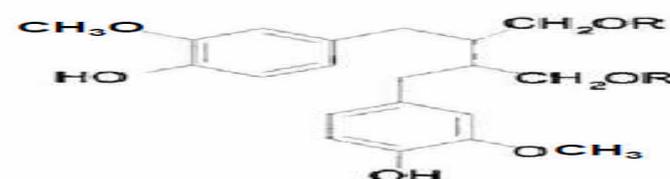
Synthèse bibliographique

2.3.2.5. Les coumarines

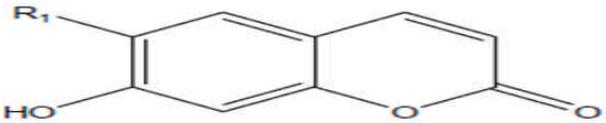
Elles sont présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydrocinnamiques (COLLIN et CROUZEL, 2011).

Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux. Dans la cellule, les coumarines sont principalement présentes sous forme glycosylée. Cette glycosylation serait une forme de stockage permettant d'éviter les effets toxiques des coumarines sur la cellule et la croissance des plantes. Elles sont considérées comme des phytoalexines. Celles-ci sont des molécules de faible masse moléculaire provenant de voies métaboliques variées comme celle des phénylpropanoïdes ou des sesquiterpènes (HOFFMANN, 2003).

Tableau III : Tableau représentant la structure de base des principaux non flavonoïdes.

Non flavonoïdes (classe)	Non flavonoïdes (exemples)
Acides hydroxybenzoïques 	Acide protocatéchique Acide vanillique Acide gallique
Acides hydroxycinnamiques 	Acide cinnamique Acide p-coumarique Acide caféique Acide férulique
Les stilbènes 	Resvératrol Ptérostilbène picéide
Lignines 	/
Les lignanes 	Secoisolariciresinol

Synthèse bibliographique

<p>Les coumarines</p> 	<p>Umbelliférol Aesculol scopolétole</p>
---	--

2.3.3. Les tanins

Le terme tanin provient d'une pratique ancienne qui utilisait des extraits de plantes pour « tanner » les peaux d'animaux, autrement dit pour transformer une peau en cuir. Ces extraits contiennent des dérivés phénoliques qui se lient aux protéines et donc les dénaturent (HOPKINS, 2003).

Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins condensés (tanins catéchiques = proanthocyanidols) qui sont des polymères d'unités de flavan-3-ols [(+)-catéchine ou (-)-épicatéchine]; et les tanins hydrolysables. Ces derniers sont des esters d'un sucre (généralement le glucose) ou d'un polyol et d'un acide phénol, pouvant être l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, ou l'acide hexahydroxydiphénique (HHDP) (acide ellagique) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins ellagiques ou ellagitannins (DERBEL et GHEDIRA, 2005).

2.4. Les polyphénols au centre de notre alimentation

Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces. Ainsi la concentration en polyphénols totaux peut varier de 140mg/kg de poids frais (PF) pour la pomme de terre à 5.5 g/kg pour la cerise (SCALBERT et *al*, 2005).

Les teneurs en polyphénols dans les aliments sont affectées par les opérations de fractionnement, raffinage, broyage, fermentation, cuisson, conservation ou maturation qui se traduisent souvent par des réactions d'hydrolyse et d'oxydation des polyphénols (MORAND et MILENKOVIC, 2014). Le tableau IV donne quelques sources alimentaires de certains groupes de polyphénols.

Tableaux IV : Tableau récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols (KEBBAB, 2014).

Classe de polyphénols	Source alimentaire
Les flavones	persil, céleri, le poivron rouge, les céréales comme le mil ou le blé, la peau des agrumes et les huiles essentielles (huiles essentielle de mandarine)
Les flavonols	Le poireau, le vin rouge, l'oignon, le chou frisé, le thé noir et le thé vert.
Les flavanones	Les pamplemousses et les oranges amères La tomate, la menthe, les citrons, les mandarines, les oranges.

Synthèse bibliographique

Isoflavones	Soja (les graines, la farine, le lait de soja)
(épi) cathéchine	Le thé vert, le chocolat, les pêches, les prunes, les fraises, les pommes, les poires, l'abricot et la cerise.
proanthocyanidines	les fruits rouges : fraise, cerise et les myrtilles, les baies : le cassis ou les mures les vins
Les lignanes	Graine de lin, céréales, ail, asperges, carottes, les lentilles, les poires et les prunes.
Chalcones dihydrochalcones	La tomate et la pomme
Les stilbènes	Les cacahuètes, les épinards, le raisin et le vin rouge, arachides.

2.5. Les propriétés chimiques des polyphénols

Les propriétés chimiques des polyphénols sont essentiellement liées à celles des noyaux phénoliques, particulièrement des substituants à effet mésomère attracteur d'électrons (- M) et substituants à effet mésomère donneur (+M). La conjugaison d'une des deux paires libres de l'atome oxygène avec le cycle traduit l'effet (+M) du groupe OH. Ce phénomène augmente la délocalisation électronique et produit une charge négative partielle sur les atomes C2, C4, C6 (figure 5).

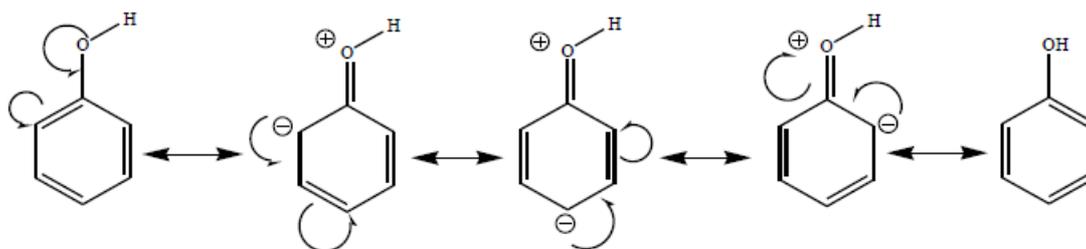


Figure 5: Formes mésomères du phénol

De ces caractères de base découlent les différentes propriétés physico-chimiques dont les **propriétés réductrices** : Le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule est l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. Dans le cas d'un phénol ArOH, le radical-cation formé est un acide fort qui se déprotone aussitôt pour conduire à un radical phénoxy ou aryloxy ArO (DANGLES, 2006).

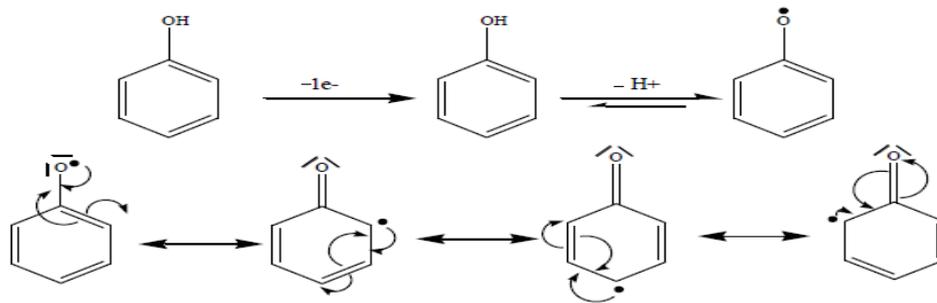


Figure 6: Oxydation mono-électronique d'un phénol et formes mésomères du radical aryloxy formé.

Le radical aryloxy (ArO) peut être formé directement par transfert d'hydrogène phénolique (figure 6) vers un radical de haute énergie tel que les radicaux oxyl ($\text{RO}\cdot$) et peroxy ($\text{ROO}\cdot$) formés par exemple au cours de l'autoxydation des lipides. Ces réactions de transfert d'atome H et/ou d'électrons avec conversion d'un radical très réactif en radical aryloxy stabilisé par résonance sont l'un des principaux mécanismes d'actions antioxydantes des phénols. La capacité du phénol à céder un atome H peut être quantifiée par l'énergie de dissociation homolytique de la liaison OH (*bond dissociation energy*, *BDE*). Plus la BDE d'un phénol est faible, plus fort est son caractère donneur d'hydrogène (DANGLES, 2006).

2.6. Intérêts thérapeutiques des polyphénols

De nos jours, les propriétés des polyphénols sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-cancer (figure 7). Ils ont également des actions positives sur l'obésité, le diabète, les pathologies cardiovasculaires, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

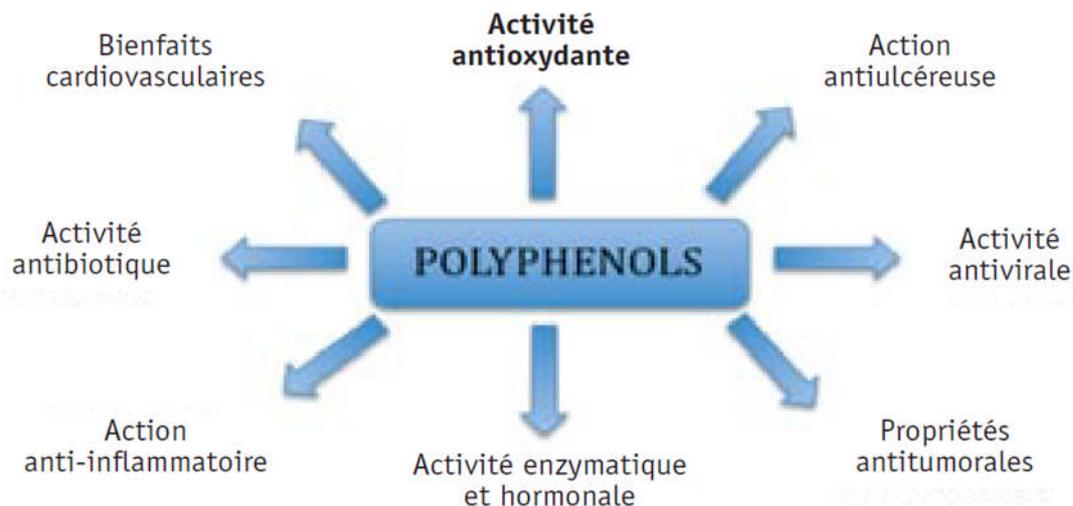


Figure 7 : Effets biologiques des polyphénols.

2.6.1. Polyphénols et cancer

Un certain nombre de recherches menées *in vitro* et *in vivo* ont montré que les polyphénols pourraient être utilisés comme des agents de prévention des différentes maladies

Synthèse bibliographique

cancéreuses (STAGOS *et al*, 2012). De nombreuses études ont montré que l'huile d'argan pourrait grâce à sa teneur en polyphénols, contribuer à la prévention de certains cancers tels que le cancer de la prostate (BENNANI *et al*, 2009). Des recherches plus récentes ont décrit les activités de la curcumine, le resvératrol et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) pour le traitement du cancer du col de l'utérus (DI DOMENICO *et al*, 2012). Les polyphénols du thé de type flavan-3-ol ont la capacité d'interrompre ou inverser le processus de cancérogenèse en agissant sur les molécules de réseau de signalisation intracellulaires impliquées dans l'initiation et / ou la promotion d'un cancer. Les polyphénols peuvent également déclencher l'apoptose dans les cellules cancéreuses à travers la modulation d'un certain nombre d'éléments principaux en signal cellulaire (LINK *et al*, 2010).

2.6.2. Polyphénols et maladies cardiovasculaires

Diverses études épidémiologiques ont montré qu'il existe une corrélation inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et le risque de développement des maladies cardiovasculaires. En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaque et vasculaire. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués). Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (AKROUM, 2007).

2.6.3. Polyphénols et inflammation

L'inflammation est la réponse principale de l'organisme à une agression et est précisément régulée afin de limiter les atteintes possibles des structures de l'organisme. Cependant, une régulation inappropriée de ce phénomène peut conduire à un état inflammatoire chronique. La plupart des pathologies chroniques possèdent une composante inflammatoire. C'est le cas de l'obésité, du diabète de type II, des maladies cardiovasculaires et du cancer. Les différentes études menées sur les effets protecteurs des polyphénols dans ces contextes pathologiques ont montré que ceux-ci diminuaient les marqueurs de l'inflammation et agissaient sur de nombreuses cibles moléculaires au centre des voies de signalisation de l'inflammation. De nombreuses études ont pu montrer que les polyphénols et leurs métabolites agissaient également comme des modulateurs des voies de signalisation de l'inflammation. Les études menées chez l'homme sain ont montré que le suivi d'un régime riche en fruits et légumes était inversement corrélé aux marqueurs de l'inflammation dans le plasma, et que la consommation d'anthocyanes était associée à la diminution du taux de cytokines circulantes (LENOIR, 2011).

2.6.4. Polyphénols et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer représentent un problème croissant lié aux pathologies du vieillissement cérébral, principalement car il y a une augmentation de la prévalence de la maladie d'Alzheimer à la fois et la maladie de Parkinson avec l'âge. Ceux-ci et d'autres maladies neurodégénératives semblent être déclenchées par des événements multi-factoriels dont la neuro-inflammation, une augmentation du stress oxydatif, de fer et / ou une déplétion des antioxydants endogènes. Par ailleurs, l'apport alimentaire régulier d'aliments riches en flavonoïdes et / ou de boissons a été associée à une réduction de 50% du risque de démence, une préservation des performances cognitives avec l'âge, un retard dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer et une réduction du risque de développer la maladie de Parkinson. (VAUZOUR *et al*, 2010).

Synthèse bibliographique

De nombreuses études d'intervention alimentaire menées chez l'homme ou chez l'animal avec des aliments ou boissons issus du raisin, du thé ou de baies comme les myrtilles ont montré une amélioration de la mémoire et de la cognition. Il semblerait cependant que les seules propriétés antioxydantes des flavonoïdes contenus dans ces aliments ne soient pas suffisantes pour expliquer leurs effets bénéfiques au niveau cérébral, d'autant que la concentration de composés retrouvés à ce niveau est relativement faible (SPENCER, 2008a). Il a ainsi été suggéré que les polyphénols puissent agir en protégeant les neurones vulnérables, en stimulant le fonctionnement neuronal et le flux sanguin ainsi qu'en favorisant la neurogenèse (LENOIR, 2011).

2.7. Biodisponibilité des polyphénols

Les effets sur la santé des polyphénols ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité dans le plasma sanguin (EDEAS, 2007) (figure 8). Il y'a eu des avancées ces dernières années concernant l'absorption et le métabolisme des polyphénols, et il est évidant que la plupart des classes en sont absorbées suffisamment pour offrir des possibilités intéressantes d'exercer des effets biologiques.

La plupart des polyphénols sont présents dans les aliments sous forme d'esters, glycosides ou des polymères qui ne peuvent souvent pas être absorbés sous tels quels. Pour être absorbés, ces composés doivent être hydrolysés en aglycones par la microflore (MANACH et al, 2006).

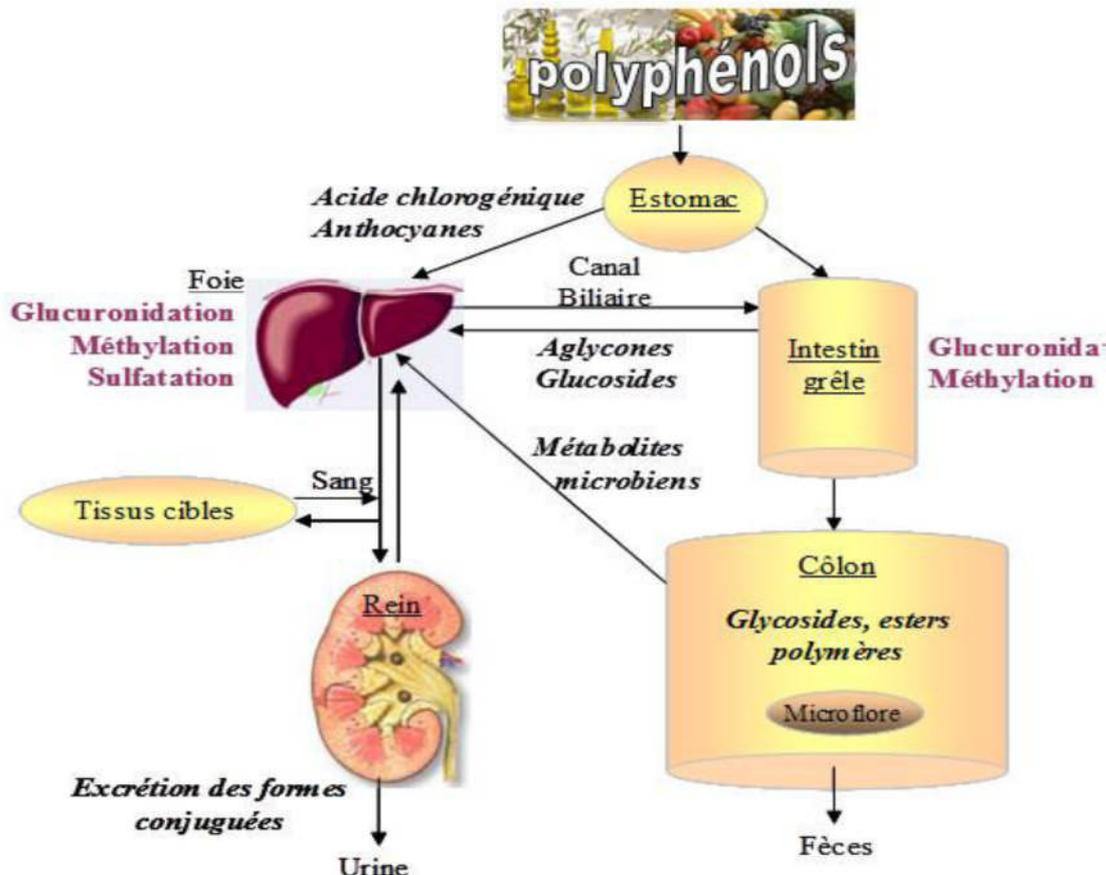


Figure 8 : Schéma général de la biodisponibilité des polyphénols (MANACH et al, 2006 ; SPENCER et al, 2004).

2.7.1. Absorption intestinale et métabolisme

Les flavonoïdes présents dans les aliments sous forme de glucoside résistent habituellement au pH acide de l'estomac. Quelques rares glucosides tels que ceux de la quercétine peuvent être absorbés au niveau de l'intestin grêle, tous les autres ne pourront être absorbés qu'au niveau du colon après hydrolyse en aglycone par les bactéries de la microflore, dans le cas particulier des anthocyanes, l'absorption pourrait se faire au niveau de l'estomac (COLLIN *et al*, 2011). L'action de la microflore sur les aglycones ainsi libérés conduit aussi à la production de divers acides aromatiques simples ce qui limite leur absorption (MANACH *et al*, 2006). Les polyphénols et les métabolites microbiens absorbés subissent trois types de conjugaison dans les entérocytes et dans les hépatocytes: méthylation, glucuronidation et sulfatation, qui sont catalysées par des enzymes. La catéchol-O-méthyl transférase (COMT) catalyse le transfert d'un groupement méthyl depuis la S-adénosyl-méthionine sur les polyphénols portant un groupement catéchol (catéchine, quercétine...) le plus souvent en position 3' du noyau B et minoritairement en position 4'. Cette enzyme est présente dans une large gamme de tissus, mais son activité est la plus élevée dans le foie et les reins (TILGMANN *et al*, 1996; PISKULA *et al*, 1998). La sulfotransférase catalyse le transfert d'un groupement sulfate depuis la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate sur les fonctions hydroxyles de substrats variés dont les polyphénols. Cette réaction de sulfatation se fait principalement dans le foie (FALANY, 1997). L'UDP-glucuronosyltransférase (UDP-GT) est une enzyme liée aux membranes de réticulum endoplasmique. Elle catalyse le transfert d'un acide glucuronique de l'acide UDP-glucuronique vers les polyphénols (SPENCER *et al*, 1999). Dans le plasma, l'albumine est la principale protéine impliquée dans le transport des polyphénols, l'affinité des composés pour cette protéine dépend de leur structure chimique (DANGLES *et al*, 2001). Malgré l'augmentation de l'hydrophilie due à la liaison à l'albumine, l'interaction des polyphénols avec la membrane plasmique se fait via la mise en place de liaisons hydrogènes entre les groupements hydroxyles de la molécule et les têtes polaires des phospholipides à pH physiologiques (VERSTRAETEN *et al*, 2003). Ainsi, il semblerait que les polyphénols conservent, malgré leur liaison à l'albumine, leur capacité de liaison aux cellules. Les polyphénols ingérés peuvent pénétrer dans les tissus et organes, en particulier au niveau des lieux de métabolisation comme l'intestin et le foie.

2.7.2. Elimination

Les polyphénols sont principalement excrétés par les voies biliaire et urinaire. L'implication de chacune de ces voies dépend principalement de la structure des molécules. Ainsi, les métabolites hautement conjugués seront principalement éliminés dans la bile tandis que les petits conjugués comme les monosulfates seront préférentiellement éliminés par voie urinaire (CRESPY *et al*, 2003). Les métabolites sont déversés via la bile dans le duodénum et peuvent ensuite être hydrolysés par les β -glucuronidases de la flore colique libérant ainsi les formes aglycones qui peuvent être réabsorbées au niveau de la muqueuse colique établissant ainsi un cycle entéro hépatique (MANACH *et al*, 2004). La quantité de métabolites excrétés dans les urines est corrélée à la concentration plasmatique maximale des polyphénols. L'excrétion urinaire varie d'une molécule à l'autre et peut aller de 0,3 à 43 % de la dose ingérée (pour 50 mg d'aglycone). Cette excrétion est faible pour les anthocyanes, les flavanols et les flavonols et particulièrement élevée pour les acides phénoliques et les isoflavones (MANACH *et al*, 2005; GALVONO *et al*, 2007).

Chapitre 2

Obésité

II. Obésité

2. 1. Introduction

Au cours des dernières décennies, l'incidence de l'obésité a dramatiquement augmenté au point de devenir une véritable épidémie mondiale (ANDERSEN, 2000). Elle touche la majorité des nations, peu importe leur niveau de développement (OMS, 2003). L'Algérie n'est pas épargnée par ce fléau des temps modernes. Selon les statistiques sanitaires mondiales 2012, 24.3% des femmes algériennes âgées de 20 ans et plus sont obèses contre 10.4% d'hommes algériens obèses (OMS, 2013). L'obésité est due à un état de dérégulation des réserves énergétiques par des facteurs externes (mode de vie, environnement) et/ou internes (psychologiques ou biologiques en particulier génétiques et neuro-hormonaux) (BASDEVANT et GUY-GRAND, 2004). L'obésité est en grande partie due à l'occidentalisation de l'alimentation (FRANCIS *et al*, 2009). Des données expérimentales et épidémiologiques suggèrent qu'une alimentation riche en graisse favorise le développement de l'obésité et qu'il existe une corrélation directe entre la ration lipidique et le degré d'obésité (AILHAUD, 2008). Généralement, l'obésité induit une augmentation du stress oxydant qui joue un rôle important dans le développement de plusieurs maladies telles que l'hypertension artérielle, au diabète, l'insuffisance coronaire, l'athérosclérose, l'inflammation ...ect. (LAMAS *et al*, 2004 ; REAVEN, 2005).

2.2. Définition

L'obésité est généralement définie comme une accumulation excessive ou anormale de graisse dans le tissu adipeux (FERRO-LUZZI *et al*, 1995). La cause sous-jacente est liée à une balance énergétique positive (une régulation anormale de la balance énergétique et/ou de celle des macronutriments) conduisant au gain de poids. En effet, lorsque les apports énergétiques sont supérieurs aux dépenses, l'excès des calories est stocké sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux (ZIEGLER O *et al*, 2000). Une simple mesure permet de définir si le poids est « idéal » : l'Indice de Masse Corporelle (IMC), qui relie le poids à la taille de l'individu. Il se calcule en divisant le poids corporel (en kg) par la taille (en mètre) au carré (kg/m²) (DESPRES et LEMIEUX, 2006). Chez l'adulte, l'excès de poids se définit par un IMC ≥ 25 kg/m². L'obésité se définit par un IMC ≥ 30 kg/m²; et l'état pré-obèse, par un IMC de 25,0-29,9 kg/m². La surcharge pondérale (ou le surpoids) de l'adulte se définit par un IMC ≥ 25 kg/m², bien que certains auteurs limitent cette notion à un IMC de 25,0-29,9 kg/m² (Tableau V) (BRANCA *et al*, 2007).

Au cours de l'obésité, l'augmentation de la masse adipeuse modifie la production de la plupart des adipokines (facteurs libérés par le tissu adipeux). Certaines adipokines participent favorablement au maintien de l'homéostasie énergétique (adiponectine, leptine...), alors que d'autres ont un effet délétère sur le métabolisme (DRAY *et al*, 2008). La leptine est une hormone peptidique de 16 kDa comportant 167 acides aminés (GAUCHER *et al*, 2003). Libérée par les adipocytes, le gène codant pour la leptine est nommé *ob*, il est situé sur le chromosome 7 humain. La leptine régule le poids corporel en diminuant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques (FRIEDMAN et HALAAS, 1998).

Synthèse bibliographique

Tableau V : Classification du risque pour la santé en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) chez l'homme (WHO, 2000).

Classification	Catégorie de l'IMC (kg/m ²)	Risque pour la santé (comparativement à un « poids normal »)
Poids insuffisant	< 18.5	Accru
Poids normal	18.5-24.9	Moindre
Surpoids	25.0 - 29.9	Accru
Obésité, classe I	30.0 - 34.9	Élevé
Obésité, classe II	35.0 - 39.9	Très élevé
Obésité, classe III	>40.0	Extrêmement élevé

2.3. Facteurs responsables de l'obésité

La physiopathologie de l'obésité relève des causes multifactorielles, elle est déterminée par les interactions des facteurs de prédisposition génétiques et environnementaux (LUBRANO-BERTHELIER et CLEMEN, 2005). HOFBAUER (2002) rapporte que ce sont les mauvaises habitudes alimentaires et la sédentarité qui semblent avoir joué le rôle le plus déterminant dans la récente épidémie mondiale d'obésité.

➤ Facteurs environnementaux

Les modifications des habitudes de vie liées aux changements de l'environnement contribuent à modifier l'équilibre énergétique au profit de l'augmentation des réserves énergétiques et du poids (BOUNAUD et MOREAU, 2014). Pour étudier l'effet des facteurs nutritionnels, plusieurs types de régimes expérimentaux ont été décrits chez les animaux. Y compris, le régime hypergras (high-fat diet : HFD), qui induit l'obésité nutritionnelle et accumulation de graisse dans le corps avec une hypercholestérolémie chez les rats Wistar (MAN et HE, 2009). D'après LAISSOUF *et al*, (2014), l'obésité nutritionnelle est induite aussi par le régime cafeteria, qui est un régime, hypercalorique et hyper lipidique, il induit une hyperphagie suivie d'une obésité dont l'installation est rapide chez le rat Wistar. De plus, les rats soumis au régime cafeteria présentent des anomalies métaboliques et un stress oxydatif évident (BOUANANE *et al*, 2009).

L'homme évolue dans un écosystème pollué par des substances dites obésogènes, les études épidémiologiques montrent le lien entre l'exposition aux polluants et IMC ou d'autres perturbations du tissu adipeux blanc (TAB). Un certain nombre de pesticides mais également les phtalates présents dans les matières plastiques des contenants alimentaires sont des perturbateurs endocriniens qui s'accumulent dans le tissu adipeux (TA) au fil du temps. Les études *in vivo* et *in vitro* démontrent que ces perturbateurs endocriniens ont un impact sur le métabolisme glucido-lipidique (JOFFIN, 2015).

➤ Facteurs génétiques

Lors de la découverte du gène de la leptine dans les années 1990, l'hypothèse d'une origine génétique de l'obésité a été largement développée. Une mutation sur le gène de la leptine ou sur celui de son récepteur provoque en effet chez les souris porteuses de ces mutations une obésité constitutive. Chez l'Homme, il est apparu que ces mutations conduisant à une obésité sévère ne concernaient qu'un très faible nombre de famille : seulement 3 mutations, touchant une dizaine de personnes, sont connues pour être impliquées dans une prise de poids excessive (MAZEN *et al*, 2009). D'autres gènes impliqués dans des formes monogéniques d'obésité ont également été découvertes : des mutations sur les gènes codant la

Synthèse bibliographique

pro hormone convertase (impliquée dans la conversion de la pro insuline en insuline) ou la pro opiomélanocortine (POMC) conduisent ainsi à une prise alimentaire excessive. La protéine POMC est le précurseur de l' α -melanocyte stimulating hormone, un neuropeptide réduisant la prise alimentaire en agissant sur les récepteurs à la mélanocortine 3 et 4 (MC3R et MC4R) présents dans l'hypothalamus. Les mutations sur le gène codant le récepteur MC4R représentent quant à elles une forme plus fréquente d'obésité monogénique, puisqu'elles concerneraient 1 à 6 % des individus obèses (BELL *et al*, 2005). Enfin, quelques cas d'obésité dus à une mutation sur le gène du récepteur à la cholécystokinine, impliqué dans le signal de satiété, ont également été décrits (PANCHAL *et al*, 2011). Cependant, même si les preuves d'une forte influence de la génétique sont nombreuses, la mise en évidence des facteurs génétiques impliqués dans une maladie multifactorielle telle que l'obésité reste difficile.

2.4. Épidémiologie

L'augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité est un problème de santé mondiale. En effet, 3,4 millions meurent chaque année à cause de leurs surpoids ou obésité (ANONYME 2). Une analyse des études épidémiologiques de 183 pays a permis d'estimer à 2,1 milliards le nombre d'adultes en surpoids et obèses dans le monde, soit une augmentation de 27,5% de la prévalence entre 1980 et 2013 (ANONYME 3). Une étude des Centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC : Centers for Disease Control and Prevention a estimé que la proportion d'obèses pourrait atteindre 42% d'ici 2030, soit une augmentation de 33% de la prévalence (FINKELSTEIN *et al*, 2012)

2.5. Maladies associées à l'obésité

Il y a plusieurs problèmes sanitaires associés à l'obésité comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et l'hypertension, les maladies respiratoires (le syndrome d'apnée du sommeil), Certains cancers et l'ostéo-arthrite (LEAN, 2000).

2.5.1. Hypertension artérielle (HTA)

La progression de l'obésité dans le monde est en grande partie responsable de l'hypertension artérielle (HTA) plus fréquemment associée à cette condition (PATHAK *et al*, 2007). Le risque d'HTA est plus de 5 fois supérieure chez les sujets obèses que chez ceux ayant un poids normal (WOLF *et al*, 1997). Les mécanismes responsables de cette hypertension artérielle sont multiples mais tous concourent à augmenter soit les résistances vasculaires périphériques, soit directement le débit cardiaque (PATHAK *et al*, 2007), car une augmentation du volume sanguin associée à l'augmentation de la masse corporelle, est en réponse à l'augmentation de la viscosité sanguine. Cette dernière est elle-même due à la libération de profibrinogène et d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène par les adipocytes (SKURK et HAUNER, 2004). La découverte des capacités sécrétoires de l'adipocyte souligne le rôle actif du tissu adipeux viscéral dans la genèse de l'HTA. La leptine mais également l'adiponectine jouent un rôle dans ce sens.

2.5.2. Diabète sucré

Le diabète de type 2 (DT2) (qui se développe habituellement à l'âge adulte) ou diabète non insulino-dépendant, est celui qui a les liens les plus étroits avec l'obésité et la surcharge pondérale. En effet, le risque de contracter un diabète de type 2 s'élève avec l'IMC, déjà bien en dessous des valeurs correspondant à l'obésité (IMC de 30) (PARILLO, 2004). En effet, GUILHERME *et al*, (2008), rapportent que l'insulinorésistance dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le foie précède le développement du DT2. Ainsi, l'apparition de l'insulinorésistance et de DT2 est quasiment sûre lorsque l'IMC est $> 40 \text{ kg/m}^2$ (ANDERSON *et al*, 2003).

2.6. Physiopathologie de l'obésité

La gestion de la quantité d'énergie que nous ingérons implique plusieurs mécanismes et des réseaux qui relient le cerveau à l'intestin, ce processus étant la clé de la régulation du poids corporel au cours du temps, ainsi que la modification des comportements alimentaires à long terme. L'obésité est caractérisée par une augmentation du tissu adipeux sous-cutané. Ses conséquences métaboliques, telles que la résistance à l'insuline, sont principalement dues à une augmentation des dépôts de graisse sur des sites tels que le foie et les muscles squelettiques (KLEIN, 2010).

D'un point de vue pratique, il n'y a que deux façons de contrôler le poids d'un individu : l'apport alimentaire et la quantité d'activité physique. Du point de vue de la thermodynamique, les changements de poids sont la résultante de la balance énergétique : le gain de poids se produit lorsque l'apport énergétique est supérieur à la dépense énergétique, et la perte de poids se produit lorsque la dépense d'énergie est supérieure à l'apport énergétique. L'énergie est dépensée par trois voies principales :

1) le taux métabolique au repos (RMR : the Resting Metabolic Rate), qui est l'énergie dépensée pour exercer des fonctions corporelles au repos, incluant la réparation et la maintenance des cellules et des tissus, le maintien de la fréquence cardiaque, une température constante du corps, et d'autres processus physiologiques nécessaires au maintien d'un milieu environnemental et hormonal interne constant.

2) l'effet thermique des aliments, ce qui correspond à l'excès de chaleur générée quand la nourriture est consommée, digérée et absorbée,

3) l'activité physique, qui est variable et la seule composante de la dépense énergétique qui est soumise à un contrôle volontaire (LOWELL, 1993).

La composante la plus importante de la dépense d'énergie est le RMR, qui représente généralement 60-70% de la dépense énergétique quotidienne totale (TEE : the Total Energy Expenditure) (RAVUSSIN *et al*, 1986). L'effet thermique des aliments représente environ 10 % de la TEE. La dépense énergétique liée à l'activité physique dépend de la quantité et de la nature de l'activité physique. Chez une personne très active, l'énergie dépensée par l'activité physique peut atteindre 40 % de la TEE, mais elle peut être à seulement 10 % de la TEE chez un individu sédentaire.

On sait aujourd'hui que l'un des composants clé qui contrôle la balance énergétique est l'hypothalamus. Cette découverte date de la fin du 19e siècle avec la description du syndrome de Fröhlich caractérisé par des tumeurs pituitaires associées à un hypogonadisme et une accumulation sous-cutanée excessive de graisse (ANONYME 4; ANONYME 5). Toutefois, on ne savait pas si ce syndrome était dû à la glande pituitaire ou à cause de dommages sur l'hypothalamus. Plus tard, HETHERINGTON et RANSON (1940) démontrèrent chez le rat que la destruction de l'hypothalamus médial sans dommage de la glande pituitaire causait une obésité morbide et des dérèglements neuroendocrines similaires à ceux du syndrome de Fröhlich. Si le rôle de l'hypothalamus était alors bien établi, on ne connaissait pas les mécanismes moléculaires sous-jacents qui impliquaient un dialogue avec le tissu adipeux. Il faut attendre 1950 pour découvrir des mutations récessives *ob* et *db* qui rendent les souris hyperphagiques et obèses morbides (INGALLS *et al*, 1950). Les gènes *ob* et *db* ont été clonés vers le milieu des années 90 (LEE *et al*, 1992). L'hormone issue du gène *ob* a été appelée leptine, qui vient du grec *leptos* signifiant mince, car son injection conduit la souris à un état cachectique (amaigrissement extrême) (CAMPFIELD, 1995). De la même façon, le clonage du gène agouti issu des souris jaune agouti a conduit à la caractérisation du système de la mélanocortine centrale (HUSZAR *et al*, 1997).

L'obésité survient à la suite d'un déséquilibre entre l'apport et la dépense énergétique régulés par un axe composé du cerveau, des intestins et du tissu adipeux (figure 9). De nombreuses informations sont déjà disponibles concernant les gènes, les peptides, les

Synthèse bibliographique

neurotransmetteurs et les récepteurs dans l'hypothalamus et les régions voisines qui régulent l'appétit et le poids corporel. Le neuropeptide principal qui augmente l'appétit est le neuropeptide Y (NPY). Les autres neuropeptides augmentant l'appétit sont l'orexine A et B, l'agouti related peptide (AgRP) et l'hormone qui concentre la mélanine (MCH). Les neuropeptides qui diminuent l'appétit sont les dérivées de la pro-opiomélanocortine (POMC) qui agissent sur le récepteur MC4, le peptide CART, la corticolibérine (CRH), le prolactin releasing peptide (PrRP), la mélanocortine alpha (α -MSH), la sérotonine (5HT) et le récepteur à la leptine (LEPR).

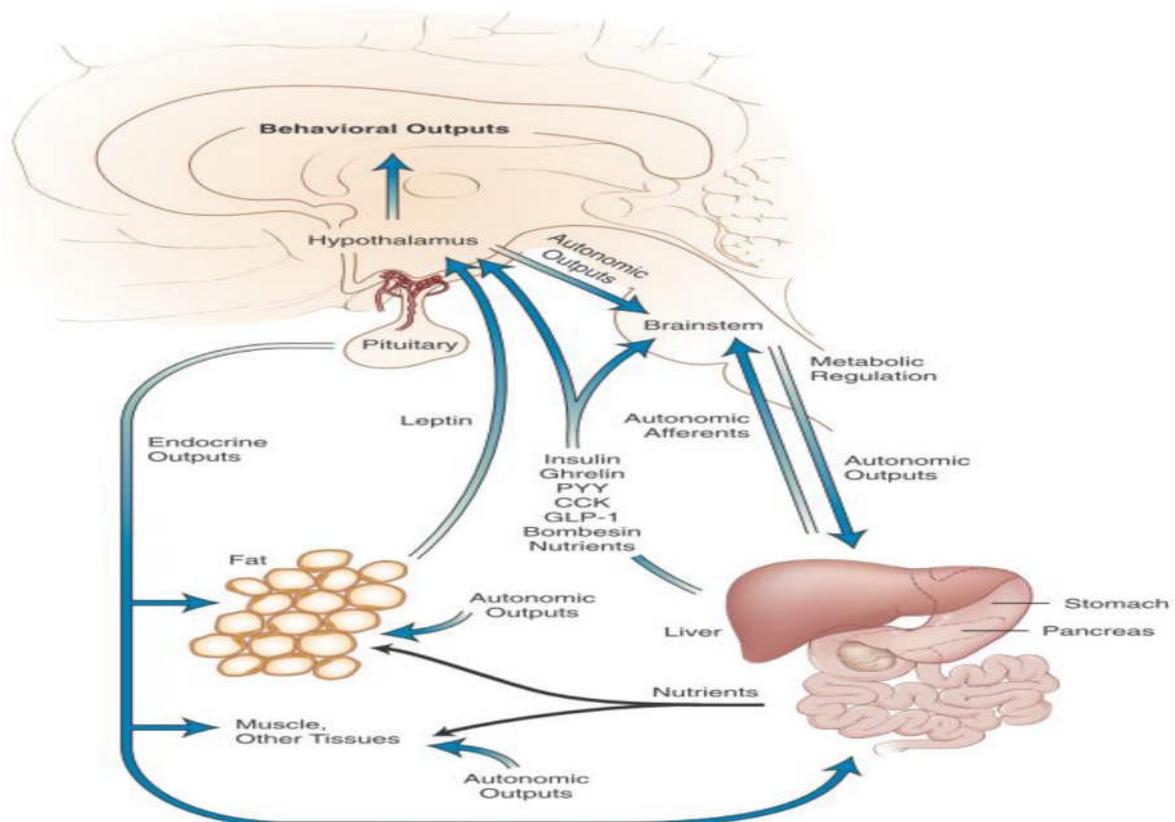


Figure 9 : Régulation de la balance énergétique (MELMED *et al*, 2012).

Il y a 4 hypothèses principales concernant les mécanismes afférents impliqués dans la régulation de l'appétit.

Selon l'hypothèse lipostatique, le tissu adipeux produit un signal hormonal qui est proportionnel à la quantité de graisse et qui agit sur l'hypothalamus pour diminuer la prise alimentaire et augmenter la dépense énergétique (KENNEDY, 1953). Cette hypothèse est appuyée par le fait que le tissu adipeux blanc libère la leptine et la résistine qui diminuent l'appétit. La condition inflammatoire de l'organisme due à l'obésité serait aussi liée à cette hypothèse. Par exemple, la libération d'adiponectine et d'adipocytokines tels que le facteur de nécrose tumorale et l'interleukine-6 augmentent aussi l'appétit. Le tissu adipeux brun libère également le PPAR- γ (récepteur nucléaire de l'adipogenèse) et la thermogénine (UCP-1, protéine de découplage mitochondriale) qui induisent une augmentation du métabolisme et donc de la réduction du poids.

L'hypothèse gastro-intestinal met en jeu certaines hormones du système digestif comme la bombésine (GRP : gastro releasing peptide) sécrétée par l'estomac. On peut également citer le glucagon et la somatostatine sécrétés par le pancréas qui diminuent l'appétit

Synthèse bibliographique

et contrôlent le poids, les peptides CCK (cholécystokinine) et le PYY sécrétés par l'intestin et le colon qui sont aussi responsables de la régulation de l'appétit et du poids (MELMED *et al*, 2012). L'implication de la flore intestinale, près de 2000 espèces de bactéries vivent dans le tractus digestif de l'être humain, soient environ 10^{12} à 10^{14} bactéries qui composent la flore intestinale. Des études récentes montrent l'implication que pourrait avoir la flore intestinale dans le développement de l'obésité. La fermentation bactérienne modifie le rendement énergétique des aliments, puisqu'elle permet la décomposition des glucides non digestibles et des fibres alimentaires en gaz et en acides carboxyliques à chaîne courte absorbables par les muqueuses. Les souris axéniques (exemptes de germes) sont protégées de l'obésité par rapport aux souris colonisées avec une flore intestinale à la naissance (BACKHED, 2004).

L'hypothèse glucostatique concernant la notion de détection du glucose dans le cerveau a été mise en lumière avec la découverte des neurones sensibles au glucose dans l'hypothalamus, y compris les neurones exprimant le NPY et la POMC dans le noyau arqué, qui sont également sensibles à la leptine, à l'insuline et à d'autres neuropeptides (MARTY *et al*, 2007). Il a été émis l'hypothèse que le glucose, l'insuline et la leptine agissent dans ces neurones par l'intermédiaire de la glucokinase et de la PI3-kinase afin de stimuler le métabolisme du glucose intracellulaire, qui fournit de l'ATP et à son tour réduit l'activité de l'AMPK et la prise alimentaire (LEVIN *et al*, 2006).

L'hypothèse thermostatique postule que la chute de la température corporelle en dessous d'un certain point stimule l'appétit et au-dessus de ce même point l'inhibe (BROBECK, 1948) Cette hypothèse en l'état est abandonnée.

2.7. Traitements

Notre connaissance des mécanismes moléculaires participant au maintien de l'équilibre énergétique s'enrichit d'une année en année, offrant un nombre croissant de cibles thérapeutiques potentiellement intéressantes pour le traitement de l'obésité.

2.7.1. L'approche comportementale

Que ce soit pour la perte de poids ou pour prévenir le gain de poids ou son regain, la thérapie comportementale est une approche primaire d'intervention de l'obésité. En effet, le National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) recommande comme premier traitement de l'obésité un programme composé de régime alimentaire, d'exercice et de thérapie comportementale (ANONYME 6).

Le traitement comportemental est un ensemble de plusieurs composantes destiné à faciliter les changements d'alimentation et d'activité physique. Ces procédures ont été décrites dans les manuels de traitement détaillés, tels que le programme pour la gestion du poids LEARN (ANONYME 7) et le programme de prévention du diabète DPP (ANONYME 8) Les composantes de ce traitement sont l'auto surveillance (apport alimentaire, activité physique et suivi du poids), le contrôle du stimulus via le conditionnement classique et opérant (par exemple en dissociant l'action de manger et regarder la télé), la résolution des problèmes (comprendre les chaînes d'évènements qui conduisent à trop manger ou à peu d'activité physique), la restructuration cognitive (éviter les baisses de moral dues à un seul excès alimentaire), et la prévention des rechutes (anticiper les périodes à risque telles que les vacances ou au contraire les périodes de stress au travail).

D'une façon générale, les patients ayant reçu la thérapie comportementale ont perdu en moyenne environ 10% de leur poids initial (l'équivalent de 10 kg) avec en moyenne 30 semaines de traitement.

2.7.2. La chirurgie bariatrique

Une modification du mode de vie sous la forme d'un régime hypocalorique peut être très efficace pour la perte de poids, mais 80-90% de la population ne parvient pas à maintenir

Synthèse bibliographique

la perte de poids à long terme en raison de processus de compensation (MACLEAN *et al*, 2011). La chirurgie bariatrique (diminution de la taille de l'estomac) reste le traitement le plus efficace pour la perte de poids et son maintien à long terme chez les obèses morbides.

2.7.3. Pharmacothérapie

Compte tenu de l'échec de l'approche comportementale et les limites de la chirurgie bariatrique, l'utilisation de médicaments anti-obésité comme traitement d'appoint dans le traitement de l'obésité reste essentielle. L'objectif est de développer un schéma thérapeutique sûr et efficace, en combinaison avec une meilleure alimentation et de l'exercice, pour atteindre une réduction significative et durable du poids corporel et de profiter des avantages qui en découlent. Un médicament pour la perte de poids doit être compatible avec le profil d'un patient obèse pour être vraiment significatif en termes d'efficacité, de sécurité et de durabilité. En effet, la population obèse est très hétérogène, avec des variations de degré et de durée de la surcharge pondérale, d'âge et des co morbidités associées.

Aujourd'hui, un seul médicament, l'orlistat, a été approuvé par l'agence Américaine des médicaments et des produits alimentaires (FDA) (Food and Drug Administration) et l'Agence européenne des médicaments (EMA) pour la gestion du poids. L'orlistat inhibe les lipases gastro-intestinales, réduisant l'absorption des graisses. Malgré son statut approuvé, l'orlistat a eu un certain nombre d'effets indésirables, incluant l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité, la pancréatite, et apparition des calculs rénaux (KIM *et al*, 2013).

Une variété de produits naturels, y compris des extraits bruts et les composés isolés à partir de plantes, peuvent réduire le poids corporel et prévenir l'obésité induite par l'alimentation. Ces dernières années, de nombreuses études ont mis l'accent sur la biodisponibilité des composés phénoliques dans la prévention et le traitement de l'obésité.

Chapitre 3
Effets des polyphénols
sur l'obésité

III. Effets des polyphénols sur l'obésité

La plupart des études effectuées sur des lignées cellulaires murines telles que 3T3-L1 et dans les tissus des animaux de laboratoire montrent que les polyphénols peuvent induire une lipolyse, la réduction de la masse de tissu adipeux en inhibant la prolifération des adipocytes et même induire leur apoptose, ainsi que l'inhibition de l'absorption des triglycérides alimentaires par inhibition de la lipase pancréatique. Ces mécanismes indiquent des propriétés anti-obésité potentiels qui se prêtent à des tests dans les études cliniques humaines (WILLIAMS et *al*, 2013).

3.1. Effets des polyphénols sur la lipase pancréatique

La lipase est l'enzyme la plus importante pour la digestion efficace des triglycérides. Des études montrent que les polyphénols peuvent inhiber la lipase pancréatique (LP) ce qui influence sur la digestion et l'apport énergétique des graisses (figure 10) (SHI et *al*, 2014).

Ainsi, les flavonoïdes ont la capacité de diminuer l'absorption des lipides en inhibant l'activité de la lipase pancréatique. Ils peuvent agir directement sur le site de l'enzyme active ou, indirectement, par l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques (triglycérides), ce qui réduit l'accessibilité du substrat à l'enzyme. Les flavonols du thé vert ainsi que les tannins condensés ou hydrolysables sont des inhibiteurs de la lipase pancréatique, voire même de la lipase gastrique. Cet effet est susceptible de limiter l'absorption intestinale des triglycérides et de contribuer ainsi à la baisse de la lipémie postprandiale. L'inhibition des protéases digestives par les proanthocyanidines peut être considérée comme un effet antinutritionnel mais aussi comme favorisant la prolongation de l'état de satiété (ralentissement de la digestion), contribuant ainsi à la diminution de la prise alimentaire et par là même à la lutte contre l'obésité (FARDET et *al*, 2013).

Les proanthocyanidines oligomériques de la pomme se sont révélés être les principaux composants actifs responsables de l'inhibition de la lipase pancréatique *in vitro* et pour la prévention de l'absorption des triglycérides chez les êtres humains et dans des modèles de souris (SUGIYAMA et *al*, 2007).

Il semble également probable que les composantes des proanthocyanidines présentes dans les extraits d'airelle sont responsables de l'inhibition de la lipase (MCDUGALL et *al*, 2009).

MOHAMED, (2014) rapporte aussi que l'extrait de grenade (ellagique et acides tanniques) et les polyphénols (théaflavines, théaflavine 3-O-gallate de théaflavine 3'-O-gallate de théaflavine 3,3'-O-gallate, épigallocatechine gallate, le gallate d'épicatéchine, la catéchine, 2 glycosides de quercétine, de l'acide quinique, l'acide gallique et de la caféine) du thé noir (*Camellia sinensis*) inhibe la lipase pancréatique.

Synthèse bibliographique

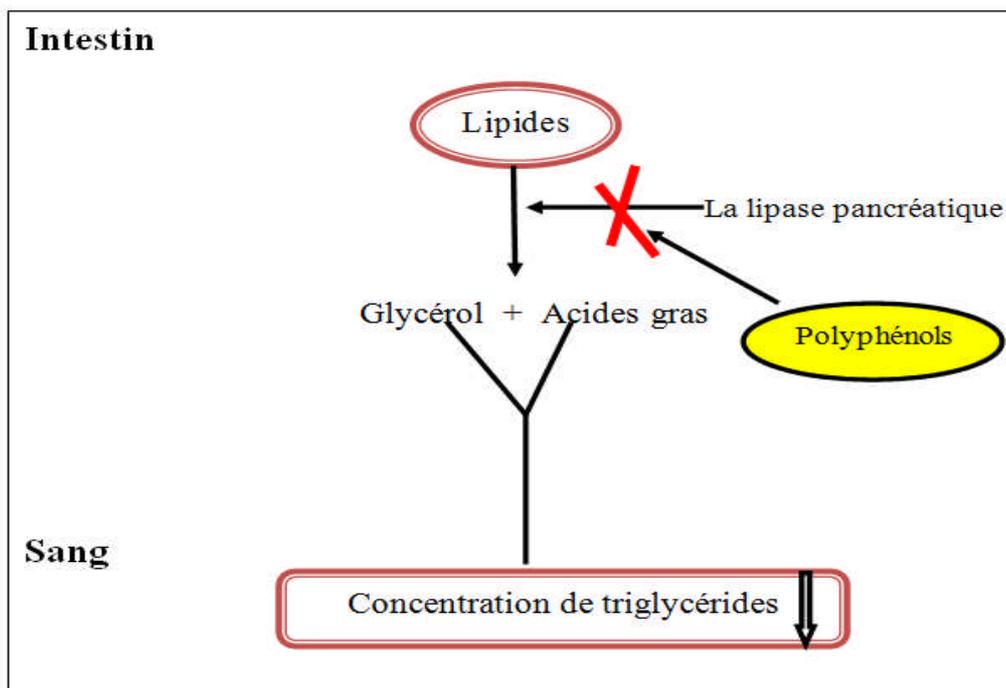


Figure 10 : Effets des polyphénols sur la lipase pancréatique.

Selon RAHUL *et al*, (2007), l'extrait de pépins de raisin (Grape Seed extract (GSE)) qui est riche en composés phénoliques, présente une activité inhibitrice sur la lipase pancréatique, ce qui suggère qu'il peut être utile en tant que traitement pour limiter l'absorption des graisses alimentaires et l'accumulation de graisses dans le tissu adipeux. En outre, l'effet de GSE sur la lipase peut être provoqué par l'action synergique de plusieurs composés dans l'extrait, à savoir, les flavonoïdes, les procyanidines et leurs métabolites anti-oxydants, plutôt que par un seul composé.

Le thé Blend (un mélange de différentes variétés de thé) ou l'extrait de feuilles de *Nelumbo nucifera* (*Nelumbo nucifera* extract (NNE)) a récemment été utilisé pour traiter l'obésité en Chine. Les extraits de ces feuilles inhibent la lipase pancréatique et l'activité inhibitrice a été attribuée à ses composés phénoliques. Aussi, les racines et les tiges de la plante *Salacia reticulata* ont été utilisées en tant que nourriture supplémentaire au Japon pour prévenir l'obésité et le diabète. L'extrait de l'eau chaude de *S. reticulata* (*Salacia reticulata* hot water extract (SRHW)) contient une concentration élevée de polyphénols (24%), la mangiférine, les catéchines et les tannins condensés et ont été considérés comme responsables de l'inhibition de la lipase pancréatiques. L'extrait de la coquille d'arachide contient plusieurs composés phénoliques tels que : lutéoline, les acides féruliques, caféique et l'acide benzoïque, les dérivés de la coumarine, ces derniers possédant une activité inhibitrice de la lipase. Les extraits des feuilles de la mangue et l'écorce de la tige possédaient une variété des polyphénols, tels que les acides phénoliques, les esters phénoliques, flavanes-3-ols et mangiférine. Ces extraits se sont aussi révélés être des inhibiteurs puissants de la lipase.

Différents types de thé (par exemple, le thé vert, oolong, et le thé noir) sont les plus largement étudiés en tant qu'inhibiteurs de lipase. Divers polyphénols (par exemple, la L-épicatéchine, le gallate d'épicatéchine (ECG), épigallocatechine (EGC) et le gallate d'épigallocatechine (EGCG)) ont été isolés à partir de feuilles de thé ont montré une forte

Synthèse bibliographique

activité inhibitrice contre la lipase pancréatique (Figure 11) (MOHAMED *et al*, 2014 ; BALAJI *et al*, 2015).

Selon SERGENT *et al*, (2012) les extraits riches en polyphénols à partir des baies, pommes, et *Gnetum gnemon*, ont été signalés comme inhibiteurs de la lipase pancréatique dans des expériences *in vitro*. Les polyphénols tels que les proanthocyanidines ou ellagitanins, ou stilbénoides (gnetin), ont été considérés comme les principaux ingrédients actifs. Cependant, le mécanisme d'inhibition de ces substances sur la LP reste incertain. Il a été généralement attribué à la capacité des tanins à lier, complexer et précipiter les protéines.

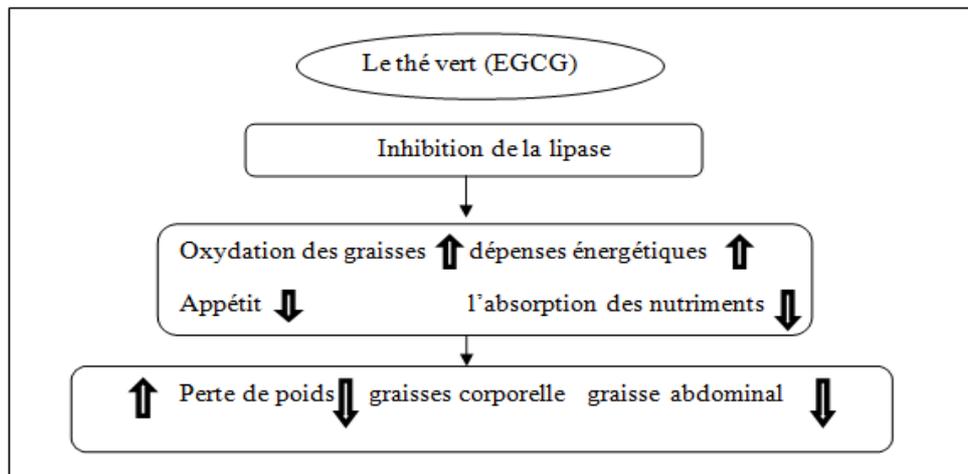


Figure 11: mécanismes anti-obésités proposés du thé vert (MOHAMED *et al*, 2014)

3.2. Effets des polyphénols sur l'adipogenèse

L'obésité peut être due à une augmentation du nombre d'adipocytes dans le tissu adipeux (hyperplasie), ou à une augmentation de la taille des adipocytes (Hypertrophie) ou les deux à la fois. Plusieurs études dans la littérature se sont focalisées sur l'effet potentiel anti-adipocytaire des polyphénols (figure12). La grande majorité de ces études ont été réalisées dans les cellules préadipocytes 3T3-L1, mais d'autres types d'adipocytes (les cellules adipocytes matures 3T3-L1) ont également été utilisés (AGUIRRE *et al*, 2014).

Plusieurs études ont montré que le resvératrol inhibe plutôt que renforce la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1. Ainsi, à 35-50 μ M, qui sont des doses relativement élevées, la différenciation des préadipocytes est inhibée, ce qui diminue la prolifération adipocytaire (WANG *et al*, 2014 ; WANG *et al*, 2015).

En effet, AGUIRRE *et al*, (2014), rapportent que le resvératrol inhibe le C / EBP β , un facteur de la régulation précoce de l'adipogenèse. En outre, l'expression de C / EBP α et PPAR γ , nécessaire pour induire des changements dans la forme des cellules d'un fibroblastique à une forme sphérique, est également réduite par ce polyphénol.

Selon FURUYASHIKI *et al*, (2004), la catéchine supprime le début et le milieu des stades de la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, et cette suppression est due à une baisse de la régulation de PPAR γ 2 et C / EBP α . Cette étude suggère que l'ingestion de thé vert contenant des catéchines peut empêcher l'obésité grâce à la suppression de la

Synthèse bibliographique

différenciation adipocytaire sans risques mortels tels que la cytotoxicité et la réduction de la sensibilité à l'insuline.

D'autre part, DULUC *et al*, (2012) suggèrent que l'EGCG inhibe la différenciation des adipocytes en réduisant l'expression de l'ARNm de PPAR γ , C / EBP α . En outre, la suppression de l'adipogenèse par l'EGCG a été montrée pour être associée à l'activation de l'AMPK.

Une autre étude rapportée par EJAZ *et al*, (2009) suggère que la curcumine alimentaire supprime l'expression des facteurs de la transcription de l'adipogénèse et la lipogenèse PPAR γ et C / EBP α dans le tissu adipeux sous-cutané. Ainsi, elle a contribué à une adiposité plus faible et un gain de poids plus faible chez les souris. En effet, l'inhibition transcriptionnelle des protéines impliquées dans l'adipogenèse pourrait expliquer la réduction du tissu adipeux chez les souris C57/BL recevant du curcumin (LECERF, 2012).

La quercétine a également été démontrée pour supprimer la différenciation adipocytaire par une baisse de la régulation des facteurs PPAR γ , C / EBP α , et l'activation de l'AMPK a également été rapportée. Aussi, la génistéine isoflavone est également apte à inhiber la différenciation des adipocytes par une diminution de l'expression de C / EBP α , C / EBP β et PPAR γ (DULUC *et al*, 2012).

Une étude réalisée par SUZUKI *et al*, (2011) dans des cultures de tissus prélevées sur des souris montre que les polyphénols de myrtille, en particulier les anthocyanes entraînent une suppression dose-dépendante de la différenciation adipocytaire. Ainsi, la teneur en lipides mesurée dans le groupe témoin était significativement supérieure à celles des groupes qui avaient reçus 3 doses de polyphénols de myrtille. La dose la plus élevée aboutit à une diminution de 73% des lipides, la plus faible dose à une diminution de 27%.

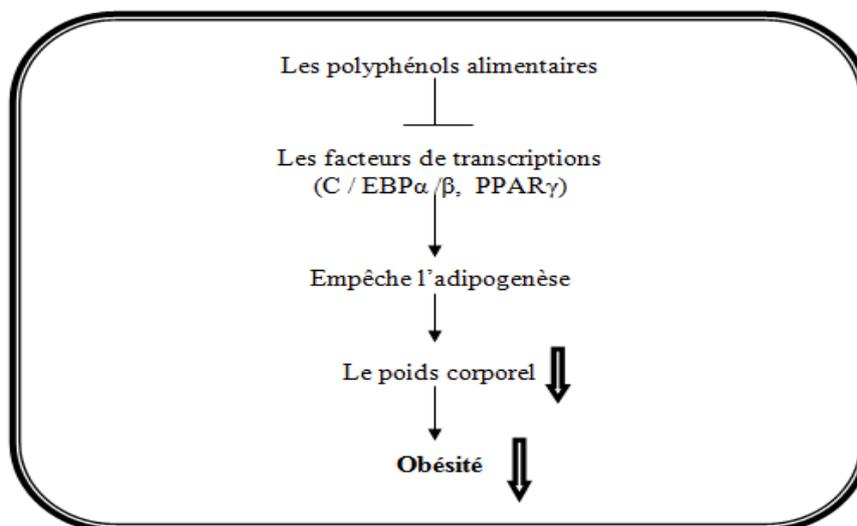


Figure 12: Modèle proposé pour le mécanisme d'inhibition des polyphénols alimentaires sur l'adipogenèse.

Selon CHANG *et al*, (2015), les feuilles de mûrier contiennent plusieurs composés phénoliques majeurs, tels que la quercétine, l'acide caféique, l'hydroxyflavin et l'hésperétine. En outre, ces quatre composés principaux réduisent la différenciation et induisent l'apoptose

Synthèse bibliographique

dans les préadipocytes 3T3-L1. D'autre part, les feuilles de mûrier peuvent être un aliment fonctionnel pour réduire le risque d'obésité et les troubles métaboliques liés à l'obésité (Tableau IV). En effet, leurs polyphénols exercent un effet anti- adipogénique en inhibant l'expression des facteurs de transcription PPAR γ et SREBP-1 et ainsi inhibant leurs cibles FAS et ACC, enzymes intervenant dans la lipogénèse (figure 13)

Une autre étude menée par WILLIAMS *et al*, (2013) a montré un effet anti-adipocytaire de la flavone, la lutéoline par une diminution de l'accumulation des lipides et de l'inhibition de la différenciation, une étude antérieure a montré que l'addition d'une flavone, l'apigénine induit une lipolyse dans des adipocytes de rat.

BABOOTA *et al*, (2013), rapportent qu'un traitement combiné avec la génistéine, la quercétine et le resvératrol a montré une inhibition supérieure de l'adipogénèse dans les adipocytes primaires humains et dans les adipocytes murins 3T3-L1 que les molécules individuelles.

D'autres études montrent que les procyanidines inhibent l'adipogénèse dans les adipocytes, les effets anti-obésité de ces polyphénols pourraient être expliqués par des effets combinés, y compris l'inhibition de l'action de la lipase et d'autres activités (KIMURA *et al*, 2011).

Tableau VI : Effets des composées phénoliques des feuilles de mûrier sur l'obésité (CHANG *et al*, 2015).

Composée phénoliques des feuilles de mûrier	effets
L'acide cafféique	Diminution de poids corporel Favorise la lipolyse hépatique Régulation du métabolisme lipidique Inhibition de la différenciation d'adipocyte
Quercétine	Amélioration des profils lipidiques Diminution de poids corporel Régulation du métabolisme lipidique
Hesperetin	Amélioration des profils lipidiques Diminution de poids corporel Régulation du métabolisme lipidique
Rutine	Régulation du métabolisme lipidique

Synthèse bibliographique

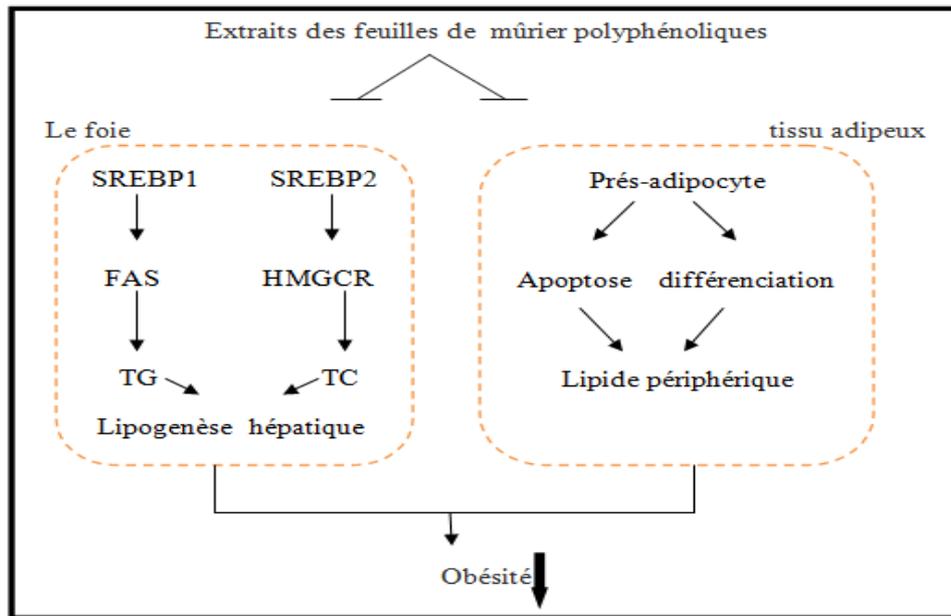


Figure 13 : les mécanismes d'inhibition des polyphénols des feuilles de mûrier sur la différenciation des adipocytes. SREBP1: Sterol regulatory element binding protein1, SREBP2: Sterol regulatory element binding protein2, FAS: Acide gras synthase (fatty acid synthase), HMGCR: Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase, TG: Triglycerides, TC: Cholestérol total (CHANG *et al*, 2015).

3.3. Effets des polyphénols sur l'angiogénèse

La curcumine a la capacité d'inhiber l'angiogénèse dans le tissu adipeux, diminuer la différenciation des pré-adipocytes, et de réduire l'accumulation de lipides dans les adipocytes et le foie. Une étude *in vitro* montre que la supplémentation d'un régime alimentaire très riche en matières grasses avec la curcumine pendant 12 semaines réduit la densité des micro vaisseaux dans le tissu adipeux chez les souris avec la réduction du (VEGF, vascular endothelium growth factor) et (VEGFR2, récepteur), deux facteurs importants dans la progression de l'angiogénèse, donc la curcumine a la capacité de supprimer les facteurs de croissances ce qui contribue au gain inférieur de poids corporel et la diminution de graisse corporelles totales de la souris traitée (EJAZ *et al*, 2009).

3.4. Effets des polyphénols sur l'apoptose

Des études de WILLIAMS *et al*, (2013) se sont intéressées à l'effet inhibiteur des acides phénoliques alimentaires sur les pré-adipocytes chez la souris. Les acides chlorogénique, coumarique et gallique ont provoqué une inhibition significative de la croissance des cellules, ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques. MARTA et ARANTXA (2011) et WANG *et al* (2014) ont rapporté également que le resvératrol et la Quercétine induisent l'apoptose dans les adipocytes et les préadipocytes, ils diminuent leur prolifération et provoquent l'arrêt du cycle cellulaire.

3.5. Effets des polyphénols sur le métabolisme lipidique

Chez des souris ayant une obésité induite par un régime hyper lipidique, une supplémentation en curcumine à 500 mg/kg augmente le métabolisme de base et peut donc accroître les dépenses énergétiques. Le curcumine augmente l'activité de l'AMP-Kinase (AMPK) et l'ACC (Acétyl CoA Carboxylase) par une augmentation de leur phosphorylation,

Synthèse bibliographique

cela se traduit par la suppression de la conversion de l'acétyl CoA en malonyl CoA. Un niveau inférieur de ce dernier (malonyl CoA) augmente l'expression de la carnitine palmitoyl transférase-1 (CPT-1) qui augmente l'oxydation des acides gras. La phosphorylation de l'AMPK supprime également l'expression de la GPAT-1 (glycerol-3-phosphate acyltransférase-1) qui se traduit par une estérification réduite des acides gras (Figure 14) (EJAZ *et al.*, 2009 ; LECERF, 2012).

Chez les rongeurs, le curcumin exerce des effets hypolipémiants : chez des hamsters recevant un régime hyper lipidique, le curcumin abaisse les taux des triglycérides et des acides gras libres plasmatiques. Chez des rats recevant un régime hyper lipidique, le curcumin réduit le taux des triglycérides des VLDL. Aussi, l'adjonction de curcumin à la nourriture de la souris entraîne une réduction des triglycérides hépatiques (LECERF, 2012).

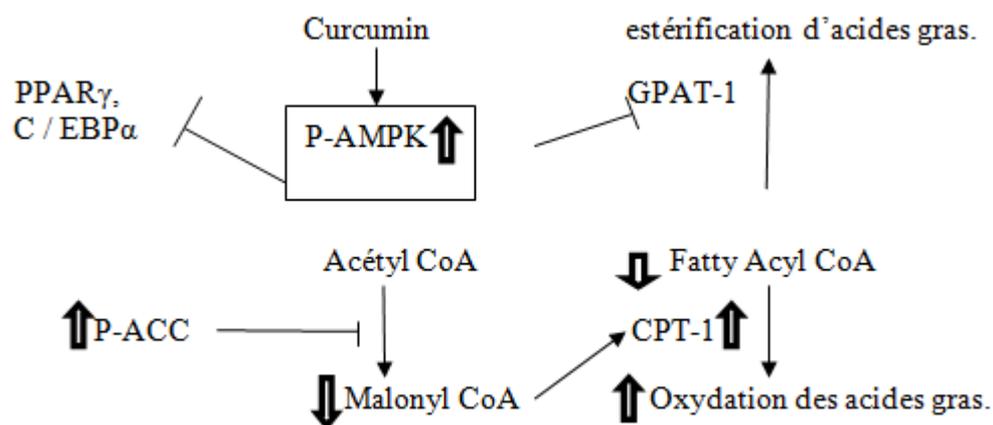


Figure 14 : modèle proposé pour l'effet de la curcumine sur le métabolisme énergétique des lipides (EJAZ *et al.* 2009).

MOHAMED (2014) rapporte que les polyphénols du café (acides mono- ou di-caffeoyl quinique) améliorent le métabolisme énergétique et réduisent l'accumulation de graisse dans le foie. En effet, ils inhibent la lipogenèse par une régulation négative de Sterol regulatory element-binding protein (SREBP-1c), l'acétyl-CoA carboxylase-1 (ACC1) et -2 (ACC2) et la stéaroyl-coenzyme A désaturase-1 (SCD1).

Selon MOHAMED (2013), les anthocyanines des fraises empêchent la dyslipidémie et le développement de l'obésité chez les mammifères nourris avec un régime alimentaire riche en matières grasses. Les polyphénols des mûres (acide gallique, l'acide chlorogénique, rutine et anthocyanes) aident à prévenir l'obésité en réduisant la lipogenèse hépatique. La Réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) d'huile, contiennent des flavonoïdes hydrophobes qui ont un effet anti-obésité tels que la diminution du tissu adipeux abdominal et du foie et des triglycérides plasmatiques. Les baies sauvages de l'Alaska (*Vaccinium ovalifolium*, *Vaccinium uliginosum*, Plaquebère, *Spectabilis rubus* et *Empetrum nigrum*) enrichies en anthocyanines et proanthocyanidines réduisent l'accumulation des lipides dans les adipocytes et les niveaux de glucose dans le sérum.

Synthèse bibliographique

FUKUCHI *et al.*, (2008) suggèrent que la supplémentation de polyphénols de citron à l'alimentation empêche l'accumulation de graisses viscérale et sous-cutanée, probablement par une augmentation de l'oxydation peroxisomal des acides gras dans le tissu adipeux.

Les études animales rapportées par RUPASINGHE *et al.*, (2016), montrent que la supplémentation de naringine (3%) et de nobiletin (0,3%) avec un régime alimentaire riche en matières grasses induit l'augmentation de la β -oxydation des acides gras par une régulation positive de la production de CPT-1 α (carnitine palmitoyltransferase-1 α). Dans les adipocytes matures 3T3-L1, les extraits flavonoïdiques des écorces d'agrumes (riche en nobiletin, tangerétine, rutine et hespéridine) augmentent la phosphorylation de l'AMPK et de l'ACC, la lipolyse est également améliorée par la phosphorylation de la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA) et la lipase hormono-sensible (HSL). Les données d'une étude similaire ont montré que l'administration de la naringénine (un flavonoïde de pamplemousse), chez le rat, conduit à une régulation différentielle des niveaux d'expression de PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), CPT1 et la protéine découplante (UCP2). La régulation positive de PPAR α entraînant par conséquent l'augmentation des niveaux de CPT1 et d'expression d'UCP2. En outre, une autre étude a également démontré que la naringénine (1% du régime) augmente l'oxydation des acides gras hépatiques grâce à une régulation positive de l'expression des gènes des enzymes impliquées dans la β -oxydation chez la souris dans les peroxysomes.

Des études ont suggéré que le traitement avec l'anthocyanine induit la phosphorylation de l'ACC et l'augmentation de l'oxydation des acides gras mitochondriaux par l'intermédiaire de la régulation allostérique de la CPT-1, qui catalyse l'entrée de longue chaîne acyl-CoA dans les mitochondries dans les cellules Hep G2 (RUPASINGHE *et al.*, 2016).

Une étude récente également rapportée par RUPASINGHE *et al.*, (2016), montre que chez la souris, la supplémentation de bleuets et de jus de mûriers riche en anthocyanine intervient dans la régulation de l'expression des gènes du CPT-1, ce qui indique une stimulation induite par les anthocyanines de l'oxydation des acides gras tout en inhibant la synthèse des acides gras. En outre, les anthocyanines sont capables de réguler différenciellement divers gènes participant à l'oxydation des acides gras (par exemple PPAR- α , UCP-2, UCP-3).

Les catéchines inhibent la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui est responsable de la dégradation de la noradrénaline et de stimuler ainsi la β -oxydation des acides gras (RUPASINGHE *et al.*, 2016).

Les résultats d'une étude utilisant des souris obèses C57BL / 6J ont montré que l'EGCG du thé vert a la capacité d'induire la réduction de la masse corporelle, mais a également entraîné une diminution dans les niveaux d'expression de l'ARNm de PPAR- γ , SREBP- 1c, la lipoprotéine lipase (LPL) et l'acide gras synthase (FAS) dans le tissu adipeux blanc. D'autre part, les taux d'ARNm de la CPT-1, UCP2 et la HSL augmentent (RUPASINGHE *et al.*, 2016).

L'exposition au resvératrol induit une augmentation de la β -oxydation des acides gras, en inhibant la production de malonyl-CoA (WANG *et al.*, 2014 ; RUPASINGHE *et al.*, 2016). Aussi, WANG *et al.*, (2014) et MENDES *et al.*, (2016) rapportent que ce polyphénol diminue également la lipogénèse dans les adipocytes (figure 15). En effet, dans les cellules 3T3-L1, une dose dépendante de resvératrol (10-100 μ m) diminue l'accumulation intracellulaire des TG avec une baisse de la régulation des gènes de la lipogénèse, y compris la FAS, la LPL,

Synthèse bibliographique

SREBP-1c, PPAR- γ , l'ACC et le SCD1. Le resvératrol active l'AMPK phosphorylée et ensuite inactive l'acétyl-CoA carboxylase et, par conséquent, bloque la production de malonyl-CoA réductase, un stimulateur de la lipogénèse.

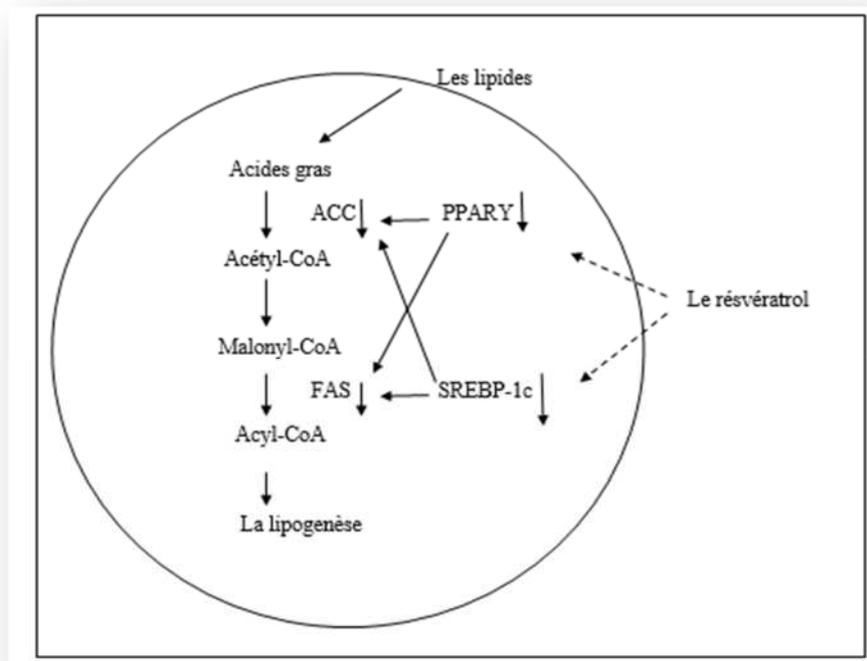


Figure 15 : Mécanisme possible du resvératrol sur la lipogénèse (MENDES *et al*, 2016).

La Génistéine, qui est l'isoflavone principal dans l'extrait de cacao, interagit directement avec le PPAR- α et PPAR- γ et fonctionne comme un activateur pour stimuler le catabolisme des acides gras. De plus, l'activation de PPAR- α stimule l'expression des gènes de la β -oxydation, y compris la CPT-1, et UCP3. L'expression de l'adiponectine augmente également avec l'activation de PPAR- γ . Enfin, les polyphénols de cacao peuvent élever les niveaux plasmatiques d'adiponectine et également augmenter la thermogénèse grâce à l'activation de la voie de l'AMPK et plus précisément via la régulation de l'UCP qui sont impliqués dans la facilitation de la thermogénèse et la dépense énergétique (RUPASINGHE *et al*, 2016).

Selon l'étude de ALI *et al*, (2015), le traitement avec les polyphénols de cacao diminue l'expression du gène NR1H3, le régulateur clé des programmes transcriptionnels impliqués dans l'homéostasie des lipides, en plus, le traitement avec le cacao améliore la β -oxydation hépatique, via l'activation de la signalisation de PPAR α dans le foie de souris (figure 16).

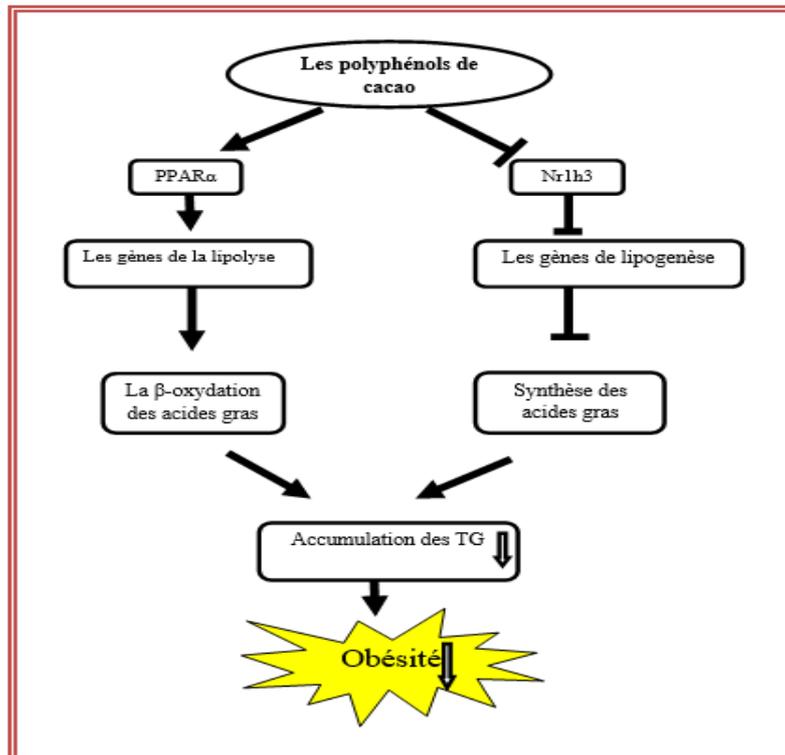


Figure 16: Mécanisme moléculaire de l'effet anti-obésité de polyphénols de cacao dans le foie des rats (ALI *et al*, 2015).

En Fin une étude rapportée par RUPASINGHE *et al*, (2016) a évalué les effets des extraits polyphénoliques de pépins de raisin et du vin rouge sur l'absorption des lipides cellulaires. Ils ont supposé que les oligomères procyanidines sont capables d'agir comme des β -cyclodextrines en favorisant la formation de complexes micellaires dans lesquels les lipides sont sélectivement et de manière intensive incorporés, empêchant ainsi leur absorption.

3.6. Effets des polyphenols sur le taux de cholestérol

Dans une étude récente chez des souris ayant un déficit en récepteurs aux LDL (LDL R (-/-)) recevant un régime riche en cholestérol, le curcumine a entraîné une baisse des taux plasmatiques de cholestérol, des triglycérides, de cholestérol- LDL en inhibant la transcription de l'HMG CoA réductase (L'hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase) qui est responsable de la synthèse endogène de cholestérol). Le curcumine a aussi diminué l'activité de la CETP (Cholesterylester transfer protein) (protéine de transfert du cholestérol-HDL) et a augmenté les taux plasmatiques de cholestérol- HDL, il a inhibé également l'acyl-CoA cholestéryl acyl transférase (ACAT) qui est impliquée dans l'estérification du cholestérol. Chez le hamster, il a diminué les taux de cholestérol hépatique et de cholestérol total (LECERF, 2012).

Selon HOMOURGER (2010), une étude a été faite chez dix volontaires, 500 mg de curcumine ont été administrés pendant sept jours, ayant pour conséquence la baisse de la peroxydation lipidique de 33%, l'augmentation du cholestérol-HDL de 29%, et la baisse de 12% du cholestérol total. Une autre étude a confirmé ces résultats : 10 mg de curcumine administrés deux fois par jour pendant vingt-huit jours ont diminué le cholestérol-LDL et a augmenté le cholestérol-HDL.

Synthèse bibliographique

Certaines études cliniques se sont également intéressées sur le potentiel des polyphénols de fraises et de canneberges pour améliorer le profil lipidique. C'est le cas de l'étude de BASU *et al*, (2009) dans laquelle 16 femmes atteintes du syndrome métabolique devaient consommer chaque jour pour une durée de 4 semaines un breuvage contenant 25g de fraises en poudre. Comparativement aux valeurs de départ, les concentrations plasmatiques de cholestérol total et de cholestérol-LDL en fin d'étude étaient réduites d'en moyenne de 5% et de 6% respectivement. Des résultats similaires concernant ces paramètres ont été obtenus par la consommation de 1,5g d'extraits de canneberges par jour dans l'étude de LEE *et al*, (2008).

D'autres travaux ont indiqué que les polyphénols des feuilles de mûrier réduisent le taux de cholestérol. En effet, dans une étude clinique en Thaïlande, environ 20 participants dyslipidémiques ont reçu trois comprimés de 280 mg de poudre de feuilles de mûrier trois fois par jour avant les repas pendant 12 semaines. Il a été conclu que la poudre de feuilles de mûrier pourrait réduire les taux du cholestérol total (TC) sérique, des triglycérides (TG), et les niveaux de LDL chez les patients présentant une dyslipidémie légère sans provoquer de réactions indésirables graves et les effets secondaires mineurs (CHANG *et al*, 2015).

D'autres études ont démontré que les polyphénols de mûrier (les flavonoïdes) ont une activité antioxydante contre les LDL *in vitro* et *in vivo*, ils peuvent inhiber la synthèse des TG et du cholestérol (WU *et al*, 2013).

UCHIYAMA *et al*, (2010) rapportent aussi que le thé noir induit une réduction du taux de cholestérol sérique chez les rats et chez les hamsters nourris avec un régime riche en cholestérol.

3.7. Effets des polyphénols sur le poids corporel

Chez des rats et des souris génétiquement obèses (ob/ob), le curcumin induit une perte de poids et une augmentation de la masse maigre (LECERF, 2012).

Une étude rapportée par HUANG *et al*, (2009) montre que même en présence d'une alimentation riche en gras et en sucre, l'extrait de pomme de terre permet de limiter la prise de poids. Considérée comme un féculent et populairement connue pour sa teneur en glucides, la pomme de terre fait l'objet de nombreuses études en matière de nutrition. Cette dernière recherche réalisée sur des souris, s'est intéressée aux effets des polyphénols sur le poids. Les souris ont reçu une alimentation riche en graisse pendant 10 semaines dont une partie a bénéficié d'un peu d'extrait de pommes de terre. Les rongeurs ont grossi de 16 grammes sauf ceux ayant consommé des polyphénols qui n'ont grossi que de 7 grammes.

D'autres études montrent que le thé vert et ses catéchines, en particulier l'EGCG, permet de réduire le poids corporel, ainsi que le tissu adipeux (HUANG *et al*, 2009).

D'autres rapports ont mis en évidence la possibilité que les anthocyanes alimentaires pourraient réguler la fonction des adipocytes ou réduire le gain de poids et l'obésité chez les modèles de souris (MCDUGALL *et al*, 2009).

Une étude récente a évalué les effets de l'acide férulique sur le métabolisme lipidique des souris. Cet acide phénolique alimentaire supprima le gain de poids dû à l'alimentation riche en graisses et inhibe la biosynthèse des acides gras (WILLIAMS *et al*, 2013).

Synthèse bibliographique

Des études renforcent davantage la capacité du resvératrol pour améliorer la dépense énergétique et potentiellement favoriser la perte de poids (RUPASINGHE *et al*, 2016).

Selon RASTMANESH (2011), il est prouvé que l'apport quotidien pendant 10 ou 12 semaines de certains fruits (riche en polyphénols) tels que trois pommes ou trois poires, ou de pamplemousse (comme le pamplemousse frais ou de jus de pamplemousse ou de pamplemousse en capsule), peut réduire de manière significative le poids corporel chez les personnes en surpoids et obèses indépendamment de la quantité de fibres du fruit. L'administration à long terme (12 semaines) de catéchines de thé dans une dose de 400-700 mg / jour pour les sujets asiatiques réduit la graisse corporelle. Une étude a démontré que la consommation quotidienne de thé 340 ml contenant 576 mg de catéchines pendant 24 semaines réduit le rapport de graisse corporelle le tour de taille par rapport au groupe témoin, qui avait une consommation quotidienne de 340 ml de thé avec 75 mg de catéchines.

Conclusion

L'obésité et les facteurs de risques associés, sont devenus une préoccupation importante de la santé publique dans les pays développés ainsi que dans les pays en voie de développement.

De ce fait, des actions d'intervention sont nécessaires pour permettre aux personnes en surcharge pondérale ou obèses de retrouver un poids et des paramètres métaboliques leur permettant d'éviter les complications médicales, sociales et psychologiques auxquelles ils sont exposés.

Au cours des 30 dernières années, peu de traitement d'obésité par le biais des médicaments ont été élaborés ou approuvés. Seuls deux médicaments sont actuellement disponibles, et certains médicaments ont été retirés du marché en raison de graves effets secondaires.

Selon notre étude bibliographique, nous avons constaté que les polyphénols réduisent le poids corporel et jouent un rôle important dans la diminution des paramètres biochimiques tels que le cholestérol et les triglycérides. Ils agissent par différents mécanismes pour inhiber l'obésité comme la modulation des voies physiologiques et moléculaires impliqués dans le métabolisme énergétique, l'inhibition de l'adipogenèse et l'augmentation de la lipolyse.

L'efficacité des composés phénoliques fournit la preuve que ces composés bioactifs peuvent être développés comme un nouveau produit naturel pour la prévention de l'obésité à l'avenir.

Les polyphénols, de par leurs effets multiples anti-obésité, présentent un intérêt à ne pas négliger dans la prévention mais également dans le traitement de nombreuses autres pathologies.

Partie II
Partie expérimentale

Introduction

La chimie alimentaire étudie la composition des aliments et leur évolution au cours de la fabrication, du stockage et de la préparation, les réactions améliorant la conservation et certaines propriétés (organoleptiques, nutritives, etc.) du produit sont recherchées. La chimie alimentaire est similaire à la biochimie, les principales substances alimentaires étant les glucides, les protéines et les lipides sont séparées, quantifiées et purifiées pour la détermination de leurs teneur selon l'objectif visé. L'analyse chimique est couramment utilisée en contrôle qualité, pour le contrôle et la surveillance de la contamination et la détection de falsifications, connaître les structures et les fonctions des différents constituants alimentaires, maîtriser la composition biochimique du produit, savoir utiliser les différentes techniques biochimiques pour doser certains constituants d'un aliment (analyse, contrôle qualité). L'objectif est de protéger et de satisfaire le consommateur.

Au cours de notre stage pratique, nous avons effectué une évaluation physicochimique afin de s'assurer de la qualité et de la valeur nutritionnelle de quelques produits alimentaires commercialisés et cela par le dosage des différents paramètres tels que le taux des protéines, de la vitamine C, l'indice d'iode, l'indice d'acidité, le taux des sucres réducteurs et cela en utilisant les méthodes chromatographiques et électrophorétiques.

2.1. Matériel et Méthodes

L'ensemble de travail a été réalisé au niveau du laboratoire de recherche de biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

2.1.1. Matériel

2.1.1.1. Matières premières :

- ✚ Lait : trois échantillons différents de lait sont utilisés : lait cru (lait de vache), lait partiellement écrémé stérilisé (lait de Candia) et pasteurisé (lait de sachet).
- ✚ Huiles végétales : deux huiles à large consommation sont utilisées : l'huile d'olive et l'huile de tournesol.
- ✚ Jus de fruits commercialisés : cinq marques de jus de pH différents sont utilisées.

2.1.1.2. Produits chimiques et réactifs

-colorants et réactifs spécifiques : 2-6-Dichlorophénol-indo-phénol (DCPIP), acide ascorbique, phénolphtaléine, acrylamide, N,N'-méthylène-bis-acrylamide, glycine, bleu de bromophénol, N,N,N',N'tétraméthyléthylène diamine (TEMED), persulfate d'ammonium, dodécyle sulfate de sodium (SDS), 2-mercaptoéthanol, bleu de Coomassie R250, empois d'amidon, lugol, 3,5-dinitrosalicylate (DNS).

-supports chromatographiques : sephacryl S200.

-solvants : acide acétique glaciale, éthanol, acide chlorhydrique (HCL), glycérol, acide trichloracétique (TCA), méthanol, acide acétique.

-sels et tampons : azide de sodium, chlorure de sodium (NaCl), bicarbonate de sodium, hydroxyde de potassium (KOH), thiosulfate de sodium, tris-hydroxy-méthyl-aminométhane (Tris).

2.1.1.3. Matières biologiques

-sérum albumine bovine (BSA), glucose, bleu dextrane, la trypsine.

2.1.1.4. Appareillage

-Unité d'électrophorèse sur mini cuves verticales comprenant : cuves électrophorèse, générateurs de courants, plaques en verre et en hydroxyde d'alumine, espaceurs.

-Unité de chromatographie basse pression constituée de : colonne de séparation (1× 30 cm), détecteurs UV, une pompe péristaltique, enregistreur graphique.

Partie expérimentale

-Autre matériel utilisé pour nos analyses sont : bain marie, agitateurs variés, balance de précision à 0.01mg et balance analytique à affichage digital à 0.01g, centrifugeuse, pH mètre, spectrophotomètre UV-Visible, lyophilisateur à plateaux.

2.1.1.5. Petit matériel

Un certain nombre de petit matériel et d'accessoires sont utilisés : micropipettes, micro seringue, membrane de dialyse (seuil d'exclusion de 8000 Da), gants et masques pour la manipulation de produits dangereux tel l'acrylamide, flacons, barreau magnétique, tige à barreau magnétique, agitateur, pissette d'eau, différents types de verrerie (burette, fioles, béchers, pipettes (graduées, pasteur), tubes à essais, entonnoir, éprouvettes ...etc.

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Méthodes physicochimiques

2.1.2.1.1. Dosage des protéines par la méthode de Bradford *et al* (1976)

- **Principe**

Le taux de protéines dans le lait et dans ses différentes fractions est dosé par l'emploi de la méthode colorimétrique de Bradford *et al* (1976), en utilisant l'albumine sérique bovine comme protéine de référence. Un colorant, le Coomassie Brilliant Blue G-250 développé par Bradford *et al* (1976) est ajouté à la solution de protéine dans des conditions de pH acide (figure 17). Le Coomassie se lie à la protéine par des interactions non-covalentes (ponts hydrogène, interactions hydrophobes et interactions ioniques) au niveau des chaînes latérales des acides aminés basiques (lysine, arginine, histidine) et sur les NH₂ libres (fonctions amines libres) de la chaîne polypeptidique pour former un complexe coloré et sa longueur d'absorption maximale augmente de 465 nm à 595 nm. En solution, il a une forme cationique marron qui absorbe à 470 nm. Lié aux protéines, il a une forme anionique bleue qui absorbe à 595 nm.

On mesure l'absorbance à 595nm d'une solution contenant du bleu de Coomassie pour doser son contenu en protéines et on se réfère à une gamme étalon (Figure 18) composée d'une concentration de protéines connue (BSA). La coloration change après absorption du colorant sur les protéines et le maximum d'absorption du produit coloré est à 595 nm. La technique de Bradford est rapide et très sensible (la sensibilité est de l'ordre de 2 µg/L).

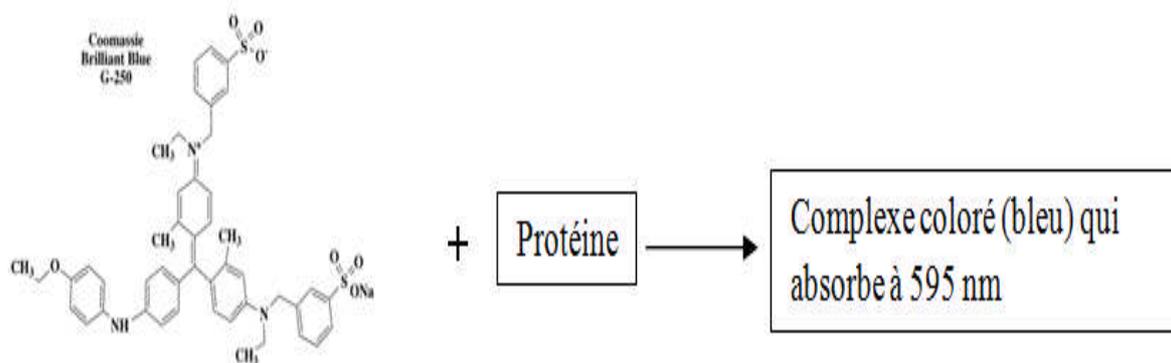


Figure 17 : réaction chimique de bleu de Coomassie G-250 sur les protéines (ANDREW *et al*, 2014)

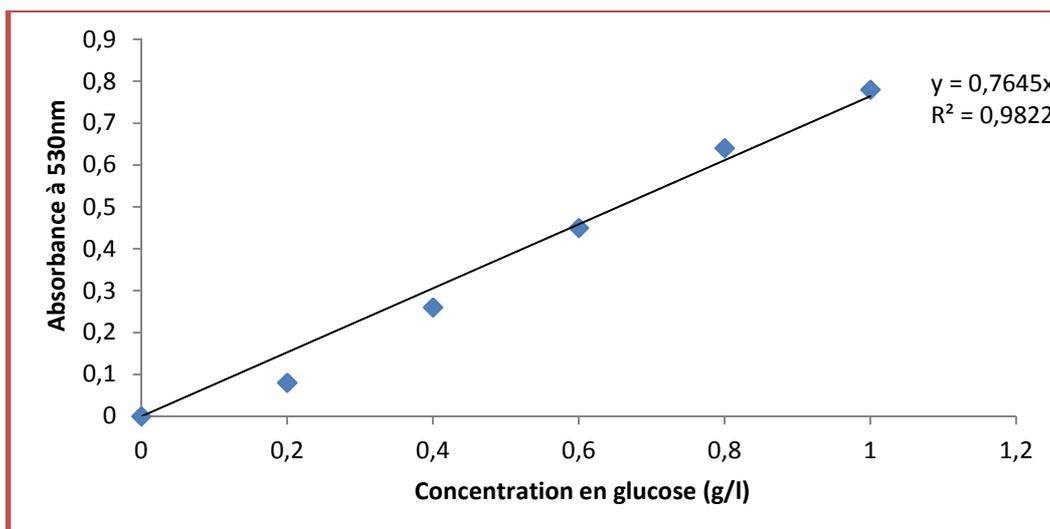


Figure 20: courbe d'étalonnage des sucres réducteurs
(Le mode opératoire est détaillé à l'annexe 2).

2.1.2.1.3. Détermination des indices d'iode et d'acidité d'une matière grasse

2.1.2.1.3.1. Acidité

L'indice d'acide représente le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser les acides gras libres dans 1 g de corps gras, il est exprimé en mg/g. Sa détermination est basée sur la neutralisation des acides gras par une solution de KOH à chaud et en présence de phénolphaléine selon la réaction suivante :



(Le mode opératoire est détaillé à l'annexe 3).

2.1.2.1.3.2. Indice d'iode

L'indice d'iode renseigne sur le degré d'insaturation d'un acide gras, cette insaturation facilite le rancissement d'un acide gras, l'indice d'iode d'un corps gras est le nombre de gramme d'halogène fixé par 100 g de corps gras exprimé en iode selon la réaction suivante :



L'excès d'iode non fixé est titré par une solution réductrice (thiosulfate). L'iode fixé par le corps gras est déterminé selon la réaction suivante :



(Le mode opératoire est détaillé à l'annexe 3).

2.1.2.1.4. Détermination de la teneur en vitamine C

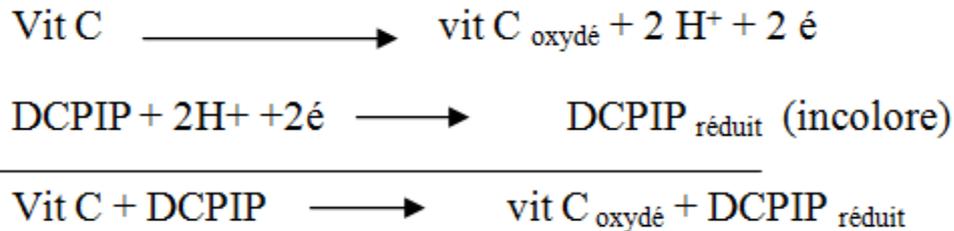
- **Principe**

La teneur en acide ascorbique est mesurée par la méthode de titration au 2,6-dichlorophénol indophénol (DCPIP). Elle consiste en une réduction du 2,6-dichlorophénol indophénol et une oxydation de l'acide ascorbique en acide déhydroascorbique.

Partie expérimentale

- ✓ Le DCPIP possède deux particularités : Il est coloré sous sa forme oxydée en bleu en milieu basique et en rose en milieu acide.
- ✓ Il est incolore sous sa forme réduite.

La réaction d'oxydoréduction peut se résumer comme suit :



(Le mode opératoire est détaillé à l'annexe 4).

2.1.2.2. Préparation des échantillons et leur purification

Les grands groupes de protéines du lait de vache sont isolés et purifiés à partir du lait entier suivant une succession d'étapes illustrées par la figure 21 :

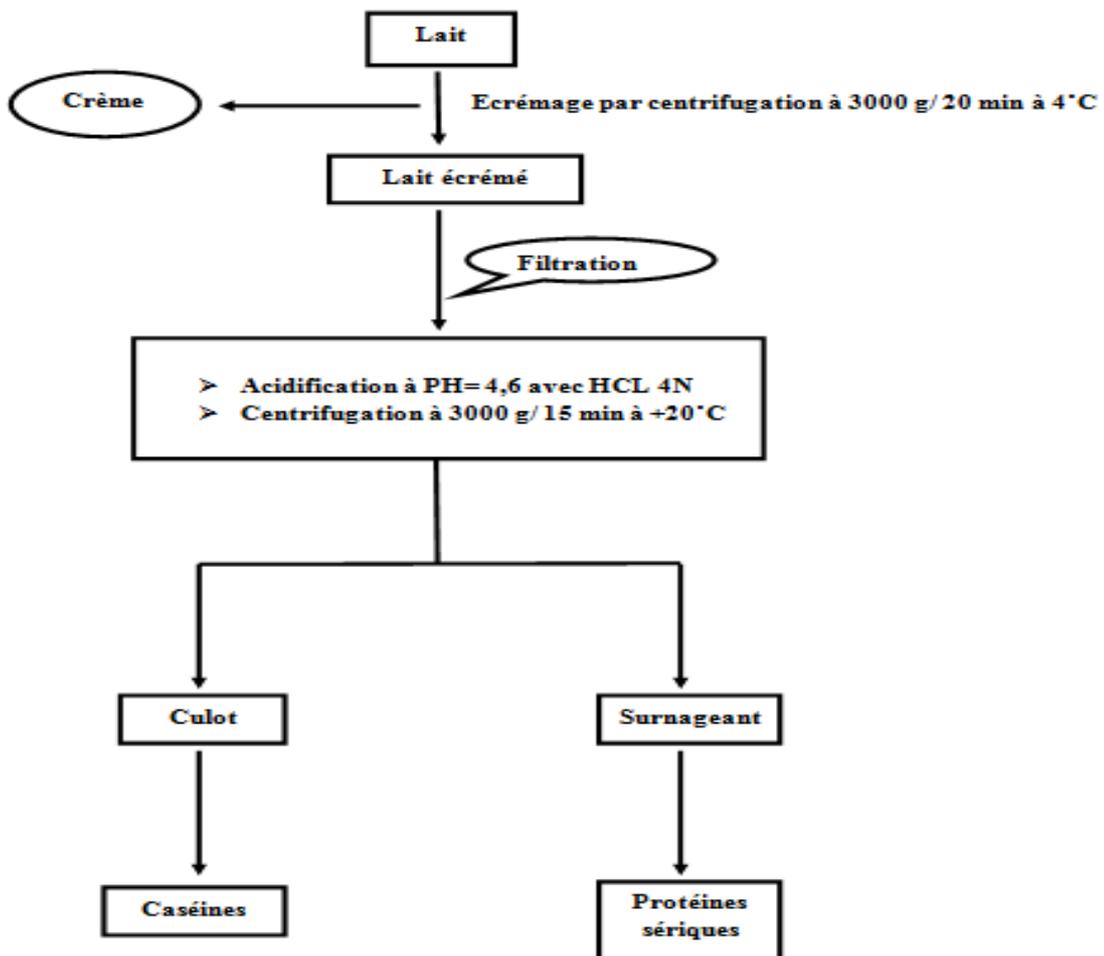


Figure 21: diagramme d'isolement des caséines et protéines du lactosérum à partir du lait de vache (WANGOH *et al* (1998)).

Partie expérimentale

2.1.2.2.1. Ecrémage

Le lait congelé est porté au bain marie et maintenu à une température de 30-35°C sous une légère agitation pour une meilleure homogénéisation, puis il est centrifugé à 3000g/20 min à 4°C et filtré sur de la laine de verre pour se débarrasser de la matière grasse.

2.1.2.2.2. Acidification

Acidifier le lait de vache avec le HCL pour diminuer le pH qui est de 6,6 jusqu'au pHi des caséines qui es égal à 4,6.

Mettre le lait dans un bécher et plonger l'électrode du pH mètre dedans pour mesurer le pH initial du lait puis rajouter du HCL goutte par goutte tout en agitant pour homogénéiser et surveiller le pH jusqu'à ce qu'il arrive à 4,6 et là on arrête l'addition du HCL car les caséines sont précipitées.

2.1.2.2.3. Séparation des protéines du lait :

Les caséines sont précipitées à pH 4,6 comme préconisé par WANGOH *et al* (1998) avec HCL 4N. Le lait acidifié est centrifugé à 3000g/15 min à +20°C. Le culot de centrifugation est récupéré dans un minimum d'eau distillée et le pH de la solution de caséines résultante, est ajusté à 7 avec le NAOH 1N pour une meilleure resolubilisation des caséines.

Quant au surnageant, il est neutralisé avec le NAOH 1N puis acidifié à pH 4,6 avec HCL 1N puis recentrifugé à 3000g/15 min à +20°C. Les protéines sériques sont ainsi isolées dans le lactosérum après élimination des caséines résiduelles dans le culot de centrifugation.

2.1.2.2.4. Dialyse

Principe

La dialyse est une technique de séparation et de purification, elle traduit le phénomène de transport des molécules qui est résumé ainsi : lorsqu'une solution de macromolécules (protéines) est séparée d'un milieu dilué par une membrane semi-perméable, seuls l'eau, les ions et les petites molécules sont capables de traverser la membrane. Ce transport génère une pression : la pression osmotique. Le passage des petites espèces au travers de la membrane évolue pour atteindre un état d'équilibre entre les deux solutions. Cet équilibre est obtenu lorsque les petites espèces diffusantes sont en quantité égale de par et d'autre de la membrane.

La dialyse permet l'échange des petites molécules d'une solution macromoléculaire (remplacement et/ou élimination)

On distingue différents types de membranes, les membranes hémiperméables (qui ne laissent passer que le solvant) et dialysantes (pores de diamètre de l'ordre du nanomètre (nm), identiques et connus) qui laissent passer le solvant et les solutés en dessous d'une certaine taille. Par effet de diffusion (due à l'agitation moléculaire) les petites molécules traverseront la membrane, tandis que les grosses molécules (souvent macromolécules) seront retenues d'un côté. Le produit d'une dialyse (solution de recueil des petites molécules) s'appelle un dialysat (figure 22) (SINE, 2008).

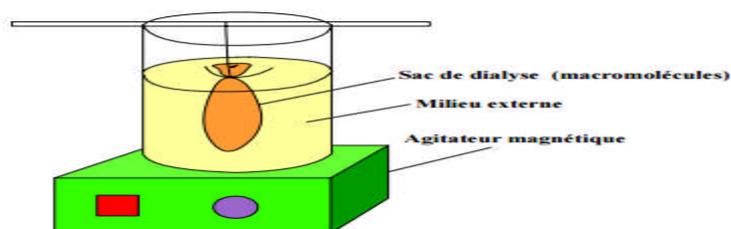


Figure 22 : la dialyse du lait écrémé.

Les échantillons des protéines sériques et de caséines obtenus, sont dialysés contre de l'eau distillée à 4°C pendant 72 h et en changeant l'eau de contre dialyse deux fois par jour et sous une agitation continue en utilisant des membranes de dialyses avec un seuil de coupure de 8000 Da. Les caséines et les protéines sériques sont débarrassées des molécules dont la taille ne dépasse pas 8000 Da (lactose, sels minéraux, composés azotés non protéiques, ...etc).

2.1.2.2.5. Lyophilisation

Principe

C'est une méthode de dessiccation sous vide, à basse température, de produits liquides préalablement congelés.

La lyophilisation consiste en l'élimination progressive de l'eau du produit congelé (phase solide) par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation. En effet, on peut décomposer la lyophilisation en deux phases principales, la phase de congélation et la phase de déshydratation. Cette dernière se subdivise encore en deux parties : étape de la sublimation et étape de désorption. Schématiquement, cela revient à dire que :

- on congèle tout d'abord le produit
- avec la sublimation : on élimine le « surplus » de solvant en surface du produit
- avec la désorption : on élimine le solvant lié au produit.

La lyophilisation permet la conservation de la matière sous forme de poudre pour de longues périodes. (TOULEMONDE et DÉPAGE, 2009).

Après dialyse, les solutions aqueuses de protéines sont étalées en fines couches dans des coupelles et congelées à basse température. Elles seront ensuite mises dans le lyophilisateur qui permet, par sublimation, le passage de la phase solvant (eau) de son état solide (glace) à l'état vapeur, grâce à l'effet du vide poussé généré par la pompe à vide de cet appareil.

Les protéines sont alors récupérées sous forme de poudre et conservées ainsi dans un dessiccateur.

2.1.2.3. Méthodes chromatographiques

2.1.2.3.1. Chromatographie par filtration sur gel

Dans la chromatographie par filtration sur gel, appelée également chromatographie par exclusion ou par tamisage moléculaire, les molécules sont séparées selon leur taille et leur forme. La phase stationnaire est constituée par des billes d'une substance hydratée spongieuse dont les pores correspondant à une zone relativement étroite de dimension moléculaire. Les plus grandes molécules ne pouvant pas pénétrer à l'intérieur des pores du gel, sortent les premières et les plus petites, incluses dans les mailles du gel, sont éluées plus tardivement.

Pour la séparation des protéines sériques de lait de vache, nous avons utilisé comme phase stationnaire le sephacryle S200 (poly allyle dextrane-CO-N-N-méthylène bisacrylamide) qui est préparé par réticulation covalente d'un allyle de dextrane avec du N, N-méthylène bisacrylamide (Figure 23). Ce gel, ayant une grande stabilité, possède un domaine de fractionnement situé entre $5 \cdot 10^3$ et $2.5 \cdot 10^5$ Da.

Partie expérimentale

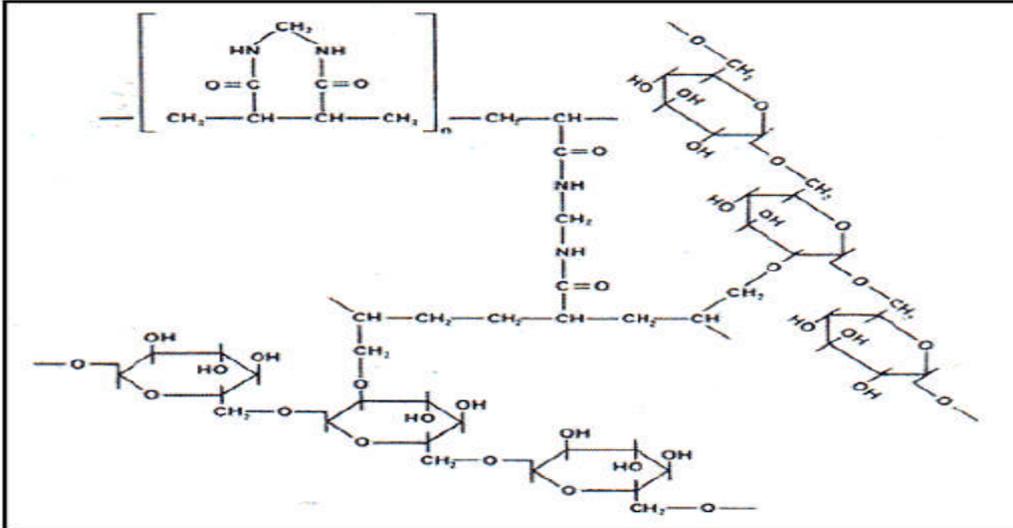


Figure 23: Structure partielle des constituants du sephacryl S200

- **Conditions expérimentales**

Le gel Sephacryl S200 (environ 5g) est d'abord mis en contact du tampon de départ (tris-HCL 0.02M, pH 8.4) pendant 30 min à température ambiante, après gonflement, il est dégazé sous vide, puis coulé doucement le long d'une colonne de dimension (30×1cm), cette dernière est remplie d'une façon régulière, sans fissures ni bulles.

Après équilibrage de la colonne et stabilisation du débit à 0.28 ml/h, le volume mort est déterminée (V_0) par injection du bleu de dextrane à raison de 1 mg/ml qui a une masse moléculaire élevée (10^6 Da).

Les protéines sériques lyophilisées sont dissoutes à raison de 100 mg/5ml de tampon de chromatographie, elles sont déposées délicatement à l'aide d'une micropipette en haut de la colonne préalablement équilibrée avec le même tampon de lavage (figure24). Les protéines sont éluées par passage du tampon dans la colonne avec débit constant. Des fractions de 1ml sont recueillies et contrôlées par électrophorèse PAGE-Native.

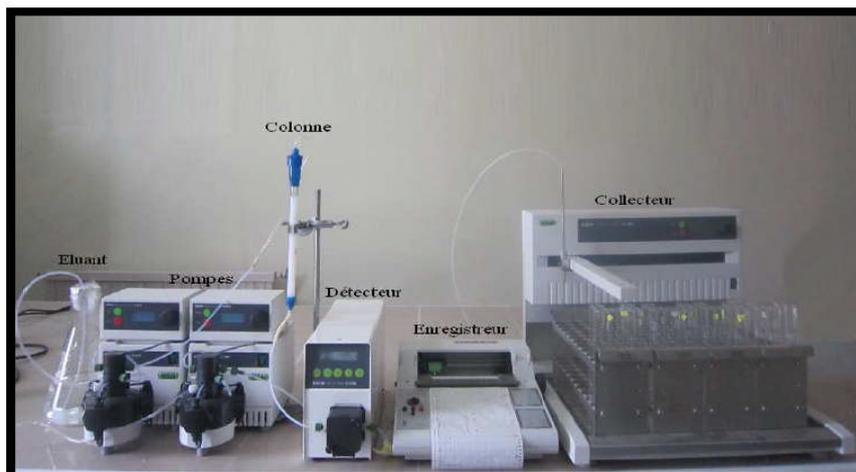


Figure 24 : Photographie d'une unité de chromatographie basse pression.

Partie expérimentale

2.1.2.4. Méthodes de caractérisation

2.1.2.4.1. Hydrolyse enzymatique des protéines du lait par la trypsine

Afin d'avoir une idée sur la sensibilité des protéines bovines à l'action des protéases, nous avons testé l'activité de la trypsine sur deux substrats : les protéines sériques totales et les caséines. La trypsine est une protéase à sérine renferme dans sa structure primaire 230 résidus acides aminée (24 KDa). Elle est active au pH 7 à 8 et à une température de 37°C. La trypsine scinde les liens du coté carbonyle des résidus Lys et Arg.

- **Conditions expérimentales**

1. **Milieux réactionnels**

Tampon réactionnel : Tris-HCL, 0.5M (pH=8,00)

Substrats : protéines sériques (PS) et caséines bovines (CN).

Enzyme : trypsine (EC3.4.21.4)

2. **Incubation**

L'incubation du substrat additionnée de l'enzyme est réalisée à différents intervalles de temps (0, 15, 30, 45, 60, 120 min) au bain marie à 40°C. La réaction enzymatique est arrêtée par chauffage à 100°C pendant 5 min, suivie d'un refroidissement immédiat.

Pour l'analyse en électrophorèse PAGE-SDS, 600 µl d'hydrolysats sont additionnés de 400 µl de tampon d'échantillons puis chauffés immédiatement à 100 °C pendant 5 min (figure 25).

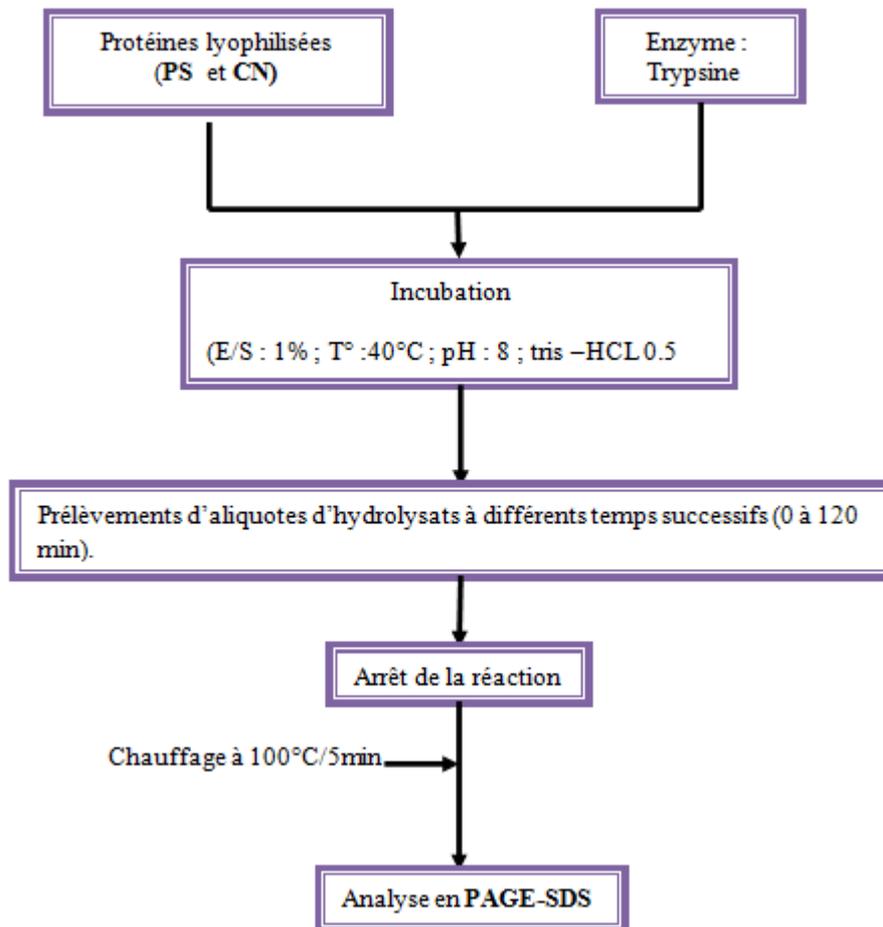


Figure 25 : Etapes suivies pour l'hydrolyse trypsique des protéines du lait de vache.

2.1.2.5. Méthodes électrophorétiques : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

- **Principe**

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qui est basée sur la migration différentielle de particules chargées sous l'effet d'un champ électrique. Certaines substances notamment les protéines, du fait de leur caractère amphotère, peuvent se comporter comme des anions ou des cations, selon les conditions du milieu qui déterminent leurs charges et leurs signes et de ce fait, se déplacer à la cathode ou à l'anode selon des différences dans la charge globale nette et le poids moléculaire, les différentes entités protéiques analysées se matérialiseront sur l'électrophorégramme par des bandes de migration plus ou moins distinctes.

- **Electrophorèse sur gel de polyacrylamide**

C'est la technique la plus utilisée en raison des avantages qu'elle offre de part la variabilité des conditions et des différentes possibilités d'application (analyse quantitative et qualitative). Elle doit ces avantages aux propriétés du gel qui sont la transparence, la reproductibilité élevée et une meilleure résolution liée à sa porosité déterminée par la concentration de ces constituants (acrylamide et bis-acrylamide) et qui est définie par les deux indices T et C :

$$T = (a+b/v) 100(\%) \quad \text{et} \quad C = (b/a+b) 100(\%).$$

Avec : **a** : acrylamide (g) ; **b** : méthylène- bis-acrylamide (g) ; **v** : volume de la solution (ml).

Le gel de polyacrylamide est donc le produit de polymérisation du monomère (CH₂=CH-CO-NH₂) et d'un agent de pontage (Figure 26), habituellement le CO-monomère N, N'-méthylène-bis-acrylamide (CH₂=CH-CO-NH-CH₂-COCH=CH₂) et ce en présence de réactif initiateur de réaction (fournissant des radicaux libres) dont les plus utilisés sont : le persulfate d'ammonium (NH₄)₂S₂O₈) et le N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED).

Le réseau tridimensionnel du gel est formé par un mécanisme de polymérisation de type vinylique qui conduit à la formation de nombreuses chaînes enroulées au hasard. Cette structure détermine un ensemble de micro-canaux dans lesquels les molécules protéiques vont pouvoir se déplacer sous l'effet plus ou moins marqué d'un tamisage moléculaire.

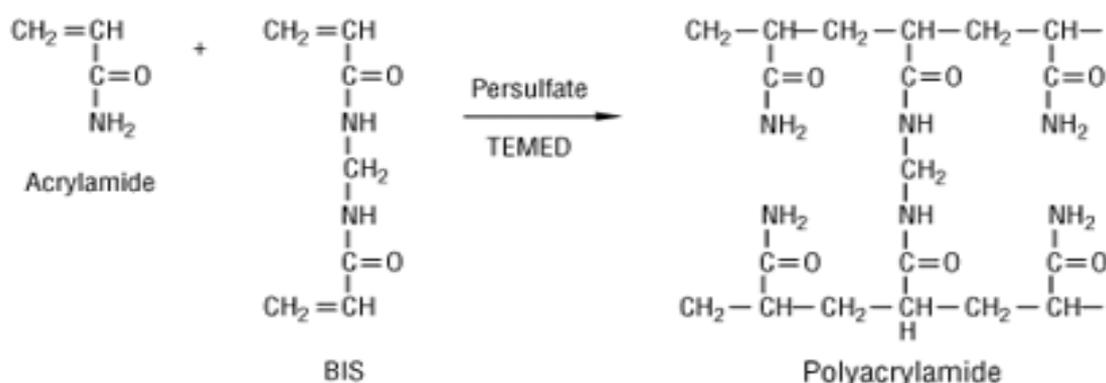


Figure 26: Mécanisme de polymérisation du gel de polyacrylamide.

L'échantillon est déposé à raison de 10 à 20 µl dans chaque puits, à l'aide d'une seringue, après avoir monté l'unité électrophorétiques et remplir les cuves supérieur et inférieur de tampon d'électrode. L'unité est mise sous tension et voltages constants : 20mA, 250 V, à la fin de la migration, le gel d'électrophorèse été révélé par le bleu de coomassie.

Partie expérimentale

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

L'électrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE- native) est une méthode permettant la séparation des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique.

PAGE native est réalisée selon la méthode de HILLIER (1976), adaptée à un système de mini cuves HOFFER au niveau du laboratoire LABAB, avec un gel de polyacrylamide de porosité (T=12% ; C=2,7%) (Figure 27). Le tampon de gel est composé de (TRIS, 0,75 M ; PH=8,9). Le tampon d'électrode est constitué de (TRIS, 5mM ; glycine 77 mM ; PH=8,3). Les échantillons protéiques sont préparés dans le tampon d'échantillon, un mélange : tampon de gel (1/10, v/v), eau distillée (7/10, v/v) et de glycérol (10%, v/v) et le bleu de Bromophénol. Dans ces conditions, la séparation s'effectue suivant la charge électrique nette des protéines et selon leur taille.



A : générateur de courant

B : cuve de migration

Figure 27 : Photographie d'une unité d'électrophorèse (HOEFFER SE 260).

2.1.2.5.2. Electrophorèse en conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS)

Ce type de séparation est basé sur un système biphasique, comprenant deux types de gel : un gel de concentration (T=4.8% et C=2,7%) en tampon Tris-HCL 24.76 mM, pH 6,8 faiblement réticulé et un gel de séparation réticulé (T=17% et C=2,7%) en tampon Tris- HCL 76.36 Mm, pH 8,8 à travers lequel les protéines migrent selon leur poids moléculaire (LAEMMLI et FAVER ,1973).

La PAGE-SDS est une technique qui permet la séparation en conditions dénaturantes en raison de l'ajout de l' SDS. Le SDS [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-SO}_3^- \text{Na}^+$] est un détergent fortement anionique (10% p/v) qui s'associe avec les protéines et leur confère une charge globale négative. Associé avec le 2-mercaptoéthanol (4% v/v) un agent réducteur assurant la rupture des ponts disulfures, le SDS solubilise les protéines et provoque la dissociation des polypeptides (Figure 28), ce qui permet la fixation du SDS sur les zones hydrophobes des chaînes peptidiques et les polypeptides acquièrent alors une forte charge négative et seront séparés suivant leur taille.

Partie expérimentale

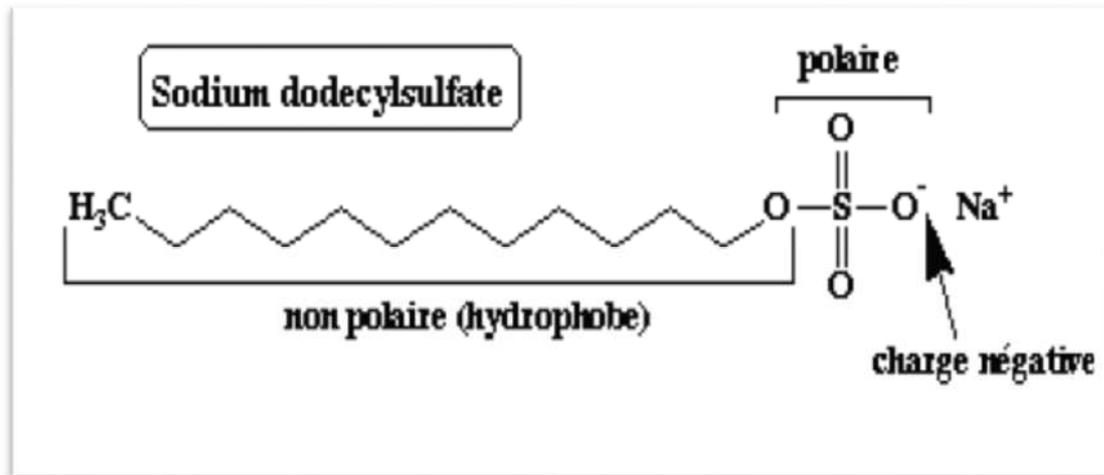


Figure 28 : Structure du dodecyl sulfate de sodium (SDS).

Le tampon d'électrode est composé de (TRIS : 24.76mM ; glycine : 76.73mM ; SDS : 0.69mM ; eau distillée ; 500 ml, PH 8,3).

Les échantillons protéiques sont préparés et mis en solution en présence de gel de concentration (5/10, v/v), de SDS (2,5%, p/v), de 2-mercaptoéthanol (0,5%, v, v) et d'eau distillée (2,5/10, v, v). Ils sont chauffés à 100°C pendant 4 à 5 minutes puis refroidis dans un bain d'eau froide puis additionnés de glycérol 50% v/ v et quelques graines de bleu de bromophénol.

Dans ces conditions, le dodécyl sulfate de sodium (SDS) qui est un détergent anionique et un agent dénaturant, va solubiliser d'avantage les protéines et se fixer à ces dernières (sur la périphérie des chaînes de protéines) en leur conférant une charge négative. Lorsqu'il est en excès, il confère la même densité de charge et de ce fait, la séparation des différents composés de l'échantillon n'a lieu que selon leurs différences de poids moléculaires parce que la charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu.

La PAGE-SDS utilise un système discontinu comprenant deux gels dont un gel de concentration qui est faiblement réticulé, n'exerçant aucun effet de tamisage sur les protéines mais permet plutôt leur concentration en les mettant sous forme de fines bandes qui arrivent au gel de séparation en même temps. Ce dernier sépare les composés grâce à sa réticulation qui détermine la mobilité de chaque protéine.

2.1.2.6. Révélation des bandes de migration électrophorétique

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

Fixation : réalisée par immersion du gel dans une solution d'acide trichloracétique (TCA) 12% (p/v) pendant 45min ;

Coloration : le gel est immergé 2 à 4 h dans une solution de coloration contenant du bleu de comassie 0.2 % (P/V) dissous dans une solution constituée du mélange eau distillée (1 volume), méthanol (1 volume) et TCA 2% (P/V) ;

Décoloration : réalisée par immersion du gel dans le mélange (eau/méthanol/acide acétique) dans les proportions respectives 3.12/1.5/0.37 (V/V/V).

Résultats et discussion

Partie expérimentale

2.2. Résultats et discussions

2.2.1. Qualité physicochimique

2.2.1.1. Teneur en protéines

Le lait de vache est un aliment très largement consommé sur l'ensemble de la planète, soit sous forme liquide proche du produit naturel, soit sous forme de produits transformés, soit encore sous forme d'ingrédients alimentaires, il est considéré comme un aliment complet.

Tableau VII: Concentrations en protéines totales, protéines sérique et en caséines des échantillons dosés par la méthode de Bradford et al 1976.

Echantillons	Lait de vache	Lait Candia	Lait de sachet
Protéines totales (g/l)	35	29	26
Protéines sériques (g/l)	4	3,4	3,2
Caséines (g/l)	31	25,6	22,8

Selon les résultats obtenus (tableau VII), en utilisant la méthode de Bradford *et al* (1976), le lait de vache est plus riche aux protéines totales, sériques et caséines par rapport au lait Candia et le lait de sachet, ces deux derniers laits révèlent une faible concentration en protéines, cela peut être expliqué par les pertes des protéines lors des différentes étapes de leurs fabrication ainsi que les différents traitements appliqués.

Comparativement aux données bibliographiques, la teneur globale en protéines du lait de vache est de 27 g/l obtenu au sein de Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies de l'université M.MAMMERI de tizi ouzou dirigé par Mr MATI (MATI *et al*, 1998).

D'autres chercheurs ont trouvé des valeurs un peu proches de celles obtenues au sein de Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies, ainsi la teneur en protéines totales est de 34 g/l obtenue par BELHADI, 2010 et est de 32 g/l obtenue par REMEUF *et al*, 1985.

Cette méthode présente des avantages : relativement stable dans le temps, micro dosage (faibles quantités de protéines), rapide et contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est moins sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine. Elle est toutefois affectée par les détergents, modifiée par le pH, mais elle présente également des inconvénients : elle est sensible à certains tampons. Les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire (<3000 Da) ne sont pas détectés par cette méthode.

D'autres méthodes sont utilisées pour doser les protéines du lait telles que la méthode de Lowry, cette méthode à l'avantage d'être très sensible, très rapide, peu couteuse. Elle est utilisées quand les quantités de protéines de l'échantillon sont extrêmement faibles (Guillou *et al*, 1986).mais elle présente des inconvénients : Coloration peu stable, mécanisme de réaction mal connu et la dépendance étroite de la coloration avec la composition en acides aminés des protéines, mauvaise corrélation avec la méthode de Kjeldahl (BROWN *et al*, 1983), de ce fait, elle peut nous donner des résultats qui ne sont pas fiables. Ces diverses raisons expliquent le peu de retentissement de cette méthode appliquée au dosage des protéines du lait (BROWN *et al*, 1983) et sa limitation à des déterminations semi-quantitatives (CHURCH *et al*, 1983).

Partie expérimentale

2.2.1.2. Teneur en sucres réducteurs dans différents types de jus de fruit en utilisant la méthode de DNS

Les sucres tiennent une grande place parmi les substances dissoutes dans les jus commercialisés. Conjointement avec les acides, les sucres donnent au jus un goût caractéristique

Les résultats relatifs à la quantité des sucres réducteurs des différents jus de fruit sont présentés dans le tableau VIII où nous remarquons que les teneurs les plus élevées en sucres réducteurs ont été enregistrées dans les jus N'gaous et Candia lacté avec respectivement 20.14 g/l et 19.67 g/l, et la teneur la plus faible est manifestée par le jus Ramy avec 12.67 g/l. Ces teneurs ne répondent pas aux normes AFNORD (1986) qui est de 40 à 100 g/l, effet qui peut être dû à l'utilisation des fruits peu murs, les procédés de fabrications et les techniques d'analyse de laboratoire utilisées.

Les sucres réducteurs contenus dans ces jus de fruits sont représentés par le fructose et le glucose, ce sont des sucres rapidement assimilés qui fournissent de l'énergie à l'organisme (BETONETAL, 2003).

Selon, LIU *et al*, 2006, les teneurs en sucres réducteurs dans les jus de fruit dépendent de nombreux facteurs comme la variété, la maturation, en fait pendant la période de maturation des fruits, le saccharose est convertie en sucres réducteurs, ainsi, la quantité de saccharose décroît au fur et à mesure de la maturation.

Selon SHALLENBERGER et BIRK (1975), le stockage à 30°C du jus d'orange pendant les 1^{ère} mois de stockage (1 à 2 mois) n'engendre pas de variation de la teneur en sucres réducteurs.

Tableau VIII: les teneurs en sucres réducteurs (g/l)

Types d'échantillons	Candia lacté	Ramy orange	Ramy enrichi en vitamines	N'gaous	Candia orange
pH	4,18	3,16	3,29	3,36	3
Teneurs en sucres réducteurs (g/l)	19,67	12,67	19,5	20,14	17,06

2.2.1.3. Détermination des indices d'acidité et d'iode d'une matière grasse

2.2.1.3.1. Indice d'acidité

L'acidité constitue un indicateur fondamental de la qualité pour une huile, il permet de classer l'huile en différentes catégories en fonction de leurs teneurs en acides gras, l'acidité libre exprimée en équivalent d'acides oléiques permet de contrôler le niveau de dégradation des triglycérides.

D'après les valeurs dressées dans le tableau IX nous remarquons que l'indice d'acide de l'huile d'olive qui est de l'ordre de 6.73 mg de KOH/1g de l'huile est plus élevé que celui de l'huile de tournesol qui est de 1.35 mg de KOH/1g de l'huile. Ces résultats indiquent leurs teneurs différentes en acides gras libres.

La diminution de l'acidité de l'huile de tournesol par rapport à celle de l'huile d'olive est due au traitement de raffinage. En fait au cours de ce raffinage les huiles subissent une étape de neutralisation par la soude qui a pour effet d'éliminer une bonne partie des acides gras libres contenus dans ces huiles (KANDJI, 2001).

Partie expérimentale

Selon KANDJI (2001), une huile de bonne qualité doit présenter une acidité faible ou nulle. D'après nos résultats, les huiles analysées présentent une faible acidité ce qui les rend des huiles consommables et de très bonne qualité.

2.2.1.3.2. Indice d'iode

En présence d'une solution de lugol (eau iodée-iodurée), l'empois d'amidon se colore en bleu-noire qui disparaît lorsque tout le diiode est consommés. L'empois d'amidon est un indicateur de fin de réaction, il permet de mettre en évidence le diiode, il est utilisé lors du dosage de diiode par les ions thiosulfates pour mettre en évidence des traces de diiode.

L'indice d'iode peut caractériser une variété d'huile donnée, cet indice est en relation avec le nombre de doubles liaisons des acides gras constituant l'huile, il indique le degré d'insaturation des huiles. Le tableau IX nous renseigne sur le degré d'insaturation de deux types d'huiles utilisées. Nous remarquons que l'indice d'iode des deux huiles analysées (huiles d'olives et huile de tournesol) sont respectivement 0.76 g/100g et 2.54 g/100g, ces résultats ne répondent pas aux normes qui sont respectivement de 75-94 g/100g pour l'huile d'olive et 118-141 g/100g pour l'huile de tournesol. L'abaissement de cet indice peut être attribué à une diminution de l'insaturation globale de l'huile, causée probablement par l'oxydation des acides gras polyinsaturés, et /ou par la polymérisation des chaînes insaturées lors des différentes étapes du raffinage pour les huiles de tournesol.

Tableau IX: Indices d'acidité et d'iode dans les huiles d'olives et tournesol

Types d'échantillons	Huiles d'olives	Huiles de tournesols
Indice d'acidité : mg de KOH/g de matière grasse.	6,73	1,35
Indice d'iode : g d'iode/100g de matière grasse.	0,76	2,54

2.2.1.4. Teneur en vitamines C dans les différents jus commercialisés

La vitamine C, est le nom communément donné à l'acide ascorbique. Elle est facilement oxydée par de nombreux oxydants, en particulier le dioxygène de l'air, elle empêche celui-ci d'oxyder les constituants des aliments et protège ainsi les corps gras contre le rancissement.

La présence de la vitamine C dans les aliments est indiquée par le code E 300. La vitamine C est synthétisée par de nombreux êtres vivants, mais pas par l'homme qui doit donc le trouver dans son alimentation.

Lors du dosage de la vitamine C, on a constaté que le colorant 2,6 DCPIP (bleu) se décolore (transparent) et cela est dû à sa réduction par l'acide ascorbique. Le début de l'apparition de la coloration rose pâle signifie que toute la quantité d'acide ascorbique présente dans le milieu a réagi avec le colorant (DCPIP) et donc il se trouve sous forme oxydé (acide déhydro L-ascorbique). Ainsi le volume versé indique la teneur de chaque échantillon en acide ascorbique sachant que le réactif est spécifique seulement pour le dosage de la forme réduite de la vitamine C (acide L-ascorbique). Le tableau X résume les résultats obtenus.

Partie expérimentale

Tableau X : les teneurs en vitamine C dans les différents jus commercialisés

Le jus commercialisé	Candia orange	Ramy orange	Candia lacté	N'gaous	Ramy enrichi en vitamines
Teneurs en vitamines C (g/l)	0,38	0,32	0,34	0,18	0,26

D'après les résultats obtenus (tableau X) on constate que la teneur en vitamine C (acide ascorbique) est variable selon les jus. On trouve que le jus Candia orange est le plus riche en acide ascorbique ensuite le jus Candia lacté suivie par Ramy orange. Cette différence peut être à l'origine des unités de production ou il y'a enrichissement des jus par l'acide ascorbique ou bien cela pourrait être dû aussi à la présence de conservateurs dans le jus commercialisé qui a permis de protéger et ralentir l'oxydation de la vitamine C (conservation plus longtemps). cette dernière est très sensible à la chaleur, toutefois son oxydation est possible à température ordinaire et accélérée à température élevée.

Selon DUPAIGNE (1970), en présence des traces d'oxygène qui peuvent subsister dans le jus et dans l'espace libre, la lumière accélère la dégradation de l'acide ascorbique.

La teneur en acide ascorbique peut être influencée par plusieurs facteurs tels que la variété du fruit, le stade de maturation, les conditions de culture, la température de stockage et la méthode d'extraction.

Cette méthode titrimétrique à comme inconvénient de conduire à des résultats erronés par la présence d'autres composés réducteurs (triose réducteurs...) pour cela, d'autres techniques sont appliquées pour le dosage de la vitamine C, parmi elles, la Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC), elle présente un double intérêt par rapport aux autres techniques, elle a un grand pouvoir séparateur : elle permet tout d'abord d'éliminer tout produit interférant ; par ailleurs, elle permet de séparer l'acide L-ascorbique de ses métabolites ou de composés voisins comme l'acide D-isoascorbique, d'une façon beaucoup plus satisfaisante qu'elles le permettent les autres techniques. C'est une technique à reproductibilité excellente. Elle est particulièrement intéressante lorsque l'on souhaite étudier la stabilité de l'acide L-ascorbique dans un aliment au cours de sa conservation ou lors d'un traitement industriel (Asselmann, 1983).

2.2.2. Méthodes chromatographiques

2.2.2.1. Fractionnement des protéines sériques du lait bovin par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200

Les méthodes chromatographiques permettent la séparation et la quantification des différentes protéines d'un mélange. La chromatographie sur DEAE cellulose et par filtration sur gel sont des méthodes longues, pouvant difficilement être utilisées. Le développement des techniques chromatographiques rapides comme la HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) suscitent dans ce domaine de nombreux espoirs (abaissement des temps d'analyse, sensibilité accrue).

Dans notre manipulation, nous avons fractionné les protéines sériques bovines par la chromatographie de perméation sur sephacryl S200, en utilisant une colonne de dimension (30×1cm). Les profils chromatographiques obtenus peuvent être répartis en 3 fractions (notés de F1 à F3) (Figure29), correspondants aux pics d'absorptions enregistrés.

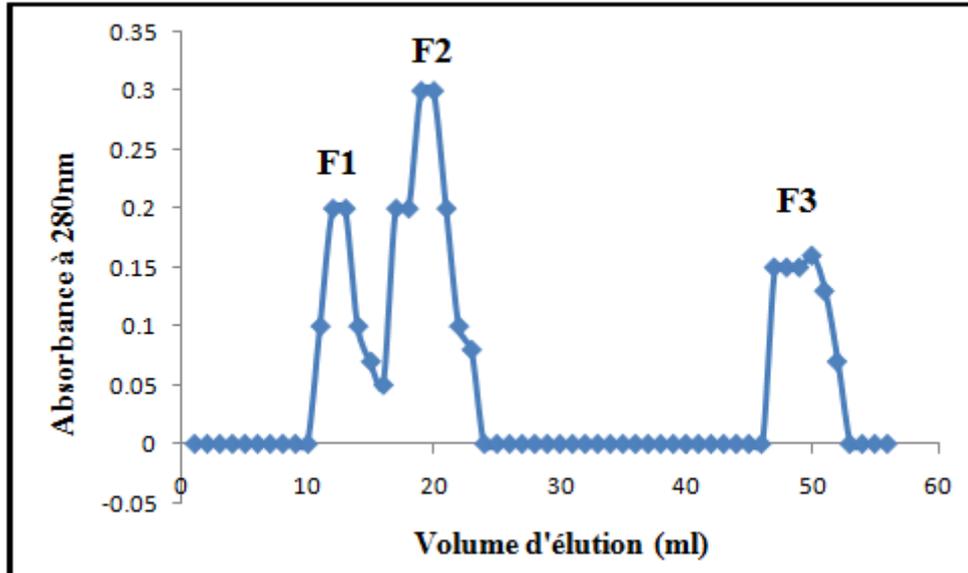


Figure 29: chromatogramme des protéines sériques du lait bovin sur SEPHACRYL S200 (colonne 30×1cm).

2.2.3. Méthodes électrophorétiques

2.2.3.1. Isolement et caractérisation électrophorétiques des protéines sériques du lait de vache en PAGE-native

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native) est résolutive et bien adaptée pour la séparation des protéines sériques du lait. Le profil de migration électrophorétique se caractérise par la variabilité des bandes selon leur intensité et leur focalisation en fines bandes (cas de protéines natives) ou en larges bandes (cas de protéines dénaturées).

Selon Egito *et al* (2001), les protéines de lactosérum bovin migrent en 5 bandes majeures classées par ordre croissant de leur mobilité électrophorétique, les Immunoglobulines (Ig), l'albumine sérique bovine (BSA), l' α -lactalbumine (α -La) et la β -lactoglobuline (variantes A et B).

L'électrophorégramme obtenu (figure 30) montre que l'albumine sérique, les immunoglobulines et la β -lactoglobuline sont élués dans la fraction F1, dans la fraction F2 nous observons l'élué l'Ig, BSA, l' α -La et la β -Ig, ces résultats se trouvent en accord avec les résultats obtenus par Egito *et al* (2001), enfin d'élué, dans la fraction F3, nous constatons la présence de la β -lactoglobuline.

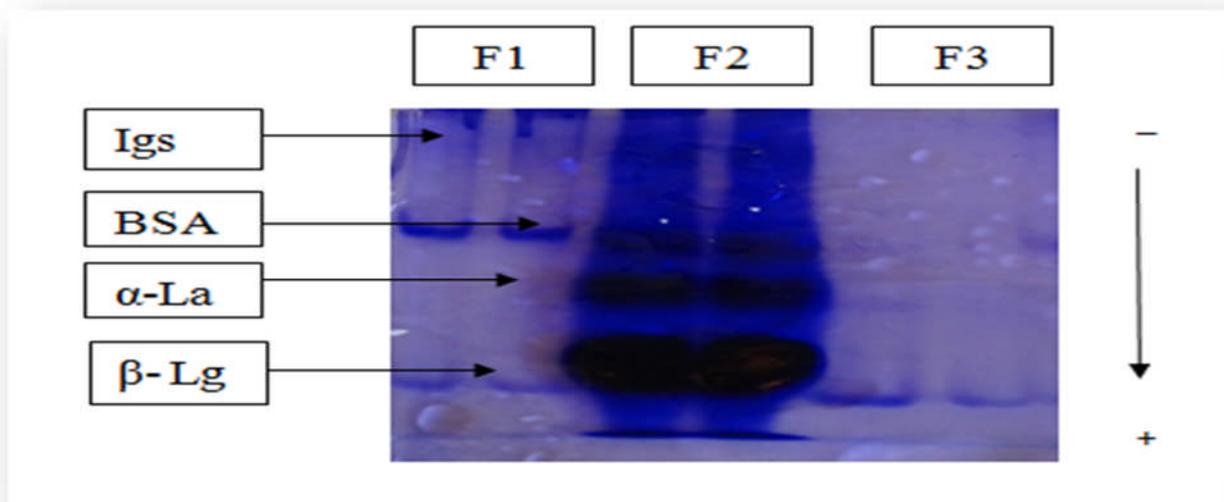


Figure 30 : Électrophorégramme des fractions récupérées par la chromatographie de perméation (PAGE-native) ; gel à T= 12%, C=2.7%

2.2.3.2. Isolement et caractérisation électrophorétiques des caséines et des protéines sériques du lait de vache en PAGE-SDS

La technique que nous avons utilisé est basée sur l'utilisation de deux gels superposés de composition différente : un gel de concentration à (T=4% et C=2,7%) et un gel de séparation à (T=17% et C=2,7%) (LAEMMLI et FAVER ,1973), pour séparer les hydrolysats obtenus par l'action de la trypsine sur les protéines sériques à différent temps d'incubation notés en minutes comme suite : T'0, T'15, T'30, T'45, T'60 et T'120. Nous avons suivie l'action de la trypsine par électrophorèse en conditions dénaturante (PAGE-SDS).

Un traitement préalable des protéines avec le tampon d'échantillon contenant deux substances chimiques pour solubiliser les protéines : le SDS ($C_{12}H_{25}SO_4^-$, Na^+) détergent anionique, le β - mercaptoéthanol agent réducteur des liaisons disulfures pour garder les protéines sous leur forme dénaturées.

La trypsine à une activité protéolytique très intense, elle se manifeste au niveau des liaisons carboxyliques de la lysine et de l'arginine pour les hydrolyser. En d'autres termes, elle transforme les chaînes polypeptidiques en chaînes protéiques plus courtes pour permettre la digestion.

L'analyse du profil électrophorétique obtenu en PAGE-SDS pour les protéines sériques (figure 31), montre l'existence de bandes sombres et épaisses distancées l'une de l'autre au niveau de l'échantillon témoin (TN) et l'échantillon T'0 correspondant à l' α -La, la β -Lg et la BSA.

Concernant les échantillons T'15 et T'30 les bandes sont sombres et épaisses comme elles le sont dans les échantillons TN et T'0 ce qui veut dire que les protéines α -La, la β -Lg et la BSA sont insensibles à la trypsine.

T'45 et T'60 la bande correspondante à la BSA est fragmentée en deux bandes claires, fines et bien séparées ce qui veut dire que la BSA est hydrolysée en deux peptides de poids moléculaire inférieur à la BSA.

En ce qui concerne la β -Lg, la bande correspondante semble être plus claire et plus fine ce qui veut dire que cette protéine commence à s'hydrolyser.

Mais pour l' α -La, la bande correspondante est toujours de la même intensité et la même épaisseur que dans l'échantillon témoin (TN) ce qui veut dire que cette protéine est toujours insensible à l'action de la trypsine.

Partie expérimentale

A T'120 les deux bandes correspondantes à la BSA sont plus fines et plus claires qu'elles le sont dans l'échantillon T'60 ce qui veut dire que plus le temps passe plus la BSA est hydrolysée par la trypsine.

En ce qui concerne la β -Lg, la bande correspondante semble être plus claire et plus fine qu'elle l'est dans l'échantillon T'60 ce qui veut dire que cette protéine continue à être hydrolysée par l'enzyme.

Mais pour l' α -La, la bande correspondante est un peu moins intense et moins épaisse que dans l'échantillon T'60 ce qui veut dire que cette protéine commence à être hydrolysée par la trypsine.

La bande correspondante à l'Ig n'est pas apparue au niveau des différents puits du fait qu'on n'a pas donné le temps nécessaire pour que cette protéine de haut poids moléculaire puisse migrer.

L'analyse du profil électrophorétique obtenue en PAGE-SDS pour les caséines n'as pas été révéélé, cela pourrait être due au gel utilisé ; il y a eu des contaminations lors de son coulage, ou bien lors de sa polymérisation.

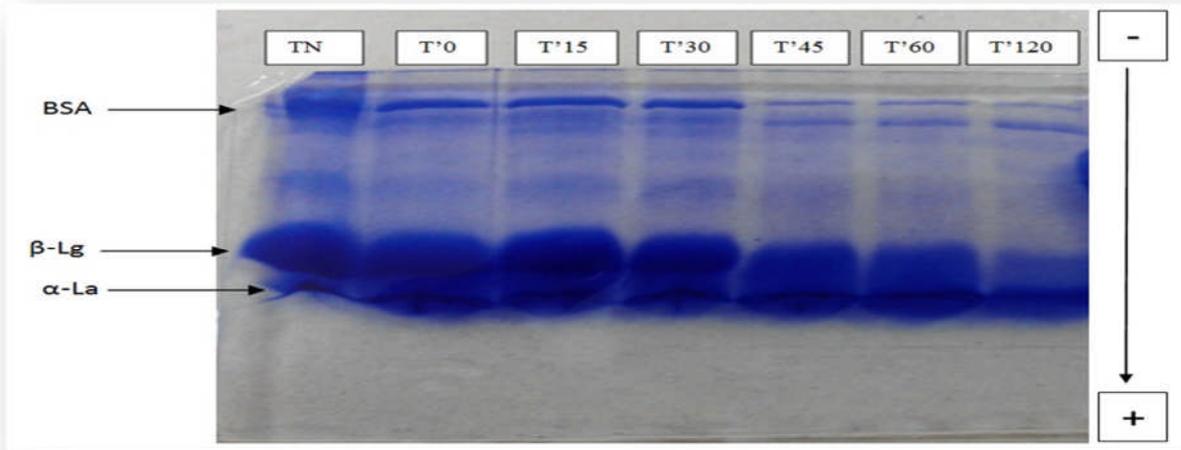


Figure 31 : Électrophorégramme des hydrolysats (protéines sériques lyophilisées du lait de vache) obtenues par l'hydrolyse enzymatique (Trypsine) en PAGE-SDS ; gel de concentration (T=4% et C=2.7%), gel de séparation (T=17% et C=2.7%).

Conclusion

Le laboratoire de physico-chimie utilise les normes de référence (ISO, AFNOR...) et dispose de technologies à haute performance (chromatographie gazeuse et liquide, UV-Visible...) pour fournir des informations précises et des résultats fiables afin d'aider dans la prises de décisions en matière de qualité et de valorisation nutritionnelle, donc l'évaluation de ces paramètres physico-chimiques constitue une étape importante pour le contrôle de la qualité des produits alimentaires.

Cette étude sur les paramètres responsables des variations de teneur en vitamine C des jus fruits s'inscrit dans une optique de promotion de la qualité nutritionnelle de ces jus pour une valorisation par les producteurs sur le marché.

D'après les résultats obtenus, on constate que la teneur en vitamine C est variable selon les jus. On trouve que le jus Candia orange est le jus Candia lacté sont les plus riches en vitamine C avec 0,38 et 0,34 g/l respectivement. Cette différence peut être due à l'origine des unités de production ou il y'a enrichissement des jus par l'acide ascorbique ou bien cela pourrait être dû aussi à la présence de conservateurs dans le jus commercialisé qui a permis de protéger et ralentir l'oxydation de la vitamine C ou bien par l'influence de plusieurs facteurs tels que la variété du fruit, le stade de maturation, les conditions de culture, la température de stockage et la méthode d'extraction.

L'huile d'olive est très appréciée par sa qualité biologique et nutritionnelle. Elle nécessite donc une analyse qui permettra de la classer selon les critères de qualité données par les normes internationales.

L'huile de tournesol est l'huile végétale la plus riche en acides gras essentiels de la catégorie des oméga 6, c'est pour cette raison qu'il faut s'assurer de sa qualité biologique et nutritionnelle.

Sur la base des résultats obtenus dans cette étude par la détermination des paramètres de qualité des matières grasses, l'indice d'acide de l'huile d'olive est plus élevé que celui de l'huile de tournesol.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence existante entre les procédés d'obtention des deux types d'huiles et en fonction de plusieurs facteurs tels que la nature de l'huile, l'origine géographique, la culture et le climat.

En ce concerne l'indice d'iode des deux huiles analysées, les résultats ne répondent pas aux normes. L'abaissement de cet indice peut être attribué à une diminution de l'insaturation globale de l'huile, causée probablement par l'oxydation des acides gras polyinsaturés, et /ou par la polymérisation des chaînes insaturées lors des différentes étapes du raffinage pour les huiles de tournesol.

Les sucres réducteurs contenus dans les jus de fruits sont représentés par le fructose et le glucose, ce sont des sucres rapidement assimilés qui fournissent de l'énergie à l'organisme et ils sont responsables de la saveur du jus, d'après nos résultats, les teneurs les plus élevées en sucres réducteurs ont été enregistrées dans les jus N'gaous et Candia lacté avec respectivement 20.14 g/l et 19.67 g/l, et la teneur la plus faible est manifestée par le jus Ramy avec 12.67 g/l. Ces teneurs ne répondent pas aux normes qui sont de 40 à 100 g/l, cela peut être expliqué par la maturité du fruit utilisé.

Concernant le dosage des protéines par la méthode de Bradford *et al* (1976) des différents échantillons de lait analysés, le lait de vache est plus riche en caséines, protéines totales et les protéines sériques par rapport au lait Candia et lait de sachet cela peut être expliqué par les pertes des protéines lors des différentes étapes de leurs fabrications ainsi que les différents traitements appliqués.

Conclusion

A côté des paramètres physicochimiques utilisés dans des contrôles de routine, d'autres méthodes plus spécifiques et plus sensibles sont utilisées comme les méthodes chromatographiques et les méthodes électrophorétiques pour des analyses plus poussées dans le contrôle de qualité.

Le fractionnement des protéines sériques du lait bovin par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200, a montré que les profils chromatographiques obtenus peuvent être répartis en 3 fractions (notés de F1 à F3), correspondant aux pics d'absorptions enregistrés. Puis un contrôle électrophorétique a été réalisé dans des conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native), ce dernier montre que les protéines de lactosérum bovin migrent en 4 bandes majeures classées par ordre croissant de leur mobilité électrophorétique, les Immunoglobulines (Ig), l'albumine sérique bovine (BSA), l' α lactalbumine (α -La) et la β -lactoglobuline.

Le contrôle électrophorétique dans des conditions dissociantes et dénaturantes en présence de SDS et de 2-Mercaptoéthanol (PAGE-SDS) pour séparer les hydrolysats obtenus par l'action de la trypsine sur les protéines sériques à différent temps d'incubation à montrer l'existence de différentes bandes sombres et plus ou moins épaisses au niveau des échantillons ce qui explique la dégradation de ces protéines sériques en peptides et que ces protéines résistent différemment à l'action de la trypsine.

Les méthodes d'analyse classiques permettent de définir les constituants alimentaires et la composition à peu près exacte du produit c'est pour cette raison qu'il faut que le choix de la méthode d'analyse doit tenir compte de la nature des résultats recherchés.

Le contrôle qualité d'un produit alimentaire permet de contrôler les composants d'un produit ou la matière première dès la réception, La production en cours de réalisation et les produits finis dans le but d'améliorer la production, veiller à la santé du consommateur, le satisfaire et réduire les cas fraudes.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

AGUIRRE L., FERNANDEZ-QUINTELA A., ARIAS N., PORTIHO M.P. (2014). Resveratrol : Anti-Obesity Mechanisms of Action. *Molecules*, 19, 18632-18655.

AILHAUD G. (2008). Apports Lipidiques Et Prise De Poids : Aspects Qualitatifs. *OCL*, 15, 37-40.

AKROUM S. (2011). Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse de Doctorat: Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.

ALI F. (2015). Hepatic genome-wide expression of lipid metabolism in diet –induced obesity rats treated with cocoa polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 17, 969-978.

ANDERSEN R.E. (2000). The spread of the childhood obesity epidemic. *Cmaj*, 163, 1461-1462.

ANDERSON J.W., KENDALL C.W., JENKINS D.J. (2003). Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. *J Am Coll Nutr*, 22,331-339.

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

ANONYME 1: ANONYME 2, www.foodstandards.gov.au. Cité dans la thèse de magister: Etude du pouvoir antioxydant des composés et extraits polyphénoliques issus des olives et sous-produits de l'olivier (feuilles et margines) variété chamlal sur l'oxydation thermique simulante la friture de deux huiles à large consommation : l'huile d'olive et l'huile de tournesol, Melle ALMI Dalila, (2006).

ANONYME 2: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/ (2014).

ANONYME 3 : Ng, M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, doi: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8 (2014).

ANONYME 4: B, B. *Intracranial Tumours*. (1888).

ANONYME 5: A, F. Ein fall von tumor der hypophysis cerebri ohne akromegalie. 883 (1901).

ANONYME 6: Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obesity research* 6 Suppl 2, 51S-209S (1998).

ANONYME 7: KD, B. The LEARN Program for Weight Management. (Dallas, TX, 2000).

ANONYME 8 : Program, D. P. Diabetes Prevention Program Lifestyle Core. (1996).

Références bibliographiques

ASSELMANN C., DIOPP A. (1983). Le dosage de l'acide L-ascorbique dans les aliments. Une revue bibliographique (1976-1983), sciences des aliments.

BABOOTA R K., BISHNOI M., AMBALAM P KONDEPUDI K.K., SARMA S.M., BOPARAI R.K., PODILI K. (2013). Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities –A review. *Journal of Functional Foods*, 5, 997-1012.

BACKHED F., DING H., WANG T., HOOPER L.V., KOH G.Y., NAGY A., SEMENKOVICH C.F., AND GORDON J.I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 15718-23.

BALAJI M; GANJAYI M.S., PARIM B.N., MOPURI R., DASARI S. (2015). A review on possible therapeutic targets to contain obesity: the role of phytochemicals. *Obesity Research et Clinical Practice*, 18.

BASDEVANT A., GUY-GRAND B.(2004). Traité de médecine de l'obésité. Ed. Flammarion Médecine Sciences, Paris. 431 p.

BASDEVANT A. (2008). Obésité: évolutions des conceptions physiopathologiques. *Revue du Rhumatisme*, 75, 935-936.

BASU A., WILKINSON M., PENUGONDA K., SIMMONS B., BETTS N.M., LYONS T.J.(2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutr J*, 8, 43.

BELHADI N. (2010). Effet des facteurs d'élevage sur la production et la quantité du lait de vache en régions montagneuses, mémoire de Magister en agronomie ; Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou ; Algérie.

BELL C.G., MEYRE D., SAMSON C., BOYLE C., LECOEUR C., TAUBER M., JOURET B., JAQUET D., LEVY-MARCHAL C., CHARLES M.A., WEILL J., GIBSON F.; MEIN C.A., FROGUEL P., AND WALLEY A.J. (2005). Association of melanin-concentrating hormone receptor 1 5' polymorphism with early-onset extreme obesity. *Diabetes*. 54, 3049-55.

BENNANI H; FIET J., ADLOUNI A. (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate : étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone des Laboratoires*, 416, 23-26.

BERGER M. (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant: états des connaissances. *Nut Clin et Mét*, 20, 48-53.

BERROUIGUET A., BEN YUCEF M., MEGUENNI K., BROURI M.(2009). Prevalence of cardiovascular risk factors: a survey at Tlemcen (Algeria). *J Epidémiol*, 313-319.

BIOZOT N., CHARPENTIER J. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques.

Références bibliographiques

BOUANANE S.N.B; BABA AHMED F.Z., MERZOUK H., MOKHTARI N.S., MERZOUK S.A.,GRETI J., TESSIER C., NARCE M.(2009).Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clinical Science*,116, 669-680.

BOUHEROUM M. (2007). Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : *Rhantherium adpressum et Ononis angustissima*. Thèse de Doctorat : Université MENTOURI de CONSTANTINE-ALGERIE.

BOUNAUD V ., MOREAU F. (2014). Nutrition, Obésité, Activités physiques. Ed. ORS Poitou-Charentes, France.60 p.

BRADFORD M. M .(1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities for protein utilizing principale of Proteins binding. *Analytical Biochemical*, 72, 248- 254.

BRANCA F., NIKOGOSIAN H et LOBSTEIN T. (2007). Le Defi de l'obesite dans la Region europeenne de l'OMS et les strategies de lutte/ The Challenge of Obesity in the WHO European Region and the Strategies for Response. Ed. WHOEurope, Danemark.68p.

BRENNA JT., SALEM N. JR., SINCLAIR AJ., CUNNANE SC. (2009). Alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids, 80, 85-91

BROWNP B.,CLARKR M., LABARRED J.,ROSS S.R. (1983). A comparison of methods for protein analysis of human milk. *Fed. Proe*, 42, 1330.

CAMPFIELD L. A., SMITH F. J., GUISEZ Y., DEVOS R & BURN P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.

CHANFORAN C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. Thèse de Doctorat : Université D'AVIGNON et des PAYS de VAUCLUSE.

CHANG Y-C .,YANG M-Y.,CHENS S-C ., WANG C-J.(2015). Mulberry leaf polyphenol extract improves obesity by inducing adipocyte apoptosis and inhibiting preadipocyte differentiation and hepatic lipogenesis. *Journal of Functional Foods*, 21, 249-262.

CHIRA K., SHU J.-H., SAUCIER C ., TEISSEDRE P.-L. (2008). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*. 5, 75-82.

CHURCH C., SWAISGOOHD E., PORTERD H., CATIGNANGI L. (1983). Spectrophotometric assay using ophtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sei*, 66, 1219-1227.

Références bibliographiques

COLLIN S., COUNET C., CALLEMIEN D & JERKOVIC V. (2011). Polyphénols et procédés ; in «Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols».Techniques et Documentation, Lavoisier, Paris. 5-10-58 p.

CRESPY V., MORAND C., BESSON C., COTELLE N.,VEZIN H; DEMIGNE C., REMESY C. (2003). "The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound." *Am J Physiol*, 284,G980- 988.

CROZIER A., CLIFFORD M. N., ASHIHARA H. (2008). Plant secondary metabolites : Occurrence, structure and role in the human diet. *John Wiley and Sons*, 321.

DANGLES O. (2006). Propriétés chimiques des polyphénols; in «les polyphénols en agroalimentaire».Technique et Documentation. Lavoisier. Paris.32-33.

DANGLES O., DUFOUR C., MANACH C., MORAND C., REMESY C. (2001). Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol* , 335,319-333.

D'ARCHIVIO M., FILESI C., DI BENEDETTO R., GARGUILOR R., GIOVANNINI C., MASELLA R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* , 43, 348-361.

DE BRANDT J.P. (2004). Nutrition et obésité. *Nutrition Clinique et Métabolisme* ,18, 147-55.

DE LA ROSA L. A., ALVAREZ-PARRILLA E., GONZALEZ-AGUILAR G. A. (2009). Fruit and vegetable phytochemicals : Chemistry, Nutritional value and stability. *Edition John Wiley and Sons*,73.

DERBEL S., GHEDIRA K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*, 1, 28-34.

DESPRES J.P.,LEMIEUX I.(2006) .Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444, 881-7.

DI DOMENICO F., FOPPOLI C., COCCIA R., PERLUIGI M. (2012). Antioxidants in cervical cancer: Chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1822, 737-747.

DRAY C.,VALET P., CASTAN-LAURELL I.(2008).Adipokines : quelles nouvelles ?. *Obese*,3, 33-41.

DULUC L., SOLETI R., CLERE N., ANDRIANTSITOHAINA R., SIMARD G.(2012). Mitochondria as potential targels of flavonoids focus on adipocytes and endothelial cells. *Current Medicinal Chemistry*, 19.

DUPAIGNE P. (1970). Les vitaminnes dans les jus et boissons de fruits in « Activités Vitaminique et Technologie Des Denrées Alimentaires ». Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris.

EDEAS M. (2007). Les polyphénols et les polyphénols de thé. *Phytothérapie*. 5, 264-270.

Références bibliographiques

EGITO A-S., GIRARDET J-M., MICILO L AND GAILLARD J-L. (2001). Highly sensitive periodic acid/Schiff detection of bovine milk glycoproteins electotransferred after nondenaturing electrophoresis, urea electrophoresis and isoelectric focusing. *Lait*, 81, 775-785.

EJAZ A., WU D., KWAN P ., MEYDANI M. (2009). Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL Mice. *J.Nutr.*, 139, 919-925.

EL-HACI I., ATIK-BEKKARA F., DIDI A., GHERIB M., DIDI M.N. (2012). Teneurs en polyphénols et pouvoir antioxydant d'une plante médicinale endémique du Sahara algérien. *Phytothérapie*, 10, 280-285.

FALANY C.N. (1997). Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *Faseb J*, 11, 206-216.

FARADET A., SOUCHON I., DUPONT D. (2013). Structure des aliments et effets nutritionnels. 6^{ème} ED, Quae. Paris, 277-278 p.

FERRO-LUZZI A., GARZA C., HAAS J., HABICHT J.P., HIMES J., PRADILLA A., RAMAN L., RANSOME-KUTI O., SEIDELL J.C., VICTORA C., WAHLQVIST M.L ET YIP CHIEF R. (1995). Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Ed. WHO Technical Report Series, Switzerland. 452 p.

FINKELSTEIN E. A. et al. (2012). Obesity and severe obesity forecasts through 2030. *American journal of preventive medicine* 42, 563-570.

FRAGA C.G. (2009). Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology. *John Wiley & Sons Edition*, 5-13.

FRANCIS D.K., VANDEN BROECK J., YOUNGER N. (2009). Fast food and sweetened beverage consumption: association with overweight and high waist circumference in adolescents. *Public Health Nutr.* 12, 1106-1114.

FRIEDMAN J.M., HALAAS J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 395, 763-770.

FUKUCHI Y., HIRAMITSU M., OKADA M., HAYASHI S., NABENO Y., OSAWA T., NAITO M. (2008). Lemon polyphenols suppress Diet- induced obesity by UP-Regulation of mRNA levels of the enzymes Involved in β -oxydation in mouse white Adipose Tissu. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 43, 201-209.

FURUYASHIKI T., NAGAYASU H., AOKI Y., BESSHO H., HASHIMOTO T., KANAZAWA K., ASHIDA H. (2004). Tea Catechin Suppresses Adipocyte Differentiation accompanied by down-regulation of PPAR γ and C/EBP α in 3T3-L1 Cells. *Biosci. Biotechnol- Biochem*, 68, 2353-2359.

GALVANO F., LA FAUCI L., VITAGLIONE P., FOGLIANO V., VANELLA L., FELGINES C. (2007). "Bioavailability, antioxidant and biological properties of the natural free-radical scavengers cyanidin and related glycosides." *Ann Ist Super Sanita* , 43, 382-393.

Références bibliographiques

GARDES-ALBERT M., BONNEFONT-ROUSSELOT D., ABEDINZADEH Z., JORE D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *Actualité chimique*, 91-96.

GAUCHER E.A., MIYAMOTO M.M., BENNER S.A.(2003). Evolutionary, structural and biochemical evidence for a new interaction site of the leptin obesity protein. *Genetics*, 163, 1549-1553.

GERHARD O. (2010). Diabetes und oxidativer Stress, *Blickpunkt der Mann*, 2, 23, Nr.3.

GHEDIRA K. (2005). Les flavonoides: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 4, 162-169.

GUILHERME A., VIRBASIOUS J.V., PURI V., CZECH M.(2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 367-377.

GUILLOU J.P. PELISSIER and R. GRAPPIN. (1986). Méthodes de dosage des protéines du lait de vache. *Dairy Science and Technology*, 66 / N2, 143-175.

HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J.O., CHARLIER C., CHAPELLE J.P.(2007). Le stress oxydant, *Rev Med Liege*; 62, 628-638.

HANDIQUE J. G., BARUAH, J. B. (2002). Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Functional Polymers*, 52, 163-188.

HETHERINGTON A. W. & RANSON S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* 78, 149-172.

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

HOFBAUER K.G.(2002). Molecular pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26, 18-27.

HOFFMANN L. (2003). Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes; analyse de l'interaction de la caféoyl-coenzyme A 3-O-méthyltransférase (CCoAOMT) avec son substrat et caractérisation fonctionnelle d'une nouvelle acyltransférase, l'HydroxyCinnamoyl-CoA : shikimate/quinate hydroxycinnamoyl Transférase (HCT). Thèse de Doctorat : Université de LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I.

HOMBOURGER C. (2010). Le curcumin, de l'épice au médicament. Thèse de doctorat : Université de HENRI POINCARÉ, NANCY 1.

HOPKINS W. G. (2003). Physiologie végétale. *De Boeck Supérieur*, p 280.

HUANG Y.W., LIU Y., DUSHENKOV S., HOC T., HUANG M.T. (2009). Anti-obesity effects of épigallocatechin-3-gallate, orange peel extract, black tea extract, caffeine and their combinations in a mouse mode. *Journal of Functional Foods*, 304-310.

Références bibliographiques

HUSZAR D et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.

INGALLS A. M., DICKIE M. M. & SNELL G. D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of heredity* 41, 317-318

JEAN-DENIS J. B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de NEUCHÂTEL.

JOFFIN N. (2015). Impact de la citrulline sur le métabolisme du tissu adipeux. Thèse de Doctorat : Université Paris Descartes, Paris, France.

KANDJI N.A.(2001). Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales consommées au senegal, thèse Doctorat, université Chiekh Anta Diop de DAKAR, Senegal.

KEBBAB R. (2014). Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété *Chamlal* : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Mémoire de Magister en Biochimie appliquée aux bioindustries : Université Mouloud MAMMERIE, Tizi Ouzou, Alger.

KENNEDY G. C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. *Royal Society*, 140, 578-596.

KLEIN S. (2010). Is visceral fat responsible for the metabolic abnormalities associated with obesity? : implications of omentectomy. *Diabetes Care* 33, 1693-1694.

KOECHLIN-RAMONATA XO C. (2006). Oxygène, stress oxydant et supplémentation antioxydante ou un aspect différent de la nutrition chimique et métabolique. 20 , 165-177.

KRETSCHMER B.D., SCHELLING P., BEIER N., LIEBSCHER C., TREUTEL S., KRQGER N., SCHOLZ H.P., HAUS A. (2005). Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Science*, 76, 1553–1573.

LAEMMLI U.K and FAVRE H. (1973). Maturation of the head bacteriophage T4 I DNA packaging events. *Journal of Molecular Biotechnology*, 80, 575-599.

LAISSOUF A., MOKHTARI SOULIMANE N-A ; MERZOUK H.(2014). L'effet thérapeutique de l'huile de lin « *linum usitatissimum* » sur l'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie chez des rats obèses âgés. *Afrique Science*. 10, 409 - 418.

LAMAS O., MARTÍNEZ J.A., MARTI A.(2004). Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15, 418-425.

LEAN M.E.(2000). Pathophysiology of obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 59, 331-336.

Références bibliographiques

- LECERF J. M. (2012).** Effets métaboliques du curcumin (obésité, lipides circulants, insulino-résistance, diabète et athérosclérose). *Phytothérapie*, 10, 100-104.
- LEE G. H et al. (1996).** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.
- LEE I.T., CHANI Y.C., LIN C.W., LEE W.J., SHEU W.H.-H. (2008).** Effects of cranberry extracts on lipid profiles in subjects with type 2 diabetes. *Diabet.Med*, 25, 1473-1477.
- LENOIR L. (2011).** Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un modèle d'inflammation colique chez le rat. Thèse de Doctorat : Université D'Auvergne.
- LINK A., BALAGUER F., GOEL A. (2010).** Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, 80, 1771-1792.
- LIU H. F., WU B. H., FAN P. G., LI S. H ET LI L. S. (2006).** Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* .86, 1526-1536.
- LOWELL B. B et al.(1993).** Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-742.
- LUBRANO-BERTHELIER C., CLEMENK.(2005).** Génétique de l'obésité humaine. *Elsevier Masson*, 26, 802-811.
- MACHEIX J.J., FLEURIET A., SARNI-MANCHADO P. (2006).** Les Polyphénols en agroalimentaire. Technique et Documentation, *Lavoisier, Paris*, 1-28 p.
- MACHEIX J.-J., FLEURIET F., JAY-ALLEMAND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *PPUR presses polytechniques*, p 134.
- MANACH C., SCALBERT A., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- MANACH C., SCALBERT A., REMESY C., MORAND C. (2006).** Consommation et disponibilité des polyphénols. In: Les polyphénols en agroalimentaire. P. Sarni-Manchado and V. Cheyrier (Ed). *Paris, Lavoisier*, 361-380.
- MANACH C., WILLIAMSON G., MORAND C., SCALBERT A., REMESY C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 81, 230S-242S.
- MAN Q., HE L.(2009).** Effects of high-sugar and high-fat diet on growth and carbohydrate, lipid metabolism in Wistar rats. *Journal of Hygiene research*, 38, 722-724.

Références bibliographiques

MARTA G-C., ARANTXA R-C. (2011).Dietary Phytochemicals and their potential effects on obesity : A review. *Pharmacological Research*, 64, 438-455.

MATI A .,MESBAHI M ., BELKACEMI Y et MOULTI-MATI F. (1998). Composition et phénotypage protéique du lait de chèvre local de race saanen. Journées sur les productions laitières, 20 et 21 mai, Institut Vétérinaire de Blida.

MAZEN I., EL-GAMMAL M., ABDEL-HAMID M, AND AMR K.(2009). A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Mol Genet Metab.* 97, 305-8.

MCDUGALL G.J., NULKARNI N.N., STEWART D. (2009).Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. *Food Chemistry*, 115, 193-199.

MELMED S., WILLIAMS R. H.(2011).*Williams textbook of endocrinology*. 12th ed. / SHLOMO MELMED . [et al.] edn, (Philadelphia : Elsevier/Saunders).

MENDES K.L.,PINHO L.D., ANDRADE J.M.O.,PARAISO A.F., LULA J.F.,MACEDO S.M., FELTENBERGER J.D., GUIMARAES A.L.S., PAULA A.M.B.D., SANTOS S.H.S.(2016).Distinct metabolic effects of resveratrol on lipogenesis markers in mice adipose tissue treated with high-polyunsaturated fat and high-protein diets. *Life Science*, 153, 66-73.

MOHAMED S. (2014). Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes,hypertention and dyslipidemia) and cardiovascular disease. *Trends in Food Science Technology*,35, 114-128.

MOHAMED G.A., IBRAHIM S.R.M., ELKHAYAT E.S., SAIAHEIDINE R. (2014). Naturel anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 52, 269-284.

MORAND C .,MILENKOVIC D. (2014). Polyphénols et protection vasculaire : effet bénéfiques des agrumes. *Innovations Agronomiques*, 42, 47-62.

MORO C.O.,BASILE G. (2000). Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia*,71, S73–S82.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé).(2003).Obésité : prévention et prise en charge de l'épidémie mondiale. Rapport d'une consultation de l'OMS. Genève. *Série de rapports techniques*, 894, 15-16.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé).(2013).Données et statistiques. Statistiques sanitaires mondiales 2012. Ed. OMS,Suisse. 180 p.

PANCHAL S.K., AND BROWN L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 351982.

PARILLO M., RICCARDI G.(2004).Diet composition and the risk of Type 2 diabetes: epidemiological and clinical evidence. *British Journal of Nutrition*, 92, 7-19.

PETERSON J ., DWYER J .,ADLERCREUTZ H ., SCALBERT A ., JACQUES P ., MCCULLOUGH M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68, 571–603.

Références bibliographiques

PISKULA M.K., TERAO J (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr*, 128, 1172-1178.

PORTET B. (2007). Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de Doctorat : Université de TOULOUSE.

PUY H. (2012). Cours n°7 : Introduction aux radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène , UE 1: Biochimie, Ronéo n°4, p1-p12.

RAHUL B., BIRARI AND KAMLESH K., BHUTANI. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from naturel sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*, 12, 19-20.

RASTMANESH R. (2011). Hight polyphenols, low probiotic diet for weight loss because of intestinal microbiota interaction. *Chimico-Biological Interaction*, 189, 1-8.

RAVUSSIN E., LILLIOJA S., ANDERSON T. E., CHRISTIN L. & BOGARDUS C. (1986). Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *J Clin Invest*, 78, 1568-1578.

REAVEN G. (2005). All obese individuals are not created equal: insulin resistance is the major determinant of cardiovascular disease in overweight/obese individuals. *Diab Vasc Dis Res*, 2, 105-12.

REMEUF F. et LENOIR J. (1985). Caractéristique physicochimique du lait de chèvre. *Recherche Laitière Française*, 446, 32-40.

ROBERFROID M., COXAM V., DELZENNE N. (2007). Aliments Fonctionnels. Techniques et Documentation, 2^{ème} ED. Lavoisier, Paris. 255p.

RUPASINGHE H.P.V., SEHON-LOODU S., MANTSO T., PANAYIOTIDIS M.I. (2016). Phytochemicals in regulating fatty acid β -oxydation : potential underlying mechanisms and their involvement in obesity and weight loss. *Pharmacology and therapeutics*.

SCALBERT A., MANACH C., MORAND C., REMESY C., JIMENEZ L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 287-306.

SCHLIENGER J.L., LUCA F., VINZIO S., PRADIAGNAC A. (2009). Obésité et cancer. *La revue de médecine interne*, 30, 776-82.

SERGEANT T., VANDERSTRAETE N., WINAND J., BEGUIN P., SCHNEIDER Y.J. (2012). Phenolic compounds and plant extracts as potential naturel anti-obesity substances. *Food Chemistry*, 135, 68-73.

SHAHZYA S.H LAUREN E.B., NAVEED S. (2010). Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15, 70-76.

Références bibliographiques

SHALLENBERGER ET BIRK. (1975).in LEE et NAGY (1988).

SHI D; CHEN C., ZHAO S., GE F.,LIU D., SONG H.(2014). Walnut Polyphenols inhibit Pancreatic Lipase Activity in vitro and have hypolipidemic effect on high-fat diet- induced obese Mice. *Journal of Food and Nutrition Research*, 10, 757-763.

SILVIYA G., LUBOMIR B.,GEORGE A.(2010). Caractérisation des vins bulgares par leur capacité antioxydante, *Revue de Génie Industriel*, 5, 124-132.

SINE J-P. (2008). Module de Biochimie Analytique et de Biologie Moléculaire pour les Biotechnologies (S4B0600), p 108 (p 16- p 19).

SKURK T., HAUNER H.(2004).Obesity and impaired fibrinolysis : role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 1357-64.

SPENCER J.P.E., ABD EL MOHSEN M.M., RICE-EVANS C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 423, 148-161.

SPENCER J.P. (2008A). Flavonoids: modulators of brain function?. *Br J Nutr*, 99, ES60 - 77.

SPENCER J.P., CHOWRIMOOTOO G.,CHOUDHURY R., DEBNAM E.S., SRAI S., RICE –EVANS C. (1999).The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*, 458, 224-230.

SRIVASTAVA N., LAKHAN R & MITTAL B. (2007).Pathophysiology and genetics of obesity. *Indian journal of experimental biology*, 45, 929-936.

STAGOS D., AMOUTZIAS G. D., MATAKOS A., SPYROU A., TSATSAKIS A. M., KOURETAS D. (2012). Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology* , 50, 2155–2170.

STEINHILBER D et al.(2005).Medizinische Chemie, Targets und Arzneistoffe, 1. Aufl., Deutscher Apotheker Verlag , page 381

SUGIYAMA H., AKAZOM Y., SHOJ T., YAMAGUCHI A., YASUE M., KANDA T., OHTAKE Y. (2007). Oligomeric Procyanidins in Apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Agric.Food Chem*,55, 4604-4609.

SUZUKI R., TANAKA M., HUSSAIN A., YUAN B., TOYODA H., KUROD M.(2011). Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway.*Nutrition and Metabolism*, 8, 14.

TAPAS A. R., SAKARKAR D. M., KAKDE R. B. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 1089-1099.

TARTAGLIA L. A et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* ,83, 1263-1271.

Références bibliographiques

- TILGMANN C., ULMANEN I. (1996).** Purification methods of mammalian catechol-Omethyltransferases. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 684, 147-161.
- TOULEMONDE M ET DESAGE S-F. (2009).** La Lyophilisation ou Cryodessiccation, Université Jean Monnet de Saint-Etienne.
- UCHIYAMA S., TANIGUCHI Y., SAK A., YOSHIDA A., YAJIMA H. (2011).** Prevention of diet induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition*, 27,287-292.
- VANCE V., HANNING R. (2004).** L'obésité infantile. *Documentation*, 21, 1-3.
- VAUZOUR D., RODRIGUEZ-MATEOS A., CORONA G., ORUNA-CONCHA M. J., SPENCER J. P. E. (2010).** Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2, 1106-1131.
- VAZQUEZ-VELA M.E.,TORRES N., AND TOVAR A.R. (2008).** White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*. 39,715-28.
- VERSTRAETEN S.V., KEEN C.L., SCHMITZ H.H., FRAGA C.G., OTEIZA P.I. (2003).** Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med*, 34, 84-92.
- VOET D., VOET JG (2005).** Lipides et membranes Biochimie. Ed Deboek isbn, p : 439-446.
- WANG S., MOUSTAID-MOUSSA N., CHE L., MO H; SAASTRI A., SU R; BAPAT P., KWUNT I., SHEN C.(2014).**Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *Journal of Nutritionnal Biochemistry*,25, 1-18.
- WANG J.C., CHEN C.Y., WHEN H.C., LU H.C., CHANG C.H.(2015).**Biphasic effects of resveratrol on adipogenesis: low doses of resveratrol promote adipogenesis via induction of CD 36. *J .Nutri.Health*, 1, 8.
- WESTERTEP-PLANTENGA M.S., SARIS W.H;HUKSHORN C.J., AND CAMPFIELD L.A. (2001).** Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr*. 74, 426-34.
- WHO. (2000).**Obesity: preventing and managing the global epidemic. World Health Organ *Tech Rep Ser*, 894, 1-253.
- WILLIAMS D.J., EDWARDS D., HAMERNIG I., JIAN L., JAMES A.P., JOHNSON S., TAPSELL L.C. (2013).** Vegetables Containing Phytochemicals with Potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*, 52, 323-333.
- WOLF H.K., TUOMILEHTO J., KUULASMAA K., DOMARKIENE S., CEPAITIS Z., MOLARIUS A., SANS S., DOBSON A., KEIL U., RYWIK S.(1997).**Blood pressure levels in the 41 populations of the WHO MONICA project. *J Hum Hypertension*, 11, 733-42.

Références bibliographiques

WU C.H., CHEN S.C., OU T.T., CHYAU C.C., CHANG Y.C., WANG C.J. (2013). Mulberry leaf polyphenols extracts reduced hepatic lipid accumulation involving regulation of adenosine monophosphate activated protein Kinase and lipogenic enzymes. *Journal of Functional Foods*, 5,1620-1632.

YOHAN R. (2004). Antioxydants naturels végétaux, Burgundy Botanical Extracts, Actiparc de Pont de Vaux, Les Chapelles Sud, 01190 Reyssouze – France,6, 419-424.

YU L.L., WANG R.L., ZHANG Y.Z., KLEEMANN D.O., ZHU X.P., JIA Z.H. (2008). Effects of selenium supplementation on polyunsaturated fatty acid concentrations and antioxidant status in plasma and liver of lambs fed linseed oil or sunflower oil diets. *Animal Feed Sci Technol*, 140,39–51.

ZHANG Y et al. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.

ZIEGLER O ., QUILLIOT D ., GUERCI B.(2000). Physiopathologie de l'obésité. Elsevier Masson.61, 3-56.

Annexes

Annexes

Annexe 01 : Détermination de la teneur en protéines par la méthode de Bradford *et al* (1976)

Préparation des solutions :

- la solution de NaCl à 0,15 M : Peser 1,75 g de NaCl et le dissoudre dans l'eau distillée, agiter pour mieux homogénéiser la solution puis la verser dans une fiole de 200 ml et ajuster avec l'eau distillée jusqu'au ménisque.

- la solution de BSA : à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine à 0,1mg/ml, préparer les 10 ml dont on a besoin pour notre expérience.

-Préparation de la gamme d'étalonnage :

A partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (0,1mg/ml), on prépare les solutions suivantes :

Numéro de tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère (BSA) (ml)	0	0,1	0,5	1	1,5	2
NaCl (0,15 M) (ml)	2	1,9	1,5	1	0,5	0
Réactif de Bradford (ml)	1 ml dans tous les tubes					

-Préparation des dilutions : pour les 3 échantillons (lait de vache, lait de Candia et lait de sachet) : réaliser trois dilutions pour les protéines totales et deux dilutions pour les protéines sériques.

-Mettre 2 ml de la solution à doser (ou des différentes dilutions) dans des tubes à essai ;

-ajouter 1ml de réactifs de Bradford ;

-Laisser 5 minutes à température ambiante ;

-lire l'absorbance à 595 nm ;

Expression des résultats :

A partir de la courbe d'étalonnage des protéines, on obtient l'équation de la courbe de tendance ($Y = ax$), la concentration en protéines de notre échantillon respectif sera obtenue en appliquant les valeurs des densités optiques obtenues dans l'équation.

DO	0	0.099	0.195	0.296	0.472	0.63
[BSA]	0	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2

Annexe 02 : Dosage des glucides, méthode utilisant l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS)

-On réalise une gamme étalon à partir d'une solution de glucose à des concentrations différentes à qui on ajoute le réactif 3-5 DNS ;

-Préparation des différentes dilutions de l'échantillon (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) ;

-On prend 1ml des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} de notre échantillons (jus Ramy enrichi en vitamines) dont sa concentration est inconnue, au quels on ajoute 2 ml de DNS ;

-On bouche chaque tube en homogénéisant au vortex, on porte les tubes au bain marie bouillant pendant 5 min, on refroidie dans de l'eau froide, on complète le volume de chaque tube à 10 ml avec l'eau distillé et en laisse les tubes reposer 15 min à température ambiante.

-On lit la densité à une longueur d'onde de 530 nm contre le blanc.

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

Expression des résultats :

A partir de la courbe d'étalonnage des sucres, on obtient l'équation de la courbe de tendance ($Y = ax$), la concentration en sucres de notre échantillon respectif sera obtenue en appliquant les valeurs des densités optiques obtenues dans l'équation.

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

Les concentrations en glucose (g/l)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Les densités optiques (nm)	0	0.081	0.260	0.451	0.648	0.782

Annexe 03 : Détermination de l'indice d'acide d'une matière grasse

1-Indice d'acidité :

Peser 2.5g de matière grasse dans deux béchers pour deux échantillons différents : l'huile d'olive et l'huile de tournesol, puis les dissoudre dans 5 ml d'éthanol, mélanger soigneusement puis titrer avec la solution de KOH (burette) en présence de phénolphtaléine (3 gouttes) en agitant vigoureusement le contenu de bécher pendant le titrage.

Arrêter le titrage quand la coloration rose – pale persiste pendant au moins 10 min.

Noter la chute de burette (volume de KOH).

Calcul de l'acidité :

$$IA = \frac{V \cdot N \cdot 56.1}{m}$$

Soit :

V : Volume en ml de la solution de KOH utilisé pour le titrage.

N : est la normalité de la solution de KOH.

56,1 : est la masse molaire, exprimée en grammes par mole, de l'hydroxyde de potassium ;

m : masse en gramme de la prise d'essai.

2-L'indice d'iode :

Principe :

- ✓ Préparer un essai à tube sans la prise d'essai : introduire dans un tube 5 ml de lugol et quelques 2ml d'amidons.
- ✓ Préparer les tubes d'échantillons : introduire des matières grasses dans deux béchers pour deux échantillons différents (huile d'olive et l'huile de tournesol), solubiliser la matière grasse dans 4 ml de cyclohexane, ajouter 5ml de lugol.

-Porter les trois tubes au bain marie (bien homogénéiser le long du chauffage) pendant 5 min.

-Titrer l'iode libéré avec le thiosulfate de sodium à 0.1N en présence de quelques gouttes d'empois d'amidons jusqu'à décoloration du mélange.

-déterminer les volumes de thiosulfate nécessaires pour neutraliser l'iode contenu dans le tube témoin V1 et l'échantillon V2.

Le calcul de l'indice d'iode est donné par la formule suivante :

$$I_i (\text{g}/100\text{g}) = (V_0 - V) \cdot 0.01269 \cdot 100/P$$

Soit :

I_i : indice d'iode.

V_0 : volume de thiosulfate de sodium utilisé pour essai à blanc.

V : volume de thiosulfate de sodium utilisé pour titrer l'excès d'iode en ml.

0.01269 : nombre de grammes d'iode correspondant à 1 ml de thiosulfate de sodium.

p: poids de la prise d'essai.

Puis on détermine le nombre d'insaturation qui est donné par l'équation suivante :

$$nI = I_i \cdot m / MI_2 \cdot 100$$

Soit :

nI : nombre d'insaturation m : masse de corps gras MI_2 : masse molaire d'iode.

Annexe 04 : Détermination de la teneur en vitamine C

Mode opératoire :

Préparation de la solution de 2,6 dichlorophénol indophénol (DCPIP) à 0.5g/l :

- Dissoudre 0.5g du 2,6 dichlorophénol indophénol et 0.2g de bicarbonate de sodium dans 300 ml d'eau distillée chaude. Refroidir et compléter à 1000 ml avec l'eau distillée, puis filtrer.

Solution titrée d'acide ascorbique :

- Dissoudre 0.4g d'acide ascorbique pur dans 200ml d'eau distillée, ajuster à un litre. Prendre 100 ml de cette solution dans un bécher, ajouter 5ml d'acide acétique glacial et doser par le colorant jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante. Noter le volume V_1 correspondant du colorant ajouté.

Dosage de la vitamine C contenue dans les différents échantillons de jus :

- Prendre 2 ml de jus dans un bécher, ajouter 1 ml l'acide acétique glacial puis doser par le colorant (DCPIP) jusqu'apparition d'une couleur rose pâle persistante. Prendre le volume V_2 du colorant nécessaire ayant réagit avec la solution à doser.

Expression des résultats :

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

$$C_2 (\text{g/l}) = V_1 \times C_1 / V_2$$

Soit :

C_2 : la concentration de l'échantillon en vitamine C.

V_1 : le volume de DCPIP versé de la burette nécessaire pour le dosage de la solution étalon.

V_2 : le volume de DCPIP versé nécessaire pour le dosage de l'échantillon du jus

Annexe 05: les densités optiques des fractions éluées par chromatographie de perméation sur gel de SEPHACRYL S200 (protéines sériques) pour la colonne de 30cm.

V en ml	0 → 10	11	12 → 13	14	15	16	17 → 18	19 → 20	21	22	23	24 → 46	47 → 49	50	51	52	53 → 56
DO en	0	0.1	0.2	0.1	0.07	0.05	0.2	0.3	0.2	0.1	0.08	0	0.15	0.16	0.13	0.07	0

Annexe 06 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-native)

- **Solution d'acrylamide :**

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

- **Tampon de gel (B) :**

Tris.....4,57 g
 Eau distillée.....50 ml
 Ajuster à Ph 8,9 avec de HCL 4N

- **Tampon d'électrode :**

Tris.....3 g
 Glycine.....14,4 g
 Eau distillée.....500 ml
 Ajuster à Ph 8,3

- **Tampon d'échantillon (les fractions récupérées par la chromatographie de perméation sur gel de Séphacryl S200 des protéines sériques du lait de vache) :**

Tampon du gel (B)..... 100 µl
 Eau distillée.....700 µl
 Glycérol 50%.....250 µl
 Bleu de Bromophénol.....une tête d'aiguille
 Dissoudre 1 mg de protéine lyophilisée dans 1 ml de ce tampon

- ❖ **Electrophorèse :**

Préparation du gel : T = 12% et C = 2,7%

Solution (A).....3,25 ml
 Solution (B).....5 ml
 Eau distillée.....1,68 ml
 Dégazer le mélange (maximum 2 mn)
 TEMED.....20µl
 Solution de persulfate d'ammonium 10%.....75µl
 Couler et mettre le peigne immédiatement
 Dépôt d'échantillon.....10 à 20µl
 Mise sous tension20 mA, 25 V
 Fixation : 45 mn dans la solution de fixation
 Coloration : 1 heure dans la solution de coloration
 Décoloration : dans la solution de décoloration

Annexe 07 : Electrophorèse en conditions non dissociantes et non dénaturantes (PAGE-SDS)

- **Solution d'acrylamide :**

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

- **Tampon de gel de séparation :**

Tris..... 9,25 g
Eau distillée.....50 ml
Ajuster à Ph 8,8 avec de HCL 4N

- **Tampon de gel de concentration (solution C)**

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

- **Tampon d'électrode :**

Tris.....3 g
Glycine.....5,76 g
SDS.....0,2 g
Eau distillée.....500 ml
Ajuster à Ph 8,3

- **Tampon d'échantillon :**

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

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

- **Solution de fixation :**

TCA.....12 g
Eau distillée.....100 µl

- **Solution de coloration :**

Bleu de Coomassie R250.....0,5 g
TCA.....4 g
Méthanol.....100 ml
Eau distillée.....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.....1 ml

- **Conduite d'électrophorèse :**

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

Solution (A).....4,60 ml
Solution (S).....2,51 ml
Eau distillée.....2,73 ml

Dégazer pendant 2 mn maximum

SDS 10%.....100 μ l

TEMED.....50 μ l

Persulfate d'ammonium 10%.....100 μ l

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

Dépôt d'échantillon : 10 à 20 μ l

Mise sous tension : 20 mA, 25 V

Fixation : 45 minutes dans la solution de fixation

Coloration : 1 heure dans la solution de coloration

Décoloration : dans la solution de décoloration.