

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAÏD
FACULTÉ DE MÉDECINE
DR. B. BENZERDJEB - TLEMÇEN



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة عبد القادر باقر بلقايد
الكلية الطبية
د. بابين زرجب بنزور

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES POUR
L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE

THÈME :

ETUDE DE LA MIGRATION ELECTROPHORETIQUE DES LIPOPROTEINES
SERIQUES APRES OXYDATION IN VITRO

Présenté par :

M^{lle} DEBBAL Hadjer .

M^{lle} GAOUAR Kamar.

Soutenu le 28/06/2017.

Jury

Dr. MEGHELLI Sidi Mohammed	: Maitre assistant en biophysique médicale	Président
Dr. KLOUCHE Yacine	: Pharmacien assistant en biochimie	Examineur
Dr. SIB Yasser	: Pharmacien assistant en biochimie	Examineur
Dr. AZMANI Nassima	: Pharmacienne assistante en biochimie	Examinatrice
Dr. BENAOUA Mohammed	: Maitre assistant en biophysique médicale	Encadreur

Année universitaire 2016-2017

Remerciements

Louange à Dieu de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire

On remercie Dr Mohammed BENAOUA maître assistant en biophysique médicale d'avoir encadré ce mémoire. Merci pour l'intérêt permanent que vous avez porté à ce travail, pour vos idées scientifiques et remarques toujours pertinentes ainsi que pour votre disponibilité.

On remercie le Pr Mohamed BENYOUCEF professeur en biophysique médicale et ancien médecin chef du laboratoire de biochimie. Merci pour votre disponibilité, votre soutien et vos conseils avisés dont vous nous avez fait part tout au long de notre stage. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde gratitude et de notre respect le plus sincère.

On tient à remercier les membres du jury, Dr Sidi-Mohammed MEGHILLI maître assistant en biophysique médicale, Dr Yassine KLOUCHE pharmacien assistant en biochimie et Dr Yasser SIB pharmacien assistant en biochimie, qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail. Permettez nous de vous adresser nos reconnaissances les plus sincères.

La réalisation de ce travail n'aurait pu se faire sans la présence, la participation et la collaboration d'un grand nombre de personnes que l'on tient également à remercier. Merci au Dr Salim BENAMARA maître assistant en hydro-bromatologie, au Pr Mustapha HADDOUCHE, au Pr Sidi Mohammed DEBBAL professeur en génie biomédicale et chef d'équipe de recherche, au Pr Amina ROSTANE professeur en oncologie, au Dr Suheil GAOUAR maître de conférence et chef de formation en génétique appliquée, au Dr Souhila GUENDOZ maître assistante en pharmacie galénique et au Dr Mohammed DEBBAL.

Merci à tout le personnel du laboratoire de Biochimie Mr Benbrahim Ali, Mme Ghaffour Fadia et Azzouni Fouzia et en particulier à Zina BENYOUCEF et Khadidja BENCHACHOU pour tout votre soutien.

Et enfin merci à nos collègues Othman BASSAID et Abderahmane AISSAOUI pour votre dons de sang.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

A Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A ma très chère sœur cadette Imane qui a été pour moi de par sa tendresse et sa générosité d'un grand secours pour la finalisation de ce mémoire.

A ma très chère amie et sœur , ma binôme kamar chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin

A toute personne m'ayant aidé de près ou de loin qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance

Hadjer

Je dédie ce modeste travail comme un témoignage d'affection, de respect et d'admiration:

A mon père, qui m'a toujours soutenu et appris à donner le meilleur de moi-même aujourd'hui je te dédie ce modeste travail en témoignage de mon amour et de mon immense gratitude, je ne te remercierai jamais assez papa pour tous tes efforts et sacrifices consentis pour mon instruction et mon bien-être.

A ma mère, qui est mon exemple de courage et de patience, c'est grâce à toi que j'ai pu mener ce travail à terme et grâce à toi que j'ai pu faire ce petit bout de chemin, tu es ma force et notre pilier. Que Dieu te garde pour nous.

A mon cher mari, tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude et mon affection Tu m'a toujours soutenu et encouragé à aller de l'avant. Tu es et tu resteras la source de ma joie et de mon bonheur. Merci

A mon petit frère, merci de m'avoir supporté durant cette année pénible et d'avoir su me redonner le sourire à chaque fois quand j'en avais besoin. Je serai toujours là pour toi et je souhaite que ce travail soit pour toi une source d'encouragement afin que tu persévères dans tes études.

A ma belle famille, ce travail est le fruit de vos soutiens, encouragements, conseils et de votre aide précieuse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de toute mon affection.

A ma chère binôme, plus qu'une amie tu es une sœur pour moi. On s'est connu dans la joie, on a mûri dans la souffrance et par la grâce de Dieu, on a survécu !! Merci pour toutes ces années passées ensemble et pour toutes ces fois où j'ai pu compter sur toi.

Kamar

« Seul on peut aller vite, ensemble on peut aller loin »

Proverbe africain

Liste des figures

Figure 1: Représentation tridimensionnelle d'une membrane biologique	7
Figure 2: Classification des lipides	8
Figure 3: La structure des triglycérides	10
Figure 4: Etapes principales dans la digestion des TG alimentaires impliqués dans l'absorption des AG et leur devenir métabolique	10
Figure 5: La structure du cholestérol	11
Figure 6: La structure d'une lipoprotéine	13
Figure 7: Métabolisme des chylomicrons	18
Figure 8: Métabolisme des VLDL	18
Figure 9: Captation et catabolisme des LDL	20
Figure 10: Métabolisme des HDL	20
Figure 11: Appareil d'électrophorèse d'Arne Tiselius	23
Figure 12: Electrophorèse des lipoprotéines sur plaque d'acétate de cellulose	25
Figure 13: La balance d'équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants	28
Figure 14: Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène	29
Figure 15: Phase d'initiation de la peroxydation lipidique	34
Figure 16: Phase de propagation des la peroxydation lipidique	34
Figure 17: Phase de terminaison de la peroxydation lipidique	34
Figure 18: Etapes du prélèvement sanguin	48
Figure 19: Etapes de préparation de la solution mère de CuSO_4 à 10mmol/l	50
Figure 20: Etapes de préparation de la solution fille de CuSO_4 à 2mmol/l	51
Figure 21: Etapes de préparation de la solution fille de H_2O_2 à 1mmol/l	52
Figure 22: Etapes de préparation de la solution mère de vitamine C à 28 mmol/l	53
Figure 23: Etapes de préparation de la solution tampon	54
Figure 24: Etapes de préparation de la solution de coloration « rouge oro »	54
Figure 25: Etapes de préparation de la solution de NaOH à 1mol/l	55
Figure 26: Préparation de la chambre d'électrophorèse	62
Figure 27: Préparation de la plaque d'acétate de cellulose	63
Figure 28: Migration des lipoprotéines	64

Figure 29: Coloration des lipoprotéines	64
Figure 30: Lavage de la plaque d'acétate de cellulose	65
Figure 31: Scan de la plaque d'acétate de cellulose	65
Figure 32: Etapes de lecture de la plaque d'acétate de cellulose par le logiciel imagej	67
Figure 33: Profil électrophorétique des lipoprotéines sériques	69
Figure 34: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de CuSO_4	70
Figure 35: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H_2O_2	72
Figure 36: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de CuSO_4 et de vitamine C	73
Figure 37: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H_2O_2 et de vitamine C	75
Figure 38: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de vitamine C	77
Figure 39: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H_2O_2 et de vitamine E	78
Figure 40: Profils électrophorétiques des LDL en présence et en absence de CuSO_4	80
Figure 41: Profils électrophorétiques des HDL en présence et en absence de CuSO_4	81
Figure 42: Profils électrophorétiques des LDL en présence et en absence de H_2O_2	83
Figure 43: Profils électrophorétiques des HDL en présence et en absence de H_2O_2	84

Liste des tableaux

Tableau 1: Les apolipoprotéines et leurs sous-types	13
Tableau 2: Propriétés physico-chimiques des lipoprotéines	15
Tableau 3: Composition des principales lipoprotéines :	15
Tableau 4: Les quatre principales lipoprotéines et leurs fonctions :	16
Tableau 5: principaux radicaux libres dans les systèmes biologiques :	30
Tableau 6: principaux oxydants non radicalaires :	31
Tableau 7: les antioxydants et leurs principales propriétés	39
Tableau 8: Liste des appareils utilisés	44
Tableau 9: Liste des réactifs utilisés	46
Tableau 10: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 1 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C :	56
Tableau 11: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 2 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C	57
Tableau 12: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 3 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C	57
Tableau 13: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 3 en fonction de la concentration de H_2O_2 et de la vitamine C et E	58
Tableau 14: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 4 en fonction de la concentration de H_2O_2 et de la vitamine C	59
Tableau 15: Préparation des échantillons à partir des fractions du sérum N° 1 et 3 en fonction de la concentration de CuSO_4	60
Tableau 16: Préparation des échantillons à partir des fractions du sérum N° 4 en fonction de la concentration de H_2O_2	61
Tableau 17: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines oxydées par CuSO_4	71
Tableau 18: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines oxydées par H_2O_2	72
Tableau 19 : Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins, lipoprotéines oxydées par CuSO_4 et des lipoprotéines en présence de CuSO_4 et de vitamine C	74
Tableau 20: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoin, des lipoprotéines oxydées par H_2O_2 et des lipoprotéines en présence de H_2O_2 et de vitamine C	75

Tableau 21 : Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines en présence de vitamine C	77
Tableau 22 : Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines en présence de vitamine E.....	79
Tableau 23: Distance et vitesse de migration des LDL témoins et des LDL oxydées par CuSO_4	80
Tableau 24 : Distance et vitesse de migration des HDL témoins et des HDL oxydées par CuSO_4	82
Tableau 25 : Distance et vitesse de migration des LDL témoins et des LDL oxydées par H_2O_2	83
Tableau 26 : Distance et vitesse de migration des HDL témoins et des HDL oxydées par H_2O_2	85

Liste des abréviations

ACAT : Acyl-coenzymeA Cholestérol Acyl Transférase

Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A

AGPi : Acides Gras Polyinsaturés

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AG : acide gras

Apo : apolipoprotéine

CAT : Catalase

COX : Cyclo-Oxygénase

Cu : Cuivre

CuSO₄ : Sulfate de Cuivre

Cyt p450 : Cytochrome p450

ED : Eau distillée

ERO : Espèce Réactive d'Oxygène

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

GC : Chromatographie

GSH : Glutathion réduit

GR : Glutathion Réductase

GPx : Glutathion peroxydase

DETBA : Acide diethylthiobarbiturique

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

HDL : lipoprotéine de haute densité

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthyle-glutaryl coenzyme A

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

HNE : 4-hydroxynonanal

IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire

KDa : Kilo Dalton

LCAT : Lécithine-Cholestérol Acyl Transférase

LDL : lipoprotéine de faible densité

LA : lipase acide

LH : lipase hépatique
LPL : lipoprotéine lipase
LPO : Produits d'Oxydation des Lipides
LOX : Lipo-Oxygénase
MDA : Malonaldéhyde
MS : Spectroscopie de Masse
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NOS : Oxyde Nitrique synthase
PAF : Facteur d'activation des plaquettes
pH : potentiel hydrogène
Se : Sélénium
SOD : superoxyde dismutase
TG : triglycérides
TBA : Acide thiobarbiturique
VLDL : lipoprotéine de très faible densité
Q10 : cofacteur enzymatique 10
Zn : Zinc

Table des matières

Liste des figures.....	i
Liste des tableaux.....	iii
Liste des abréviations.....	v
INTRODUCTION GENERALE	1
I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1 : Les lipoprotéines	5
1. Généralités sur les lipides :.....	6
2. Principaux lipides :.....	9
2.1. Triglycérides :	9
2.2. Cholestérol :	11
3. Les lipoprotéines :.....	12
3.1. Classification et fonctions des lipoprotéines :.....	14
3.2. Métabolisme des lipoprotéines :.....	17
Chapitre2 :L’exploration des lipoprotéines par électrophorèse	20
1. Historique :.....	22
2. L’exploration des lipoprotéines par électrophorèse :	24
Chapitre 3 : Le stress oxydant	26
1. Généralités :.....	27
2. Origine du stress oxydant :.....	28
3. Peroxydation lipidique :	32
3.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique :	32
3.2. Oxydabilité des lipoprotéines :.....	35
3.3. Méthodes d’analyse :.....	37
4. Les antioxydants :.....	38
4.1. Antioxydants enzymatiques :	38
4.2. Antioxydants non enzymatiques :	38
II. PARTIE PRATIQUE.....	40
Chapitre 1 : Matériels et méthodes.....	42

1. Objectif :	43
2. Type et lieu de l'étude :	43
3. Matériels et réactifs :	43
3.1. Matériels de laboratoire :	43
3.2. Réactifs	45
4. Méthodes :	47
4.1. Prélèvement sanguin :	47
4.2. Dosage des paramètres biochimiques de control :	48
4.3. Préparation des solutions :	49
4.3. Précipitation des lipoprotéines :	55
4.4. Préparation des échantillons :	56
4.6. Electrophorèse des lipoprotéines :	62
Chapitre 2 : Résultats et Discussion	68
1. Résultats :	69
1.1 Effet des oxydants sur les lipoprotéines du sérum total :	70
1.2. Effet des antioxydants sur les lipoprotéines du sérum total :	73
1.3. Effet des oxydants sur les lipoprotéines séparées :	80
2. Discussion :	86
Conclusion :	94
Références bibliographiques	95
Annexes	102

INTRODUCTION GENERALE

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du « stress oxydant », une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés et d'espèces réactives oxydantes toxiques. Les conséquences du stress oxydant sont multiples et importantes, il provoque des lésions de diverses molécules biologiques telles que les lipides par le biais des radicaux hydroxyle qui vont affecter les acides gras polyinsaturés, les protéines étant les plus sensibles aux attaques radicalaires aboutissant à l'inactivation de nombreuses enzymes et protéines de transport, les acides nucléiques en particulier l'ADN et les glucides.

Un intérêt sans cesse croissant est porté à l'étude de l'oxydation des lipides dans les systèmes biologiques par l'intermédiaire de réactions radicalaires en chaîne non contrôlées aboutissant à de nombreux types de lésions cellulaires. Dans les LDL, l'oxydation des lipides joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. L'oxydation des lipides est impliquée également dans la plupart des maladies humaines telles que le cancer, le vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer et le rhumatisme. Pour réguler ces réactions d'oxydation, l'organisme a développé ses propres systèmes de défense antioxydants. De nombreuses études s'accordent aujourd'hui sur l'importance de la contribution des antioxydants dans la lutte contre les maladies associées au stress oxydant.

Dans un souci de prévention, il conviendra donc de disposer d'outils performants permettant d'évaluer correctement le statut de stress oxydant chez un individu afin d'apporter les corrections nécessaires pour optimiser nos défenses antioxydantes et diminuer les dommages oxydatifs induits par les espèces réactives d'oxygène au niveau des lipides, suscitant ainsi les praticiens à rechercher de nouvelles méthodes et technologies pour analyser avec précision les lipides peroxydés.

Nous nous sommes intéressé dans notre étude à « L'électrophorèse » l'une des méthodes de séparation des molécules chargées électriquement qui s'applique principalement à la biochimie et à la biologie moléculaire permettant d'obtenir un rendement de séparation élevé en utilisant un procédé relativement simple, facile d'accès et adapté aux conditions de nos laboratoires en algérie. Les techniques électrophorétiques, en particulier sur acétate de cellulose permettent une différenciation et une évaluation rapide des trois principales fractions

des lipoprotéines (HDL, VLDL et LDL), d'où l'intérêt de cette méthode dans l'évaluation de l'effet de l'oxydation sur les lipoprotéines sériques.

Dans un premier temps nous avons induit une oxydation in vitro des lipoprotéines par deux oxydants (CuSO_4 et H_2O_2) à la fois sur le sérum total et sur les fractions séparées, puis nous avons évalué l'effet de cette oxydation par la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose en comparant les vitesses de migration des différents profils électrophoretiques des lipoprotéines normales et oxydées et enfin nous avons étudié l'effet de deux antioxydants (vitamine C et E) sur les lipoprotéines du sérum total en présence et en absence d'oxydants.

I. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Les lipoprotéines

1. Généralités sur les lipides :

La parfaite connaissance du métabolisme des lipides est importante pour la compréhension de plusieurs domaines biomédicaux d'actualité, tels que l'obésité, l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, etc.

Les lipides forment un groupe hétérogène de composés apparentés d'avantage par leurs propriétés physiques que celles chimiques. Ils ont une propriété commune, celle d'être relativement insolubles dans l'eau et plutôt solubles dans les solvants non polaires tels que l'éther, le chloroforme et le benzène [1].

Ils sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène avec une densité inférieure à celle de l'eau. Les lipides sont caractérisés par la présence dans la molécule d'au moins un acide gras à chaîne moyenne, longue ou très longue capable de se condenser avec des alcools ou des amines [2].

Les lipides ont de nombreuses fonctions, ils jouent un rôle structural grâce aux phospholipides et aux sphingolipides qui s'associent pour former une double couche lipidique, cette dernière constitue avec le cholestérol les membranes biologiques [3] [figure1] [4]. Ils forment aussi une réserve énergétique efficace constituée de triglycérides TG [5]. Ils assurent par ailleurs la signalisation cellulaire, la synthèse des éicosanoïdes, des hormones stéroïdes et des vitamines liposolubles (A, D, E, K) [6-8].

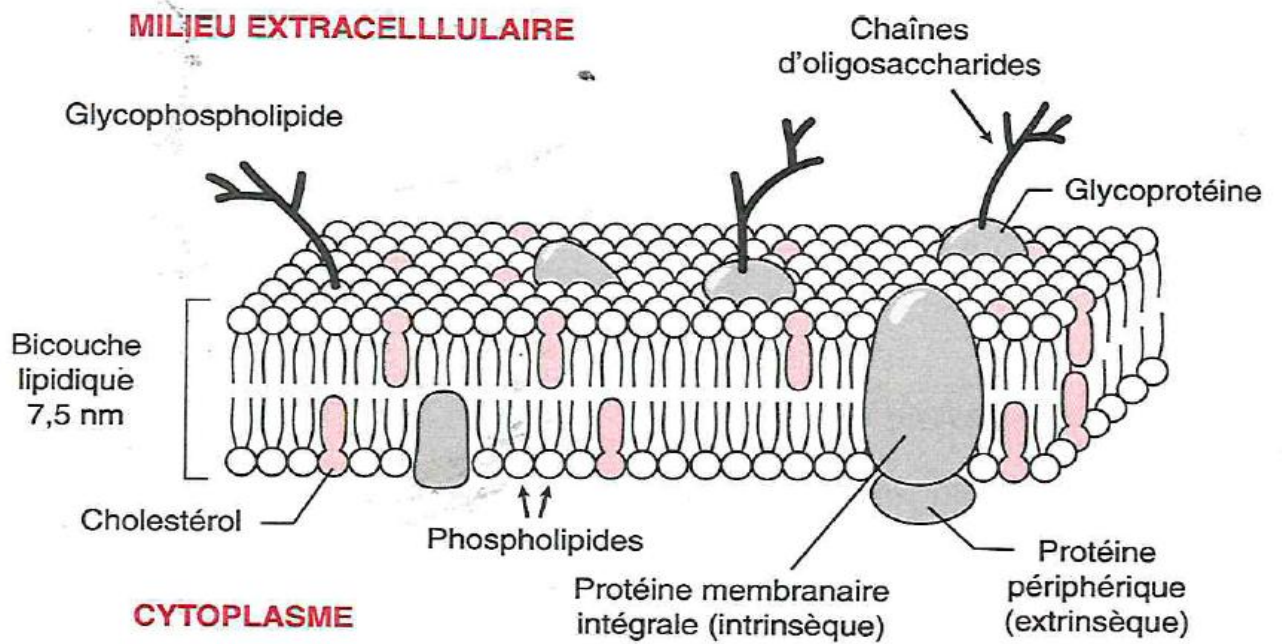


Figure 1: Représentation tridimensionnelle d'une membrane biologique

A l'ancienne classification en lipides simples et complexes, on substitue actuellement une classification plus chimique [9] [figure 2] [10].

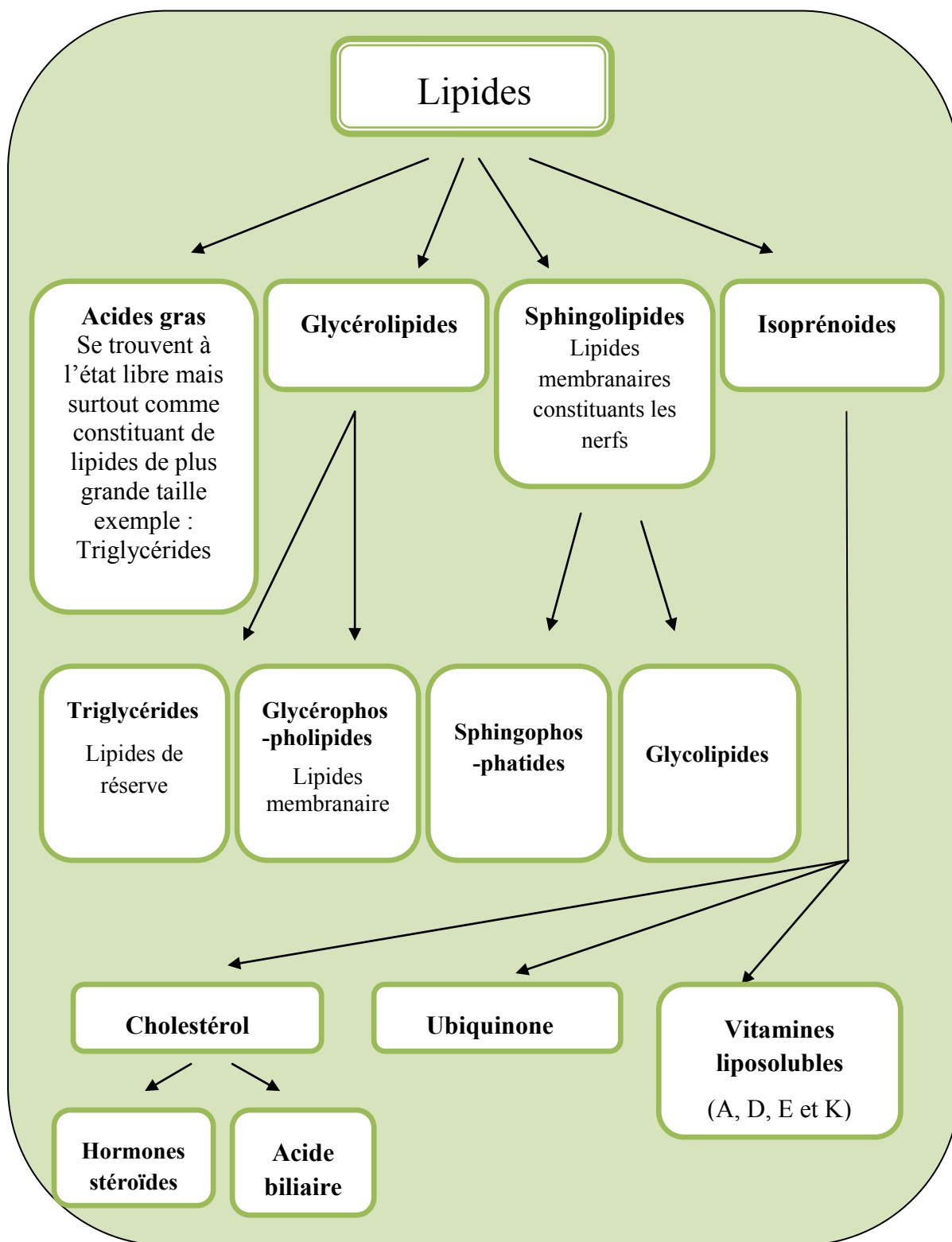


Figure 2:Classification des lipides

2. Principaux lipides :

Les principaux lipides faisant l'objet de notre étude sont les TG et le cholestérol :

2.1. Triglycérides :

On devrait appeler les TG « triacylglycérols » terme plus juste sur le plan chimique mais peu usuel en pratique clinique. Ils sont constitués par une molécule de glycérol estérifié par trois AG à longue chaîne comme l'acide stéarique (18 atomes de carbone) ou l'acide palmitique (16 atomes de carbone) [11] [figure3] [12].

Les TG sont la forme d'apport alimentaire, de transport plasmatique et de stockage intracellulaire des acides gras. Ces réserves représentent environ 12% du poids corporel chez l'homme d'un poids normal et lui permettent de résister physiquement pendant plusieurs semaines. Leur métabolisme a lieu principalement dans l'intestin, le tissu adipeux, les muscles, myocarde, et le foie [10,13] [figure4] [14]. Ce sont les plus insolubles des lipides simples, ils se fixent sur des protéines comportant des zones apolaires, par les liaisons hydrophobes, ce qui permet leur transport dans les milieux aqueux comme le sang. Ils constituent ainsi les lipoprotéines plasmatiques du groupe beta (chylomicron, VLDL, LDL) [7].

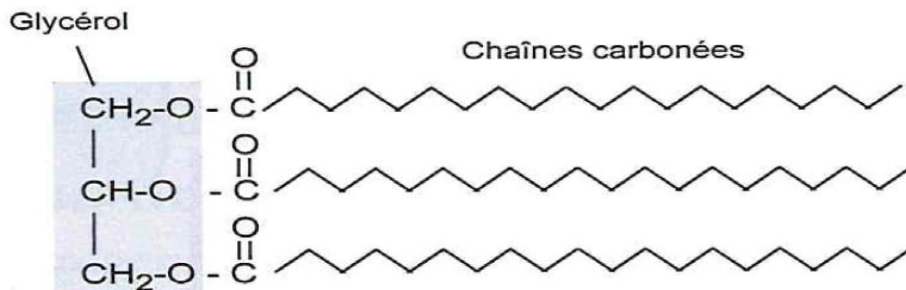


Figure 3: La structure des triglycérides

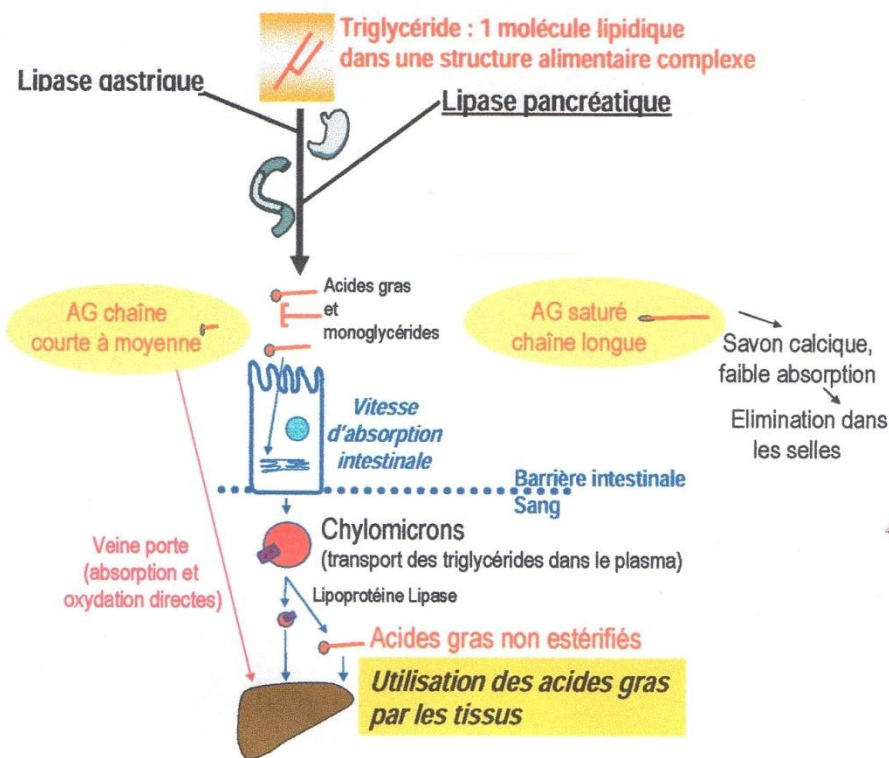


Figure 4: Etapes principales dans la digestion des TG alimentaires impliqués dans l'absorption des AG et leur devenir métabolique

2.2. Cholestérol :

Le cholestérol est le plus abondant stérol des tissus animaux ; il est constitué de 4 cycles accolés (noyaux cholestane) ; une double liaison et une fonction alcool estérifiable par un AG pour donner un stéride [15] [figure5] [16].

Les besoins de l'organisme en cholestérol (1.2 g /24h) sont couverts par l'alimentation (0.2 g) Et surtout par la synthèse endogène (1g) [17]. Le cholestérol est synthétisé essentiellement dans le foie par des polymérisations successives à partir du groupement acétyle de l'acétyl-CoA. Il est distribué par le foie aux cellules et circule dans le sang inclus dans les lipoprotéines LDL [16].

Le cholestérol est le précurseur de la synthèse [17] :

- des acides biliaires dans le foie, indispensables à la digestion des lipides
- des hormones stéroïdes dans les organes stéroïdogènes (corticosurrénales, gonades et placenta)
- De la vitamine D dans la peau.

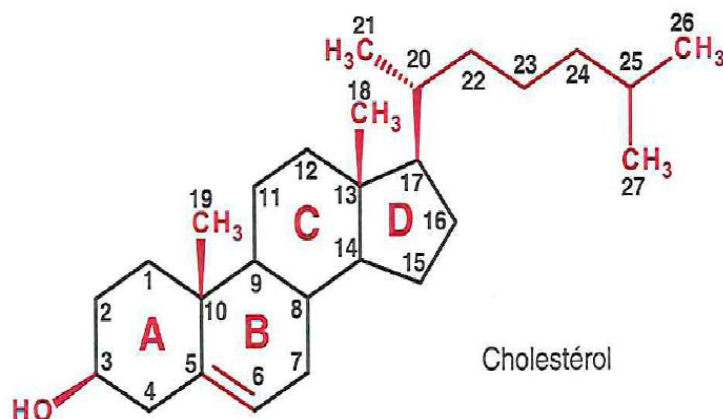


Figure 5: La structure du cholestérol

3. Les lipoprotéines :

Les lipoprotéines plasmatiques sont des complexes macromoléculaires de lipides spécifiques et de protéines dans des proportions relativement fixes. C'est sous cette forme que sont véhiculés les lipides, soit d'origine exogène, soit synthétisés dans l'organisme à l'état colloïdal stable [18].

Les lipoprotéines ont une structure sphérique dans laquelle le noyau est constitué des lipides hydrophobes (TG et cholestérol estérifié) enveloppé par une couche de phospholipides, de cholestérol non estérifié et d'apolipoprotéines [19] [figure 6] [20]

Les apolipoprotéines (fraction protéique des lipoprotéines) jouent un rôle important dans la structure et la stabilité des lipoprotéines, elles fonctionnent également comme activateur ou inhibiteur enzymatique et comme ligand de récepteur [10].

Il existe cinq principaux types d'apolipoprotéines, les Apo A, Apo B, Apo C, Apo D et Apo E. Certaines des apolipoprotéines possèdent également des sous-types [Tableau 1] [21]. L'Apo B est la plus abondante des apolipoprotéines.

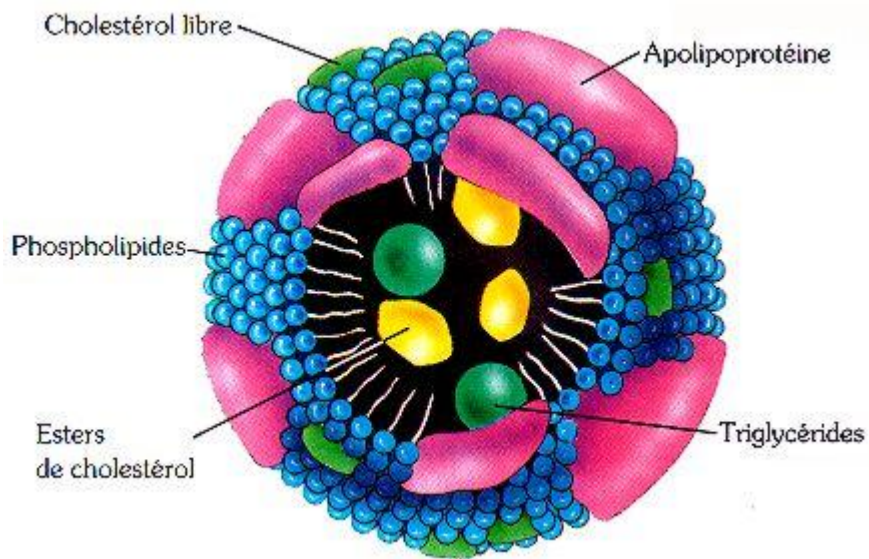


Figure 6: La structure d'une lipoprotéine

Tableau 1: Les apolipoprotéines et leurs sous-types

Apolipoprotéines	Sous-type
Apo A	Apo A-I, A-II
Apo B	Apo B-48, B-100
Apo C	Apo C-I , C- II , C-III

3.1. Classification et fonctions des lipoprotéines :

Les lipoprotéines sont classées, en fonction de leurs propriétés physico-chimiques [tableau2] [22]. On distingue cinq classes de lipoprotéines :

- Lipoprotéines de haute densité HDL (α -lipoprotéines)
- Lipoprotéines de basse densité LDL (β -lipoprotéines)
- Lipoprotéines de densité intermédiaire IDL
- Lipoprotéines de très basse densité VLDL (pré- β -lipoprotéines)
- Les chylomicrons

Toutes ces classes contiennent des triglycérides, du cholestérol avec ses esters, et des phospholipides en diverses proportions, et assurent différentes fonctions [tableau4] [21], [23].

Il est essentiel de rappeler que les β -lipoprotéines contiennent le cholestérol comme principal lipide, tandis que les pré- β -lipoprotéines et les chylomicrons ont des triglycérides comme principale composante lipidique [24] [tableau 3] [22], [23].

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques des lipoprotéines

Lipoproteines	Densité (Kg/L)	Diamètre (nm)	Masse moléculaire moyenne (Da)	Migration électrophorétique en agarose
Chylomicron	<0.94	100 – 1000	5 10 ⁹	Dépôt
VLDL	0.94 - 1.006	30 – 70	7.5 10 ⁶	Pré-β
LDL	1.019 – 1.063	15 – 25	2.5 10 ⁶	β
HDL	1.063 – 1.21	6 – 14	3 10 ⁵	α

Tableau 3: Composition des principales lipoprotéines :

Lipoprotéines	Apos majeures	Cholestérol Estérifié (%)	Cholestérol Non Estérifié (%)	Triglycéride (%)	Phospho-lipides (%)	Proteines (%)
Chylomicron	B-48, A-I, C-II, E	2 – 4	1 – 3	80 – 95	3 – 6	1 – 2
VLDL	B-100, C-II, E	15	5	50 – 60	15 – 20	10
LDL	B-100	37	8	10	22	25
HDL	A-I, A-II	14	3	8	22	45 – 55

Tableau 4: Les quatre principales lipoprotéines et leurs fonctions :

Lipoprotéines	Fonctions
Chylomicrons	Plus grosses lipoprotéines. Synthétisées dans l'intestin après un repas. Non présentes dans le plasma normal à jeun. Elles transportent des aliments ou les TG exogènes de l'intestin au foie.
VLDL	Synthétisées dans le foie. Impliquées dans le transport des triglycérides endogènes du foie aux tissus extra-hépatiques.
LDL	Formées à partir des VLDL dans la circulation. Principal véhicule pour le transport du cholestérol du foie aux tissus extra-hépatiques.
HDL	Plus petites lipoprotéines. Fonction protectrice. Principal véhicule pour le transport du cholestérol des tissus extra-hépatiques vers le foie

3.2. Métabolisme des lipoprotéines :

3.2.1. Métabolisme des chylomicrons :

Les chylomicrons se forment à partir des lipides alimentaires (principalement les triglycérides, mais aussi le cholestérol) dans les entérocytes; elles passent dans la lymphe et gagnent la circulation systémique par le canal thoracique. elles contiennent en plus de l'Apo B48 (essentielle à leur assemblage) de l'Apo AI, AII et AIV nouvellement synthétisées alors qu'ils acquièrent l'Apo C et l'Apo E à partir des HDL circulantes.

Les chylomicrons sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme lipolytique ancrée à l'endothélium des capillaires sanguins qui dégradera leurs triglycérides en AG et glycérol. Les particules résiduelles ainsi formées (ayant perdu essentiellement de l'Apo AI et l'Apo C), appelées remnants sont directement internalisées dans plusieurs tissus périphériques (principalement le cœur, muscle...) avant d'être captées finalement par le foie [20], [25]. [Figure 7] [26].

3.2.2. Métabolisme des VLDL :

Les VLDL sont synthétisées par les hépatocytes à partir des triglycérides endogènes qui en sont le principal constituant, et en apoprotéines(en particulier l'Apo B-100). Elles sont ensuite sécrétées par exocytose dans le sang. Les VLDL naissantes acquièrent dans la circulation des Apo C-II et E provenant des HDL qui leur cèdent également du cholestérol au niveau du plasma, la LPL activée par l'Apo C-II et la lipase hépatique LH provoque une hydrolyse des TG des VLDL, ce qui aboutit à la formation des IDL [27]. Les IDL contenant de l'Apo B-100 et l'Apo E sont en partie capturées par le foie via les récepteurs spécifiques des apolipoprotéines B-100/E [20], l'autre partie subit une deuxième fois l'action de la LPL et de la LH, ce qui mène à la formation des LDL [27] [figure 8] [26].

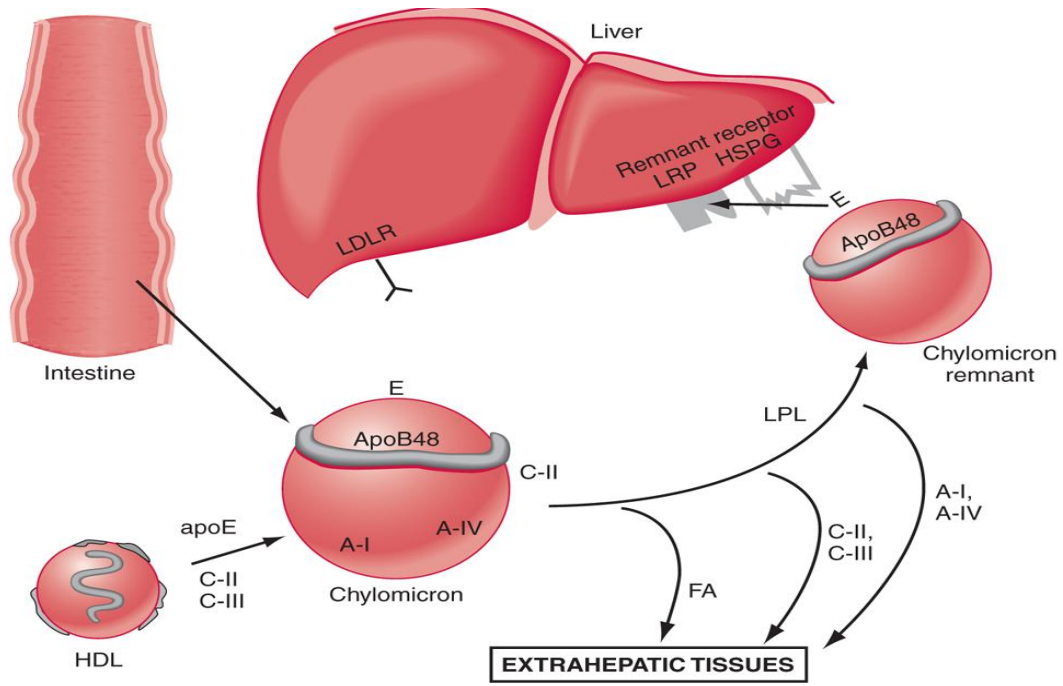


Figure 7: Métabolisme des chylomicrons

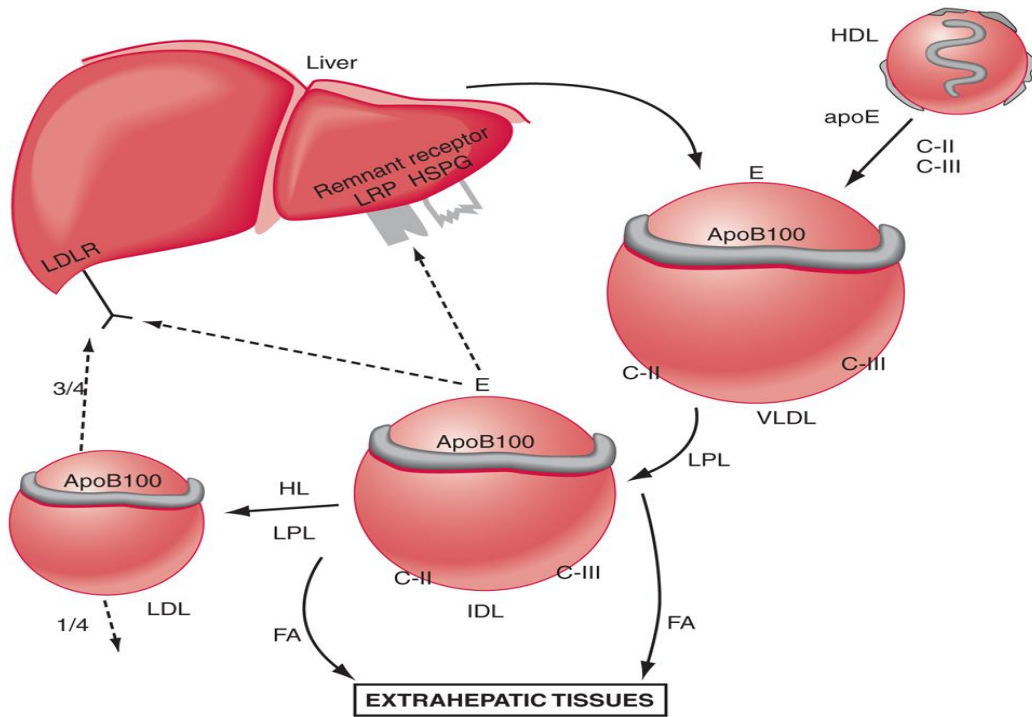


Figure 8: Métabolisme des VLDL

3.2.3 Métabolisme des LDL :

Les LDL sont les transporteurs principaux du cholestérol dans le plasma. La plupart des LDL sont formées à partir des VLDL. Une certaine quantité semble pouvoir être produite directement par le foie. Les LDL se lient à leurs récepteurs par l'intermédiaire de l'Apo B- 100 puis sont captées par endocytose et dégradées dans le lysosome, principalement par la lipase acide LA. Ce mécanisme assure à la cellule un approvisionnement substantiel en cholestérol qui va, dans une dernière étape, exercer une action régulatrice : en inhibant la synthèse endogène du cholestérol par l'inhibition de l'HMG-CoA réductase, en augmentant l'activité d'estérification, et donc de stockage du cholestérol via l'acyl-coA cholesterol acyl transférase ACAT, et en réprimant l'expression des récepteurs des LDL, bloquant la voie principale d'entrée du cholestérol dans la cellule [figure 9] [20].

3.2.4. Métabolisme des HDL :

Les HDL sont les lipoprotéines plasmatiques les plus petites mais les plus denses [28]. Quand ces dernières sont sécrétées dans le plasma à partir du foie elles ont une forme discoïdale et sont essentiellement constituées en ester de Cholestérol. Ces HDL naissantes sont converties en particules sphériques « HDL3 » par l'accumulation de l'ester de Cholestérol au centre de ces dernières. L'ester de Cholestérol dérive du Cholestérol et de la phosphatidylcholine situées à la surface des HDL par l'action de la lécithine-cholestérol-acyltrasférase (LCAT) [29].

Les HDL3 à leur tour sont capables de capter des molécules de Cholestérol membranaire et après une nouvelle action de la LCAT se transforment en édifices de plus en plus riches en esters de Cholestérol. Les HDL2 ainsi obtenues ont une densité plus légère et un diamètre plus grand que les HDL3. Les HDL2, enrichies en esters de Cholestérol, sont les produits finaux de l'action de la LCAT et conduisent le Cholestérol vers le foie pour l'excrétion dans la bile [figure 10] [30].

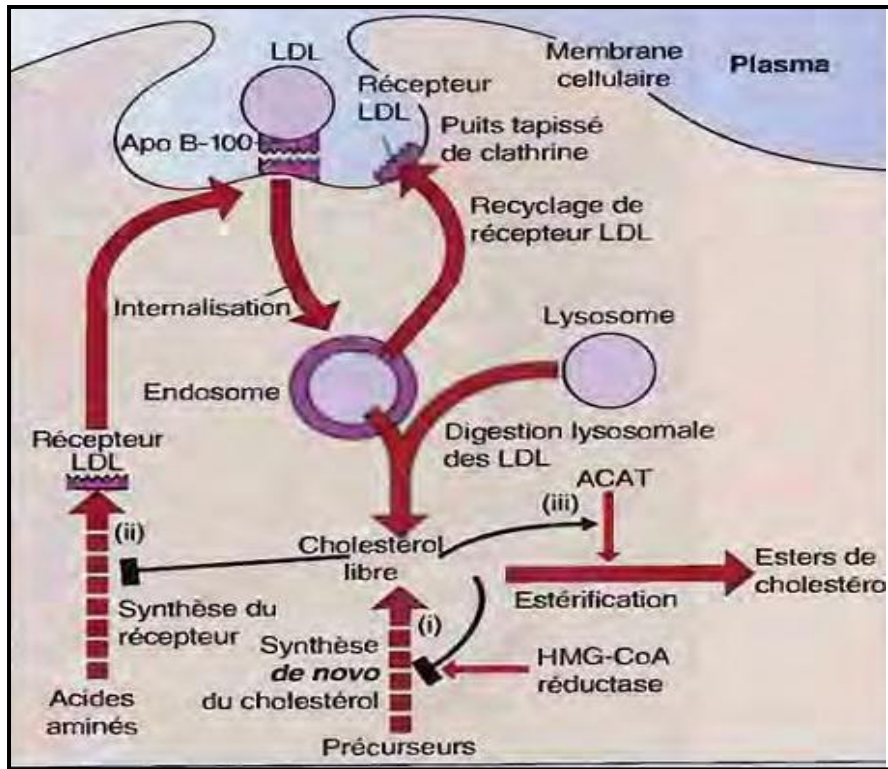


Figure 9: Captation et catabolisme des LDL

Métabolisme des HDL

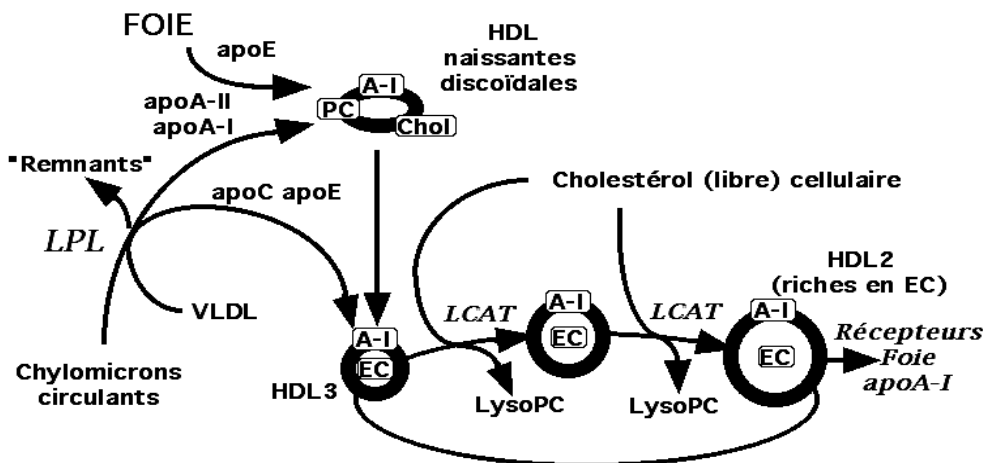


Figure 10: Métabolisme des HDL

Chapitre2 :

L'exploration des lipoprotéines par électrophorèse

L'électrophorèse est, outre la chromatographie, la méthode de séparation la plus fréquemment appliquée pour l'analyse des protéines du sérum dans le but d'établir un diagnostic dans certains cas d'inflammation, d'infection, de cancer. Cette méthode est également applicable à d'autres substances (lipides, hémoglobine, acides nucléiques) et à d'autres liquides physiologiques (urine, larmes, liquide céphalorachidien) [31], [32].

Les principaux domaines d'application sont la recherche biologique et biochimique, pharmacologie, médecine légale, investigations cliniques, médecine vétérinaire, le contrôle des aliments ainsi que la biologie moléculaire. [31]

1. Historique :

Le mouvement des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique a été observé dès 1807 par Ferdinand Frederic Reuss. En 1909, le terme électrophorèse, a été introduit par Michaelis comme une description de ce phénomène, dérivé du mot grec *elektron* signifiant ambre (c'est-à-dire électrique) et *phore* signifiant porteur.

Pourtant, ce n'est qu'en 1930 que l'électrophorèse comme nous la connaissons aujourd'hui, a été développée par Tiselius [figure 11][33], permettant ainsi la séparation du sérum humain en ses quatre principales composantes : l'albumine, les α , β et γ -globulines, ce qui lui a permis de recevoir le prix Nobel en 1948.

Dans les années 50, l'électrophorèse était une technique de laboratoire équivalente en utilité à des techniques de chromatographie.

Cependant, dans les années 1970, l'électrophorèse analytique a été devancée par le développement de la Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), ce qui ne l'a pas empêchée d'être toujours utilisée en biochimie et dans les laboratoires cliniques comme technique de séparation qualitative pour des macromolécules, tels que les protéines et l'ADN.

Cependant, avec le développement de l'électrophorèse capillaire après 1981, l'électrophorèse a suscité de nouveau un important intérêt dans la chimie analytique [34], [35]

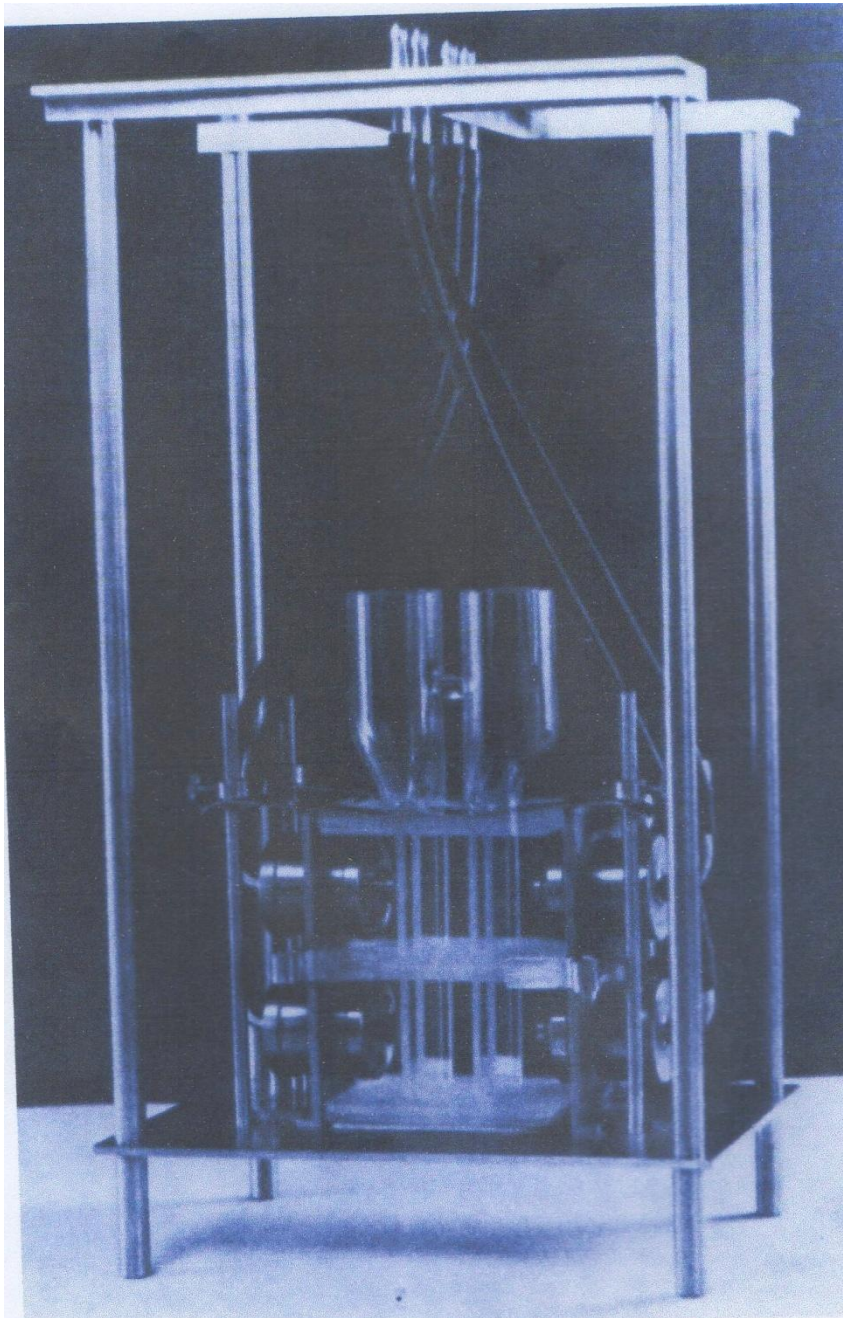


Figure 11: Appareil d'électrophorèse d'Arne Tiselius

2. L'exploration des lipoprotéines par électrophorèse :

Il a été établi que l'analyse des lipoprotéines sériques est d'une grande importance dans le domaine clinique [36]. Par conséquent de nombreuses études sur les techniques et dispositifs de mesures des lipoprotéines ont été développées telle que l'électrophorèse [37].

La séparation des lipoprotéines par électrophorèse est basée sur le fait que la partie protéique de la molécule de lipoprotéine porte une charge négative nette dans une solution tampon alcaline, ce qui entraîne la migration des molécules de lipoprotéines vers l'anode lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. La mobilité électrophorétique, qui est une mesure de la vitesse de migration est un paramètre significatif et caractéristique d'une molécule chargée ou d'une particule, qui dépend [31] :

- Des valeurs pK des groupes chargés
- De la taille de la molécule ou la particule.
- Le type, la concentration et le pH du tampon,
- La température
- La nature du matériau support.

Ces propriétés électriques ont été la base de plusieurs méthodes d'analyse par électrophorèse de zone. La première à avoir été développé utilise le papier comme support et sépare les lipoprotéines en trois à cinq fractions.

Par ordre décroissant de migration ces fractions sont :

- Alpha 1(α 1), alpha 2(α 2) lipoprotéines : ont une mobilité à peu près identique à celle des α globulines.
- Pré-beta (pré- β) lipoprotéines : migrent légèrement plus vite que les β lipoprotéines.
- Beta (β) lipoprotéines : ont une mobilité à peu près identique à celle des β globulines.
- Chylomicrons : grandes particules qui ne migrent pas et restent au point d'origine.

La netteté et la résolution de ces bandes de particules ont ensuite été améliorées en biologie clinique par l'introduction d'acétate de cellulose et de gel d'agarose comme support ce dernier est maintenant considéré comme donnant les meilleurs résultats [38], [39] [figure 12].

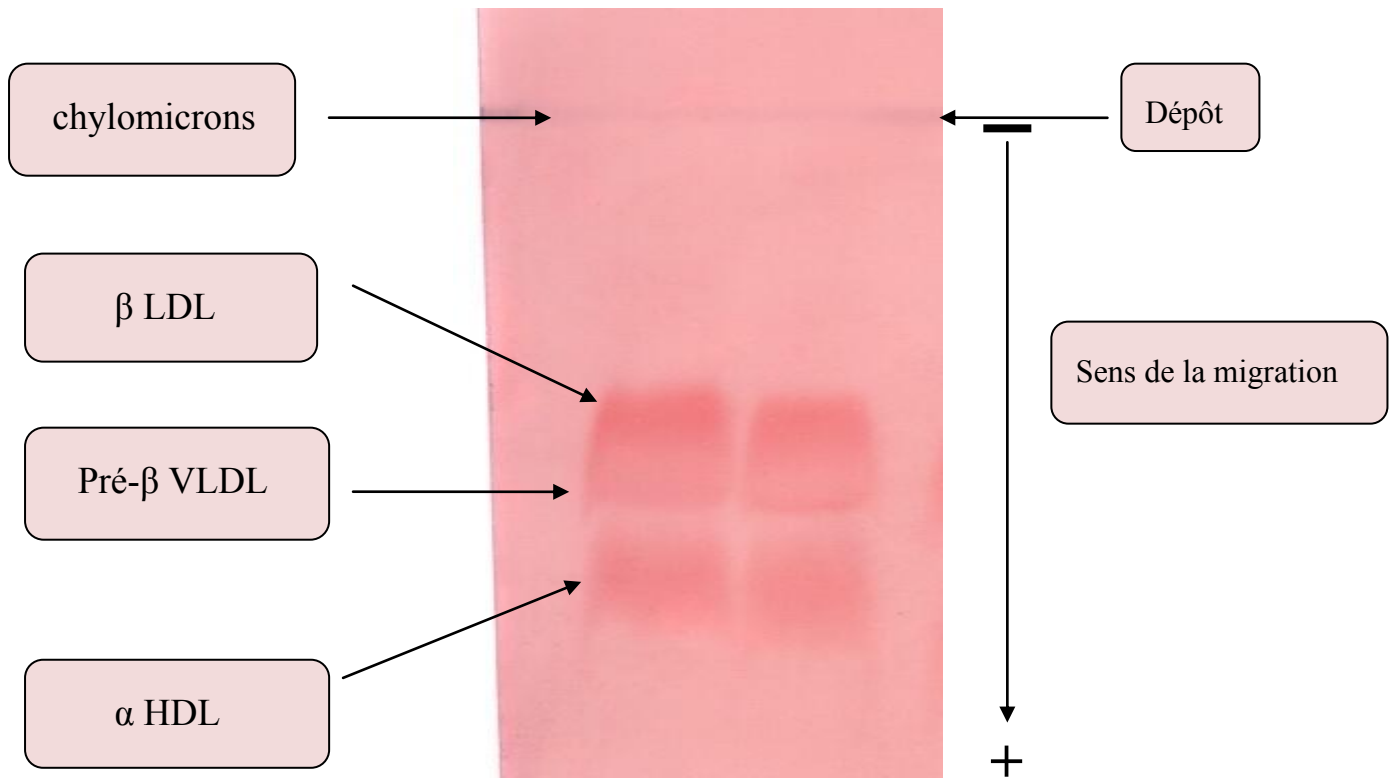


Figure 12: Electrophorèse des lipoprotéines sur plaque d'acétate de cellulose

Chapitre 3 : Le stress oxydant

1. Généralités :

Il est maintenant largement admis que le stress oxydant est associé à divers troubles et maladies [40]. Le stress oxydatif, se définit comme étant un déséquilibre de la balance oxydants-antioxydants en faveur des oxydants [figure13][41]. Il se développe lorsque les radicaux libres, des molécules oxydantes, sont produits plus rapidement qu'ils ne peuvent être neutralisés par l'organisme[42], ces radicaux contiennent un ou plusieurs électrons non appariés dits « célibataires » [43] et dérivent de l'oxygène ou de l'azote[44] [tableau 5][45-47], d'autres espèces dérivées de l'oxygène ne sont pas des radicaux libres mais peuvent être des précurseurs de radicaux et induire des réactions radicalaires [48] [tableau 6][45-47].

Toutes ces espèces sont potentiellement toxiques pour l'organisme car elles peuvent inactiver des protéines, induire des cassures au sein de l'ADN avec pour conséquence une altération du message génétique, dégrader des sucres, oxyder les lipides des lipoprotéines et initier des processus de peroxydation lipidique au sein de la membrane cellulaire en s'attaquant aux acides gras polyinsaturés [49].

A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II, l'athérogenèse, diverses maladies neurodégénératives et le cancer [50], [51].

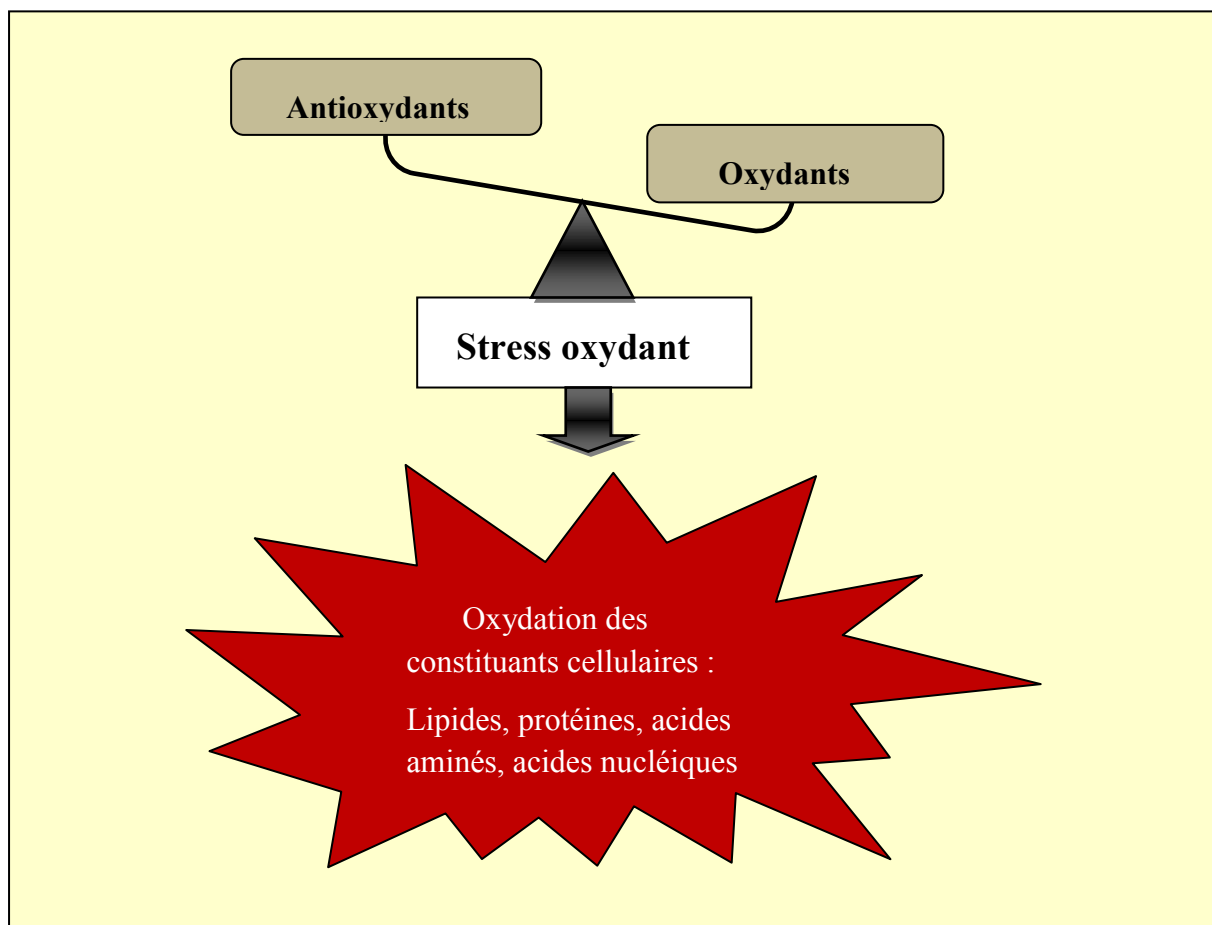


Figure 13: La balance d'équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants

2. Origine du stress oxydant :

Le stress oxydant résulte habituellement soit d'une production excessive d'ERO, d'un dysfonctionnement mitochondriale, d'un système antioxydant altéré, (ischémie–reperfusion, vieillissement), d'une activation des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase, glucose oxydase, monoamine oxydase), d'une libération de fer libre à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine, catécholamines, etc.) [figure 14] [52]. Enfin, une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants contribuera également à l'apparition d'un stress oxydant [53], [54]. Généralement, le stress oxydant sera la résultante de plusieurs de ces facteurs et se produira dans un tissu et un type cellulaire bien précis, objet de la défaillance et non pas dans tout l'organisme [55].

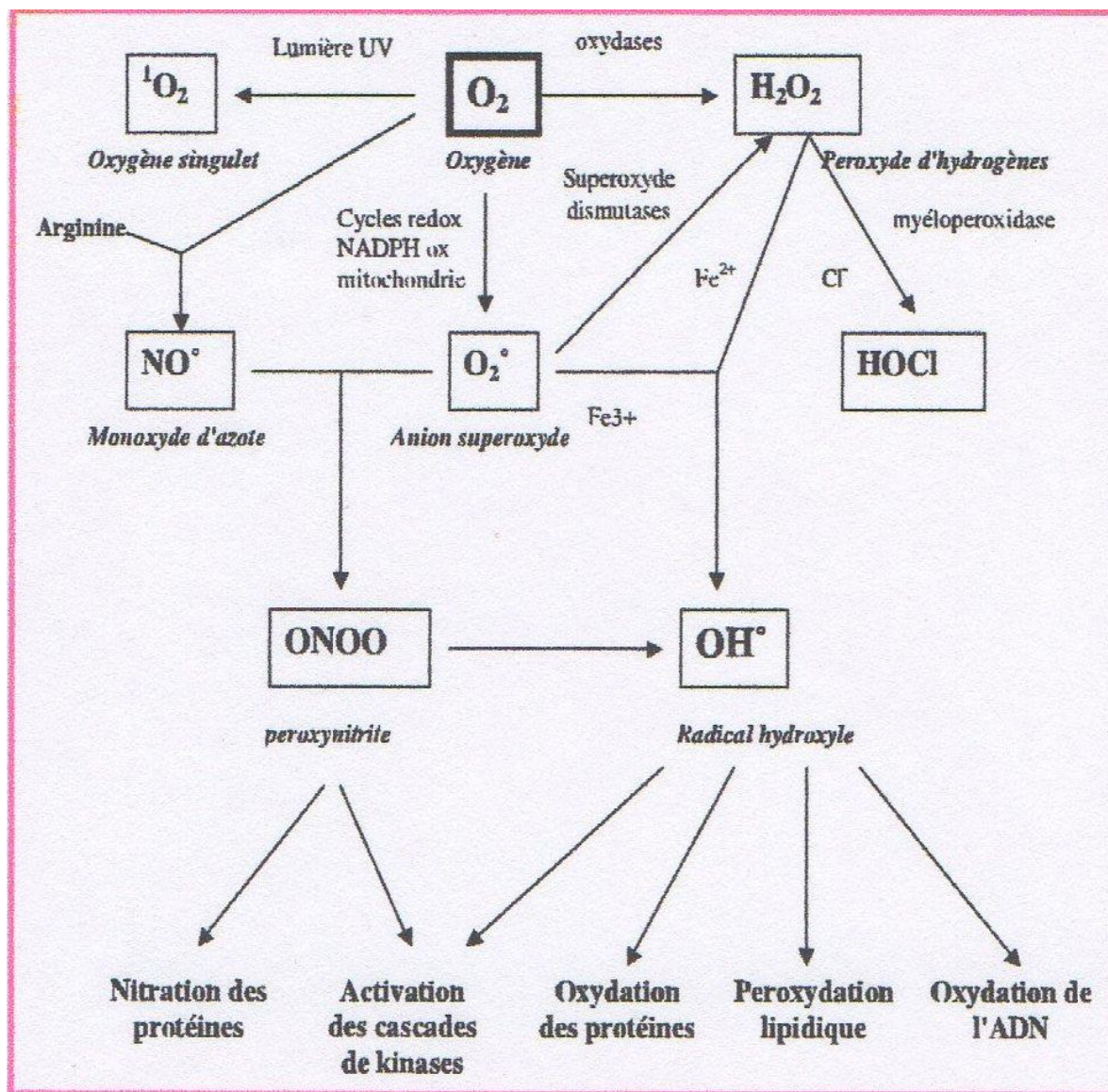


Figure 14: Origine des différentes espèces réactives de l'oxygène

Tableau 5: principaux radicaux libres dans les systèmes biologiques :

Nom	Formule	Description
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	Radical libre chargé négativement issu de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire : $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$OH\cdot$	Produit principalement à partir de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène en présence d'ions ferrique, au cours des réactions de Fenton et d'Harber-Weiss : $H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + OH + Fe^{3+}$ (reaction de Fenton) $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + OH + O_2$ (reaction d'Harber-weiss)
Radicaux peroxyde Et alkoxyde	$RO_2^{\cdot-}$ $RO^{\cdot-}$	Générés à la suite de l'action oxydante de radicaux libres oxygénés « primaires » sur les chaines d'acides gras polyinsaturés, les glucides, les protéines ou les acides nucléiques .
Oxyde nitrique Et dioxyde d'azote	$NO^{\cdot-}$ $NO_2^{\cdot-}$	Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique est produit a partir de la L-arginine sous l'action des NO synthases (NOS) , enzymes constitutives ou induites, en présence d'oxygène et de cofacteurs.

Tableau 6: principaux oxydants non radicalaires :

Nom	Formule	Description
Peroxyde d'hydrogène	H₂O₂	Produit par la dismutation spontanée ou induite de l'anion superoxyde, ou par la réduction bivalente de l'oxygène : $\text{O}_2^{\cdot-} + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ $\text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
Hypochlorite Acide hypochlorique	OCl⁻ HOCl	Puissant agent oxydant qui réagit avec les groupement Fe-S, les ions métalliques tenus dans les protéines, l'hème, les résidus d'acides aminés des protéines et le GSH $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \longrightarrow \text{HOCl} + \text{OH}^-$
Oxygène simplet Et l'ozone	1(O₂) O₃	La réaction de l'ozone avec un certain nombre de molécules biologiques produit de l'oxygène simplet avec un rendement élevé. À son tour, l'oxygène simplet est un intermédiaire important dans les dommages biochimiques dus à l'exposition à l'ozone.
Peroxynitrite et l'acide peroxinitrique	ONOO⁻ ONOOH	Il peut être formé via la réaction du O ₂ ^{·-} avec le NO [·] . La forme protonée est hautement réactive. $\text{NO}^{\cdot} + \text{O}_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{ONOO}^-$

3. Peroxydation lipidique :

Actuellement, la peroxydation lipidique est considérée comme le principal mécanisme moléculaire impliqué dans les dommages oxydatifs des structures cellulaires et dans le processus de toxicité qui mène à la mort cellulaire.

Tout d'abord, les nutritionnistes ont étudié la peroxydation lipidique comme un mécanisme d'altération des huiles et des graisses alimentaire, néanmoins, d'autres chercheurs ont estimé que la peroxydation lipidique était la conséquence de métabolites toxiques (CCl₄) qui produisaient des espèces hautement réactives et des dommages cellulaires.[56].

3.1. Mécanisme de la peroxydation lipidique :

Les lipides (cholestérol, acides gras polyinsaturés (AGPI) sont une cible principale d'attaque oxydante et ceci conduit à la formation et à l'accumulation de produits d'oxydation des lipides (LPO), y compris des alcools, des cétones, des aldéhydes et des éthers [57], [58].

Les lipides sont oxydés par trois mécanismes distincts [59-62] :

- Oxydation enzymatique : par la cyclo-oxygénase(COX), le cytochrome p450(CYP450), la lipoxygénase (LOX), myéloperoxydase, et la NADPH oxydase
- Oxydation non enzymatique non radicalaire : L'oxygène singulet et l'ozone sont des exemples de molécules qui induisent une telle oxydation.
- Oxydation non enzymatique radicalaire : Les réactions de peroxydation lipidique sont généralement des réactions en chaîne entraînées par des radicaux libres dans lesquelles un radical peut induire l'oxydation d'un grand nombre de molécules de substrat, qui sont représentées par les AGPI.

Au cours des trois dernières décennies, la peroxydation des acides gras polyinsaturés induite par les ERO a été étudiée avec beaucoup de détails car elle se produit dans diverses membranes cellulaires, ainsi que dans les lipoprotéines sériques.

Le processus de peroxydation peut être divisé en trois phases distinctes: initiation, propagation et terminaison [63].

Initiation : La réaction est déclenchée par l'abstraction d'un hydrogène allylique faiblement lié par un oxydant puissant, qui peut être le radical hydroxyle (HO^\bullet), le radical perhydroxyle (HO_2^\bullet), un complexe Oxyde de fer chélaté comme le ferryl ou perferryle, Ceci laisse un électron non apparié sur le carbone, formant un radical alkyl (L^\bullet) carboné, stabilisé par un réarrangement moléculaire des doubles liaisons pour former un diène conjugué [56], [64-66][figure 15] [64].

La propagation : le diène conjugué se combine avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO^\bullet) hautement instable qui réagit avec un acide gras insaturé adjacent conduisant à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et d'un nouveau radical L^\bullet , LOOH peut réagir avec Fe^{2+} produisant le radical alcoyle (LO^\bullet). Ce radical, plus réactif que LOO^\bullet , peut à nouveau réinitialiser la peroxydation lipidique par extraction d'hydrogène d'un acide gras polyinsaturé adjacent, avec la formation de L^\bullet et d'un alcool (LOH) comme produit final. Par conséquent, un seul événement d'initiation peut conduire à la conversion de centaines de chaînes latérales d'acides gras en hydroperoxydes lipidiques qui sont des produits toxiques pour les cellules et sont normalement réduits par une glutathion peroxydase en acides gras monohydroxylés [63], [65-68] [figure16] [64].

La terminaison : Après avoir atteint une vitesse maximale d'oxydation, celle-ci diminue par combinaison des radicaux lipidiques pour donner des produits non radicalaires. La réaction la plus fréquente est une réaction de dimérisation qui est liée à la pression partielle d'oxygène du milieu. À pression d'oxygène élevée se sont surtout les radicaux peroxydes qui réagissent entre eux [65], [66], [68] [figure 17] [64].

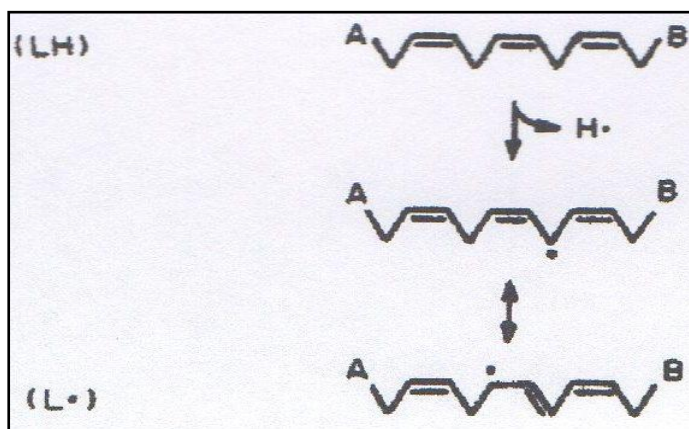


Figure 15: Phase d'initiation de la peroxydation lipidique

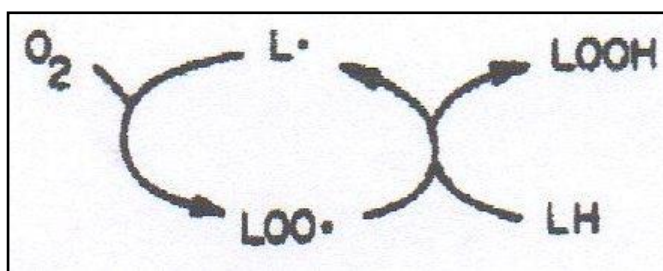


Figure 16: Phase de propagation des la peroxydation lipidique

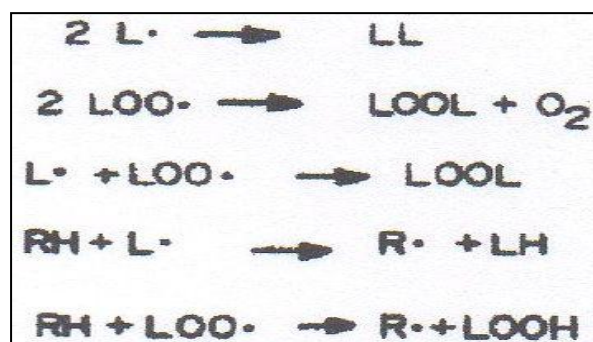
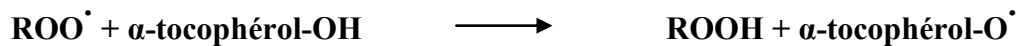


Figure 17: Phase de terminaison de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique peut être terminée par des antioxydants dits de rupture de chaîne tels que la vitamine E [69].



Le radical tocophéroxyde résultant est relativement stable et, dans des circonstances normales, insuffisamment réactif pour initier la peroxydation lipidique lui-même. Il a été démontré in vitro que le radical α -tocophérol peut être converti en un tocophérol par réduction avec de l'acide ascorbique à la surface des membranes biologiques [65].

3.2. Oxydabilité des lipoprotéines :

3.2.1. Oxydabilité des LDL :

L'hypothèse d'oxydation propose que la modification oxydante des lipoprotéines de faible densité (LDL) joue un rôle essentiel dans l'athérogenèse. Ainsi, l'oxydation des LDL semble jouer un rôle crucial dans le développement des maladies cardiovasculaires [70].

La particule de LDL est extrêmement sensible aux dommages oxydatifs en raison de sa composition complexe de lipides et de protéines. Chaque particule de LDL contient environ 700 molécules de phospholipides, 600 de cholestérol libre, 1600 d'esters de cholestérol, 185 de triglycérides et 1 molécule d'Apo B, qui est à son tour constituée de 4536 résidus d'acides aminés [26].

Il est peu probable que l'oxydation des lipoprotéines se produise dans le plasma en raison de la présence de concentrations élevées d'antioxydants et de protéines qui chélatent les ions métalliques, il est plus susceptible donc qu'elle se produit dans un environnement où les antioxydants peuvent s'épuiser et les lipoprotéines sont exposées au stress oxydatif. La paroi artérielle pourrait représenter un tel environnement, et des études in vitro ont clairement démontré que les cellules vasculaires accélèrent l'oxydation des LDL [71].

Pendant l'oxydation des LDL, les lipides et l'Apo B présents dans les LDL sont modifiés. Les espèces réactives en oxygène induisent une fragmentation de l'Apo B pour produire des peptides allant de 14 kDa à 500 kDa. Les AGPI dans les esters de cholestérol, les phospholipides et les TG [72] sont également transformés par peroxydation lipidique (LPO) en hydroperoxydes lipidiques (LOOH), qui sont encore dégradés en fragments plus petits, comprenant les aldéhydes réactifs tels que le malonaldehyde (MDA), 4-hydroxynonanal (HNE), l'hexane et des cétones [73], l'interaction de ces derniers avec les résidus d'acides aminés de l'Apo B100 conduit à la modification de la structure la rendant plus électro-négative [74].

Ces modifications génèrent de nouveaux épitopes sur les LDL, ainsi les LDL oxydées perdent leur capacité à être reconnues par des récepteurs spécifiques et sont absorbées par les récepteurs de capture des macrophages [75].

L'oxydation des lipoprotéines n'est pas unique aux LDL car d'autres lipoprotéines comme les VLDL, même les HDL subissent des dommages oxydatifs [76], [77].

3.2.2. Oxydabilité des HDL :

Les HDL, traditionnellement reconnues comme protectrices vis-à-vis du risque athéromateux, peuvent également subir des modifications oxydatives, produisant aussi des effets délétères. Les HDL exercent un pouvoir antiathérogène en favorisant l'efflux cellulaire et le transport inverse du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie. Elles ont également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires par la présence en leur sein d'enzymes capables de détruire les lipides oxydés pro-inflammatoires, parmi lesquelles la paraoxonase et la PAF-acétylhydrolase. L'action des ERO sur ces molécules enzymatiques réduirait ou inhiberait la capacité des HDL à « détoxifier » les lipides oxydés provenant d'autres lipoparticules (LDL notamment). De façon plus générale, les HDL oxydées présentent une diminution de leur capacité à promouvoir l'efflux du cholestérol cellulaire et une altération de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Comme pour les LDL, il est très probable que l'oxydation in vivo des HDL a lieu dans le liquide interstitiel au niveau des sites d'inflammation et non au niveau systémique [78].

3.2.3. Oxydabilité des VLDL :

Le risque athérogène associé à des niveaux élevés de VLDL reste controversé. Cependant, la VLDL modifiée par voie oxydante, similaire au LDL, peut contribuer à la formation de cellules spumeuses in vivo chez l'homme. Cette notion repose sur l'observation selon laquelle la mise en culture de la VLDL isolée à partir d'animaux ayant reçu un régime riche en cholestérol avec des macrophages ou des cellules musculaires lisses a provoqué une oxydation de cette lipoprotéine, entraînant son absorption rapide et une accumulation intracellulaire massive de lipides. L'absorption de cette VLDL modifiée par oxydation par les macrophages n'est pas médiée par le récepteur des LDL, mais plutôt par un récepteur similaire, sinon identique à celui du LDL oxydé [79].

3.2.4. Oxydabilité des chylomicrons :

Les lipides alimentaires véhiculés par les chylomicrons exercent un effet régulateur sur l'ester de cholestérol intracellulaire, la formation des triglycérides et des phospholipides dans les hépatocytes. Cependant ceci est réduit lorsque les particules des chylomicrons rémnants sont oxydées, ces changements peuvent alors jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose [80].

3.3. Méthodes d'analyse :

Les taux de produits de peroxydation lipidique peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour la mesure de l'état de stress oxydatif in vivo [81] habituellement des AGPI qui sont sensibles à l'attaque par les radicaux libres [82].

Les concentrations des produits de peroxydation lipidique sont souvent évaluées soit par la combinaison de HPLC et GC / MS (par exemple les hydroperoxydes), soit par l'absorption de produits de peroxydation (par exemple l'absorbance de diènes conjugués à 234 nm).

Des techniques spectroscopiques peuvent également être utilisées pour évaluer les concentrations de produits de peroxydation lipidique en déterminant la concentration de complexes colorés formés par ces produits (par exemple, la détermination de MDA en utilisant le dosage TBA ou DETBA détecté par la mesure de l'absorbance de la lumière UV à 532 nm ou par fluorimétrie).

Les tests ELISA ont également été développés pour évaluer les concentrations de produits de peroxydation lipidique à des concentrations relativement faibles (par exemple, F2-isoprostanes), et pour détecter les anticorps anti-LDL oxydés [82-86].

4. Les antioxydants :

Selon Halliwell et Gutteridge (1989) un antioxydant est défini comme étant «toute substance qui, lorsqu'elle est présente à de faibles concentrations par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat » [87]. Les fonctions antioxydantes impliquent une diminution: du stress oxydatif, des mutations de l'ADN, des transformations malignes, ainsi que d'autres paramètres de lésions cellulaires [88].

Il existe trois modes d'action possibles par lesquels les antioxydants protègent les biomolécules contre les dommages induits par les ERO [89] :

- Blocage et capture des ERO
- Inhibition de la formation des ERO
- Réparation des dommages induits par ERO

Ces systèmes présents dans les compartiments extracellulaires et les membranes cellulaires peuvent être enzymatiques et non enzymatiques [90] [tableau 7] [91-96].

4.1. Antioxydants enzymatiques :

Les antioxydants enzymatiques sont également connus sous le nom d'antioxydants naturels; Ils neutralisent l'excès de ERO et l'empêchent d'endommager la structure cellulaire. Les antioxydants enzymatiques sont composés de superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydase (GPx), et la glutathion réductase (GR) [97].

4.2. Antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants non enzymatiques sont également connus sous le nom d'antioxydants synthétiques ou de suppléments diététiques, tels que les vitamines (A, C, E, K), les cofacteurs enzymatiques (Q10), les minéraux (Zn, Se, etc.), les composés organosulfurés, les peptides (glutathion), les polyphénols (flavonoïdes et acide phénolique), et la taurine [97, 98].

Tableau 7: les antioxydants et leurs principales propriétés

Antioxydants	Propriétés
Enzymatiques	
Superoxyde dismutase (SOD)	<p>une des enzymes intracellulaires les plus efficaces qui catalyse la dismutation des anions superoxydes en dioxygène et peroxyde d'hydrogène</p> $\text{O}_2^- + \text{O}_2 + 2\text{H} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$
Catalase (CAT)	<p>Favorise la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.</p> $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
Glutathion peroxydase (GPx)	<p>Les propriétés antioxydantes de ces sélénoenzymes leur permettent d'éliminer les peroxydes comme substrats potentiels pour la réaction de Fenton. GPx agit conjointement avec le tripeptide glutathion (GSH). Le substrat pour la réaction catalytique de GPx est H_2O_2, ou un peroxyde organique ROOH. GPx décompose les peroxydes en eau (ou alcool) tout en oxydant simultanément GSH:</p> $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{GPx}} \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ $2\text{GSH} + \text{ROOH} \xrightarrow{\text{GPx}} \text{GSSG} + \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$
Non-enzymatiques	

Vitamine C (acide ascorbique)	Très important et puissant antioxydant, agit comme un piègeur de radicaux libres et recycle la vitamine E
Vitamine E	La vitamine E est une vitamine liposoluble qui existe sous huit formes différentes. L'α-tocophérol est la forme la plus active de la vitamine E chez l'homme et est un puissant antioxydant biologique. Sa principale fonction antioxydante est la protection contre la peroxydation lipidique.
Glutathion (GSH)	Il est considéré comme le principal tampon d'oxydo-réduction de la cellule.
Flavonoïdes	Ils constituent le groupe le plus important de polyphénols. Les composés phénoliques qui agissent comme des antioxydants peuvent couper les chaînes de radicaux libres et fonctionner en tant que chélateurs d'ions métalliques à activité redox qui sont capables de catalyser la peroxydation lipidique. Les antioxydants phénoliques (PhOH) interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules par le don rapide d'un atome d'hydrogène aux radicaux : $ROO \cdot + PhOH \rightarrow ROOH + PhO \cdot$
Sélénium (Se)	Agit en tant que co-facteur de la glutathion peroxydase.
Cuivre (Cu) et zinc (Zn)	A concentration physiologique, le cuivre et le zinc agissent comme "antioxydants" en étant les deux co-facteurs responsables de la bonne activité de la SOD.
Acide urique	antioxydant possédant la plus forte réactivité avec les radicaux libres.
Albumine	représente l'antioxydant majeur et prédominant dans le plasma, capable d'inhiber l'oxydation des lipoprotéines induite par les métaux de transition

II. PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1 : Matériels et méthodes

1. Objectif :

L'objectif principal de cette étude est d'induire une oxydation in vitro qui reflète le stress oxydant et d'évaluer l'effet de cette oxydation sur les lipoprotéines sériques par électrophorèse sur acétate de cellulose en mesurant les vitesses de migration des lipoprotéines normales et oxydées.

Notre objectif secondaire est d'étudier l'effet de la vitamine C et E sur ces lipoprotéines oxydées.

2. Type et lieu de l'étude :

Il s'agit d'une étude expérimentale prospective faite in vitro sur 4 sérums humains sains à partir desquels 52 échantillons de sérums ont été préparé. Les 4 donneurs du sang ont donné leur consentement orale pour l'utilisation de leur sang dans notre étude.

- Critère d'exclusion :
 - Sujet susceptible de présenter un état de stress oxydant
 - Sujet âgé
 - Sujet diabétique
 - Sujet atteint d'une pathologie cardiovasculaire
 - Sujet cancéreux
 - Sujet fumeur
 - Sujet obèse

L'étude a été menée au niveau du laboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen (CHU Tlemcen) ainsi qu'au laboratoire d'hydro-bromatologie de la faculté de médecine Dr Benaouda BENZERDJEB, cette étude a duré 5 mois (du mois de février jusqu'au mois de juin).

3. Matériels et réactifs :**3.1. Matériels de laboratoire :**

Tous les appareils utilisés sont résumés dans le tableau 8.

Tableau 8: Liste des appareils utilisés

Appareil	Référence
Chambre d'électrophorèse	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS 1283
Support super Z pour alignement de base	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS 4086
Applicateur super Z	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS
Chargeur de puits	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS
Générateur	Consort EV245 400 V / 500 mA / 50 W
Balance de précision	Mettler Etendu 200g / précision 1 mg
Balance électronique	Want 1102 Min 0.01 g / max 110 g
Agitateur magnétique chauffant	2070 220 V / 50 Hz / 30 W
Centrifugeuse	HuMax 14 k (Human)
Etuve	Jouan 1995 / 3777
Automate	HumaStar 80 Siemens
Vortex	HumaTwist (Human) 17176
Scanner	BENQ 4300
Logiciel	Imagej /Matlab
Ordinateur	HP2011X
pH mètre	Adwa 1030

➤ Autre matériels :

- Tubes secs et hépariné
- Micropipette
- Poire
- Pipette graduée
- Récipients en verre
- Papier buvard
- Eprouvette
- Fiole jaugée
- Bécher
- Entonnoir
- Chronomètre
- Thermomètre

3.2. Réactifs

Tous les réactifs utilisés sont résumés dans le tableau 9.

Tableau 9: Liste des réactifs utilisés

Réactifs	Référence
Plaqué d'acétate de cellulose pour électrophorèse des lipoprotéines 76*60 mm	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS 3900
Tampon véronal (sodium tris-barbital) pH 8.6-9	ELECTRA HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS 5805
Colorant rouge oro (Oil Red O)	HELENA LABORATORIES BEAUMONT TEXAS 1230
L'oxydant sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Masse molaire = 249.68g/mol	2972 E
Peroxyde d'hydrogène H_2O_2 10 V	RIADH-PHARM 17138
Acide ascorbique (vitamine C) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ Masse molaire = 176.12g/mol	SIGMA - ALDRICH STBD7119V
α -tocophérol (vitamine E) $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$ Masse molaire = 430.69 g/mol	PHARCO PHARMACEUTICALS 219
L'hydroxyde de sodium NaOH Masse molaire = 40g/mol	MERCK 6478
Méthanol	PROLAB 1230
Citrate trisodique $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ Masse molaire = 294.10g/mol	GERHARD BUCHMANN 764817
Chlorure de magnésium Hexahydrate MgCl_2 Masse molaire = 203.3 g/mol	SIGMA-ALDRICH SZBC2070V
Chlorure de lithium LiCl Masse molaire = 42.39 g/mol	MERCK 5679
Chlorure de sodium NaCl Masse molaire = 58.44 g/mol	POLYLAB
Héparine LEO 25.000 iu / u.i / 5 ml $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_{20}\text{S}_3$	3714
Acide chlorhydrique HCl	SIGMA-ALDRICH 91250
Glycérine	Laboratoires PRODERMA GV16

4. Méthodes :

4.1. Prélèvement sanguin :

Le prélèvement du sang a été réalisé le matin à jeun au niveau de la veine du pli du coude.

Le sang total est recueilli dans 3 tubes (2 tubes secs et 1 tube à anticoagulant héparine)

Les deux tubes secs sont centrifugés à 4000 tours par minutes pendant 5 minutes, le sérum obtenu est utilisé en petite partie pour le dosage des HDL et LDL cholestérol et en grande partie pour l'électrophorèse des lipoprotéines.

Le tube héparine est lui aussi centrifuger à 4000 tours par minutes pendant 5 minutes, par la suite le plasma est récupéré pour le dosage des paramètres biochimiques qui sont : le cholestérol, les triglycérides, protéines totales, glycémie, acide urique, albumine.



1. Prélèvement du sang au niveau de la veine du pli de coude



2. Recueil du sang dans 3 tubes (2 tubes secs et 1 tube héparine)



3. Centrifugation du sang à 4000 tours/min pendant 5 minutes



4. Récupération du sérum et du plasma

Figure 18: Etapes du prélèvement sanguin

4.2. Dosage des paramètres biochimiques de control :

Le dosage du cholestérol total, des triglycérides, du cholestérol HDL et LDL, de la glycémie et de l'acide urique s'est fait par l'automate Siemens alors que le dosage de l'albumine et des protéines totales s'est fait par l'automate Human.

Les principes utilisés dans le dosage de ces paramètres biochimiques sont détaillés dans l'annexe1.

4.3. Préparation des solutions :

4.3.1. Préparation des solutions d'oxydant et d'antioxydant :

4.3.1.1. Préparation de la solution de sulfate de cuivre CuSO_4 :

- Solution mère de CuSO_4 à 10 mmol/l :
 - Prélever 8 ml d'eau distillée à l'aide d'une pipette graduée et l'introduire dans un tube stérilisé
 - Peser 25 mg de CuSO_4 à l'aide d'une balance de précision puis la dissoudre dans l'eau distillée
 - Mélanger jusqu'à dissolution de la poudre puis ajuster le volume jusqu'à 10 ml et homogénéiser

La masse de CuSO_4 à peser est calculée selon la relation suivante :

$$m = M \cdot C \cdot V$$

m : masse de CuSO_4 en gramme (0.025 g = 25 mg)

M : masse moléculaire de CuSO_4 en gramme / mole (249,68 g/mol)

C : concentration molaire de CuSO_4 en mole / litre (0.01 mol/l = 10 mmol/l)

V : volume en litre (0.01 l = 10ml)

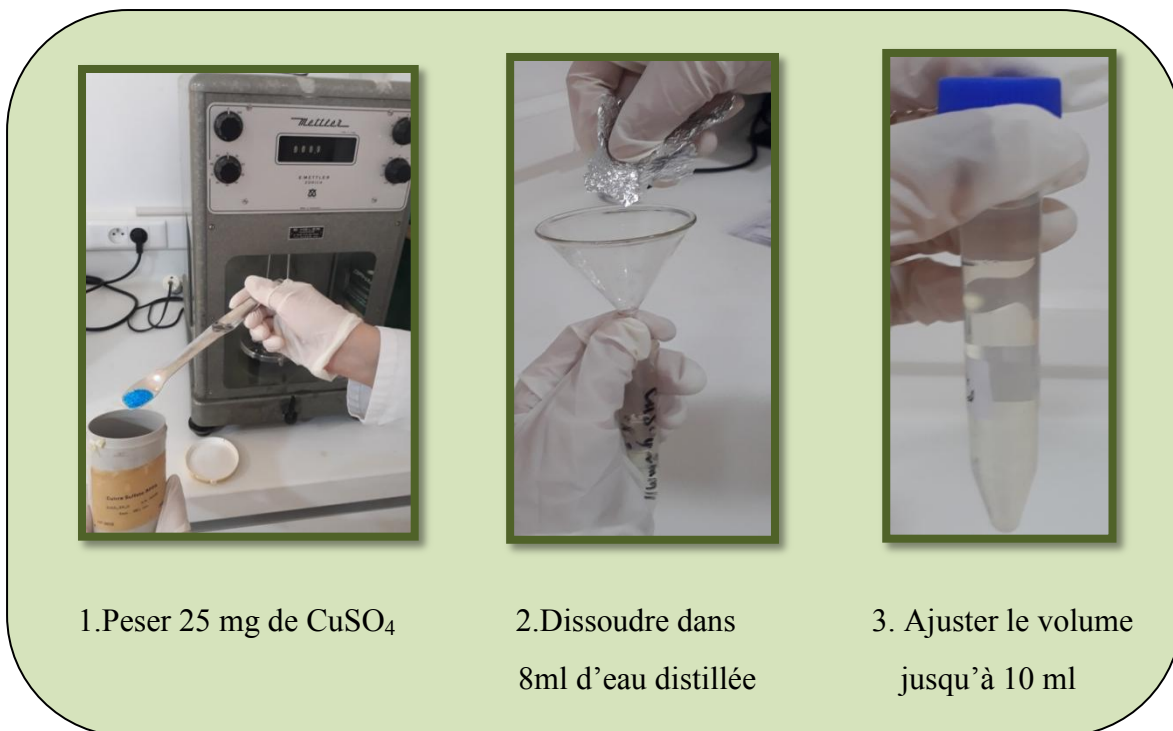


Figure 19: Etapes de préparation de la solution mère de CuSO_4 à 10mmol/l

- Solution fille de CuSO_4 à 2 mmol/l :
- Prélever 2 ml de la solution mère de CuSO_4 à l'aide d'une pipette graduée et l'introduire dans un tube stérilisé contenant 8 ml d'eau distillée.
 - Homogénéiser la solution et la conserver à température ambiante

Le volume à prélever de CuSO_4 est calculé par la relation suivante :

$$C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$$

$C1$: concentration molaire de la solution mère de CuSO_4 en mole/ litre (0.01 mol/l = 10 mmol/l)

$V1$: volume à prélever de la solution mère de CuSO_4 en litre (0.002 l = 2 ml)

$C2$: concentration molaire de la solution fille de CuSO_4 en mole /litre (0.002 mol/l = 2 mmol/l)

$V2$: volume de la solution fille de CuSO_4 en litre (0.01 l = 10 ml)

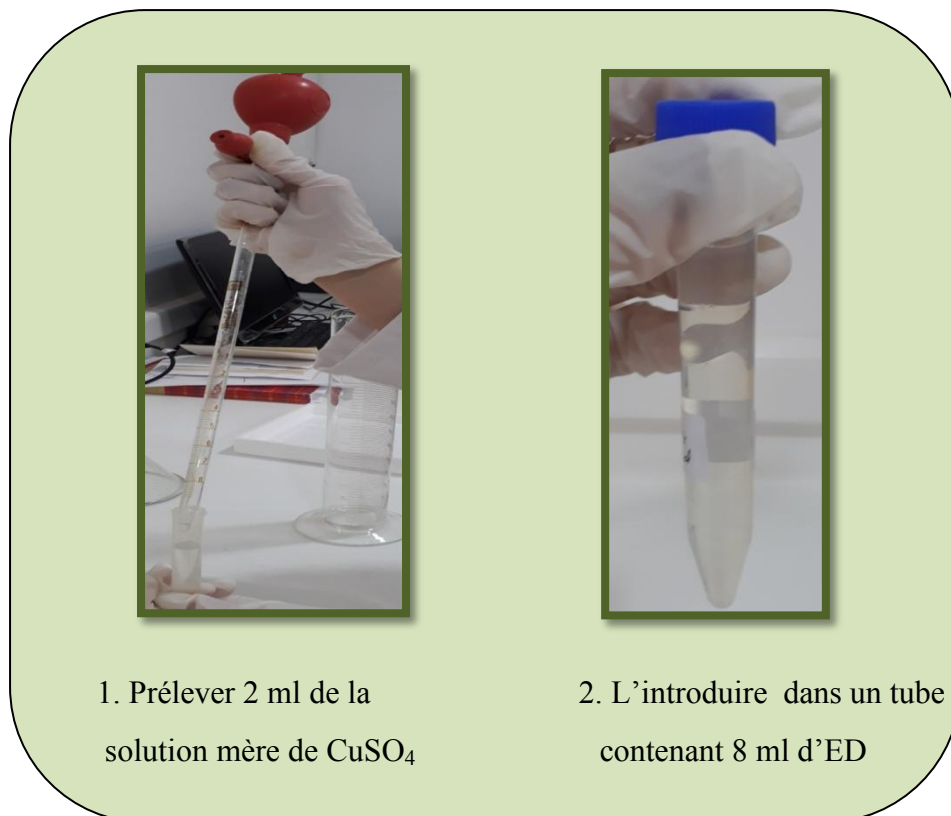


Figure 20: Etapes de préparation de la solution fille de CuSO_4 à 2mmol/l

4.3.1.2. Préparation de la solution de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 :

- Solution fille de H_2O_2 à 9 mmol/l :
Prélever 1ml de la solution de H_2O_2 à 0.9 mol/l et l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml contenant environ 50 ml d'eau distillée, ajuster le volume jusqu'au trait de jauge puis homogénéisé .

- Solution fille de H_2O_2 à 1 mmol/l :
Prélever 1.11 ml de la solution de H_2O_2 à 9 mmol/l et l'introduire dans un tube stérilisé contenant 8 ml d'eau distillée, ajuster le volume jusqu'à 10 ml puis homogénéisé.



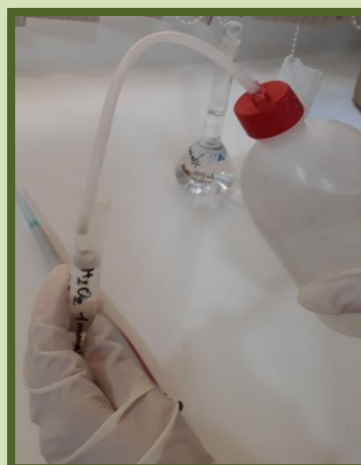
1. Prélever 1 ml de la solution mère de H_2O_2



2. L'introduire dans une fiole jaugée de 100ml d'ED



3. Prélever 1.11 ml de la solution précédente



4. L'introduire dans un tube stérilisé puis ajuster avec l'ED jusqu'à 10 ml

Figure 21: Etapes de préparation de la solution fille de H_2O_2 à 1mmol/l

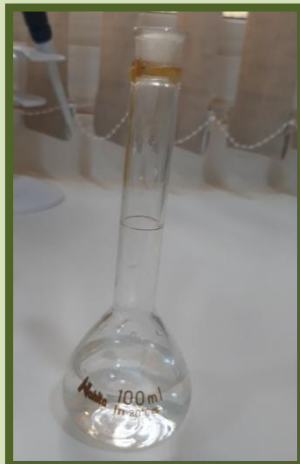
4.3.1.3. Préparation de la solution de vitamine C :

- Solution mère de vitamine C à 28 mmol/l :

Dans une fiole jaugée de 100 ml contenant environ 50 ml d'eau distillée, dissoudre 500 mg de vitamine C pesée à l'aide d'une balance de précision , puis ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéisé .



1. Peser 500 mg de vitamine C



2. L'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml



3. Ajuster le volume avec l'ED jusqu'au trait de jauge

Figure 22: Etapes de préparation de la solution mère de vitamine C à 28 mmol/l

- Solution fille de vitamine C à 2.8 mmol/l :
 - Prélever 1 ml de la solution mère de l'acide ascorbique à l'aide d'une pipette graduée et l'introduire dans un tube stérilisé contenant 9 ml d'eau distillée.
 - Homogénéiser la solution et la conserver à température ambiante

4.3.1.4. Préparation de la solution de vitamine E à 0.46mmol/l :

Dissoudre une capsule contenant 100 mg de vitamine E dans 500 ml d'eau distillée.

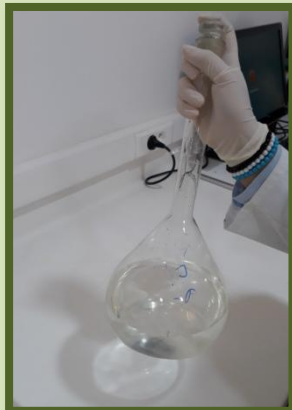
4.3.2. Préparation des solutions pour l'électrophorèse :

4.3.2.1. Préparation de la solution tampon :

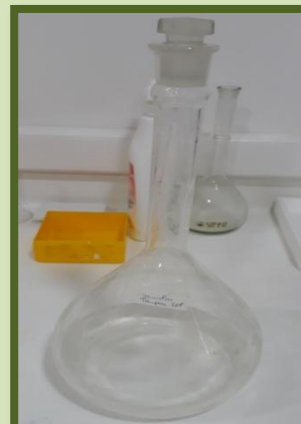
Dans une fiole jaugée de 1000 ml, contenant environ 250ml d'eau distillée, dissoudre 1 sachet du tampon véronal puis, ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéiser. Le tampon est préparé 24 h avant son utilisation et conservé à température ambiante.



1. Dissoudre 1 sachet du tampon véronal dans 250ml d'ED



2. Mélanger énergiquement



3. Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge

Figure 23: Etapes de préparation de la solution tampon

4.3.2.2. Préparation de la solution de coloration « rouge oro » :

Peser à l'aide d'une balance de précision, 4 gr du colorant rouge oro puis l'introduire dans un flacon en verre contenant 500 ml de méthanol.

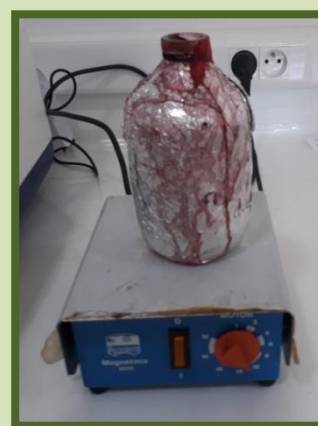
Puisque le colorant rouge oro est très lipophile, le mélange se fait avec un agitateur magnétique chauffant pendant 24 h pour bien homogénéiser la solution.



1. Peser 4 g du colorant rouge oro



2. Dissoudre le colorant dans 500 ml de méthanol



3. Laisser 24 h sous agitation

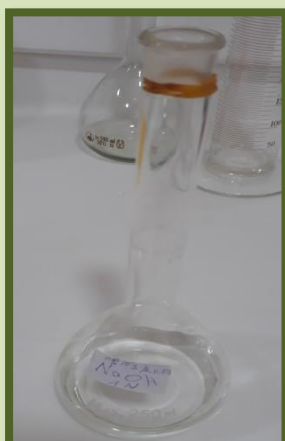
Figure 24: Etapes de préparation de la solution de coloration « rouge oro »

4.3.2.3. Préparation d'une solution 1 M d'hydroxyde de sodium NaOH :

La solution de NaOH joue le rôle d'un mordant, il fixe le colorant sur les lipoprotéines. Dans une fiole jaugée de 250 ml contenant environ 50 ml d'eau distillée, dissoudre 10 g de NaOH puis ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéiser.



1. Peser 10g des cristaux de NaOH



2. Introduire dans une fiole contenant environ 50 ml d'ED



3. Ajuster le volume jusqu'au trait de jauge puis homogénéiser

Figure 25: Etapes de préparation de la solution de NaOH à 1mol/l

4.3. Précipitation des lipoprotéines :

Les préparations des solutions utilisées dans la précipitation des lipoprotéines ainsi que leur précipitation en trois fractions séparées (HDL, LDL et VLDL) , sont détaillées dans l'annexe 2 et 3.

4.4. Préparation des échantillons :

4.4.1. Préparation des échantillons à partir du sérum total :

A partir de 4 sérums sains, 25 échantillons ont été préparés. Chaque sérum a subi un traitement par un oxydant (CuSO_4 ou H_2O_2) et un antioxydant (vitamine C ou Vitamine E) à différentes concentrations. Les échantillons obtenus ont été incubés pendant 3 h à 37°C puis conservés pendant 24 h à température ambiante.

Tableau 10: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 1 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C :

	Sérum N° 1				
Tubes contenant 500 μl du sérum	1 « témoin »	2	3	4	5
Volume ajouté de CuSO_4 à 2 mmol/l (μl)	—	5	7.5	5	7.5
Volume ajouté de vitamine C à 28 mmol/l (μl)	—	—	—	50	50
Concentration finale de CuSO_4 ($\mu\text{mol/l}$)	0	20	30	20	30
Concentration finale de vitamine C (mmol/l)	0	0	0	2.8	2.8

Tableau 11: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 2 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C

	Sérum N° 2				
Tubes contenant 500 μl du sérum	1 « Témoin »	2	3	4	5
Volume ajouté de CuSO_4 à 2 mmol/l (μl)	—	—	—	5	7.5
Volumé ajouté de vitamine C à 28 mmol/l (μl)	—	50	7.5	7.5	7.5
Concentration finale de CuSO_4 ($\mu\text{mol/l}$)	0	0	0	20	30
Concentration finale de vitamine C (mmol/l)	0	2.8	0.42	0.42	0.42

Tableau 12: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 3 en fonction de la concentration de CuSO_4 et de la vitamine C

	Sérum N° 3				
Tubes contenant 500 μl du sérum	1 « Témoin »	2	3	4	5
Volume ajouté de CuSO_4 à 2 mmol/l (μl)	—	5	7.5	—	7.5
Volumé ajouté de vitamine C à 2.8 mmol/l (μl)	—	—	—	5.3	5.4
Concentration finale de CuSO_4 ($\mu\text{mol/l}$)	0	20	30	0	30
Concentration finale de vitamine C ($\mu\text{mol/l}$)	0	0	0	30	30

Tableau 13: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 3 en fonction de la concentration de H₂O₂ et de la vitamine C et E

	Sérum N° 3				
Tubes contenant 200µl du sérum	1 « Témoin »	2	3	4	5
Volumé ajouté de H ₂ O ₂ à 1 mmol/l (µl)	_____	_____	6	_____	6
Volumé ajouté de vitamine C à 2.8 mmol/l (µl)	_____	2.1	2.1	_____	_____
Volumé ajouté de vitamine E à 0.46 mmol/l (µl)	_____	_____	_____	13	13
Concentration finale de H ₂ O ₂ (µmol/l)	0	0	30	0	30
Concentration finale de vitamine C (µmol/l)	0	30	30	0	0
Concentration finale de vitamine E (µmol/l)	0	0	0	30	30

Tableau 14: Préparation des échantillons à partir du sérum N° 4 en fonction de la concentration de H₂O₂ et de la vitamine C

	Sérum N° 4				
Tubes contenant 500µl du sérum	1 « Témoin »	2	3	4	5
Volume ajouté de H ₂ O ₂ à 1 mmol/l (µl)	_____	10	15	_____	15
Volumé ajouté de vitamine C à 2.8 mmol/l (µl)	_____	_____	_____	5.3	5.5
Concentration finale de H ₂ O ₂ (µmol/l)	0	20	30	0	30
Concentration finale de vitamine C (µmol/l)	0	0	0	30	30

4.4.2. Préparation des échantillons à partir des fractions :

Un même traitement par l'oxydant (CuSO₄ ou H₂O₂) a été effectué sur les trois fractions des lipoprotéines séparées (HDL, LDL, VLDL) à partir des sérums N° 1 ,3 et 4. Les 27 échantillons obtenus ont été incubés pendant 3 h à 37 °C puis conservé pendant 24 h à température ambiante.

Tableau 15: Préparation des échantillons à partir des fractions du sérum N° 1 et 3 en fonction de la concentration de CuSO_4

	Sérum N° 1 et Sérum N° 3								
	HDL			LDL			VLDL		
Tubes contenant 200 μl du sérum	1 Témoin	2	3	1 Témoin	2	3	1 Témoin	2	3
HDL surnageant (μl)	200	200	200	—	—	—	—	—	—
LDL solubilisé (μl)	—	—	—	200	200	200	—	—	—
VLDL solubilisé (μl)	—	—	—	—	—	—	200	200	200
Volume ajouté de CuSO_4 à 2 mmol/l (μl)	—	2	3	—	2	3	—	2	3
Concentration finale de CuSO_4 ($\mu\text{mol/l}$)	0	20	30	0	20	30	0	20	30

Tableau 16: Préparation des échantillons à partir des fractions du sérum N° 4 en fonction de la concentration de H₂O₂

	Sérum N° 4								
	HDL			LDL			VLDL		
Tubes contenant 200 µl du sérum	1 Témoin	2	3	1 Témoin	2	3	1 Témoin	2	3
HDL surnageant (µl)	200	200	200	—	—	—	—	—	—
LDL solubilisé (µl)	—	—	—	200	200	200	—	—	—
VLDL solubilisé (µl)	—	—	—	—	—	—	200	200	200
Volume ajouté de H₂O₂ à 1 mmol/l (µl)	—	4	6	—	4	6	—	4	6
Concentration finale de H₂O₂ (µmol/l)	0	20	30	0	20	30	0	20	30

4.6. Electrophorèse des lipoprotéines :

- Préparation de la chambre d'électrophorèse :

A l'aide d'une éprouvette, un même volume de 130 à 150 ml de la solution tampon est versé dans chacun des 3 compartiments de la chambre d'électrophorèse.

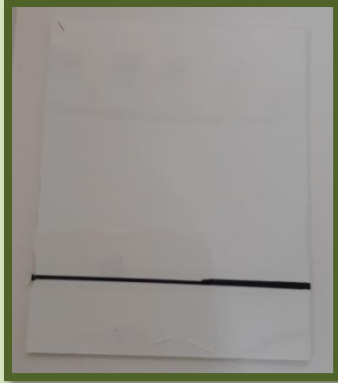


Figure 26: Préparation de la chambre d'électrophorèse

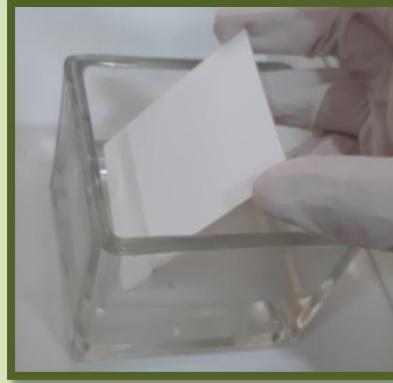
- Préparation de la plaque d'acétate de cellulose : (30 minutes)

Tracer à l'aide d'un marqueur une ligne sur la partie plastique de la plaque d'acétate de cellulose pour marquer la zone de dépôt du sérum , introduire la partie inférieure de la plaque dans un récipient en verre contenant la solution tampon et laisser monter par capillarité puis immerger la plaque dans la solution pendant 30 minutes .

Sécher la plaque entre deux papiers buvards et la placer sur le support super Z. Déposer 5 μ l de chaque échantillon sur le chargeur de puits puis appliquer à 3 reprises ces échantillons sur la plaque d'acétate de cellulose à l'aide d'un applicateur.



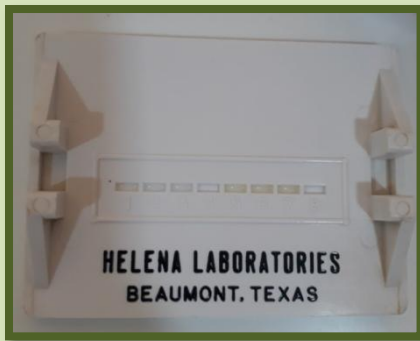
1. Tracer la ligne de dépôt du sérum



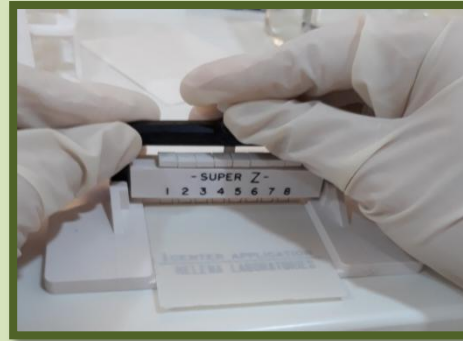
2. Laisser monter la solution tampon par capillarité



3. Immersion pendant 30min



4 .Dépôt du sérum



5. Application du sérum sur la plaque

Figure 27: Préparation de la plaque d'acétate de cellulose

- Phase de migration des lipoprotéines (30 minutes) :

Placer la plaque dans la chambre d'électrophorèse (la ligne de dépôt des échantillons est du côté de la cathode).

Fermer la chambre et mettre sous tension (30 minutes à 180 V).

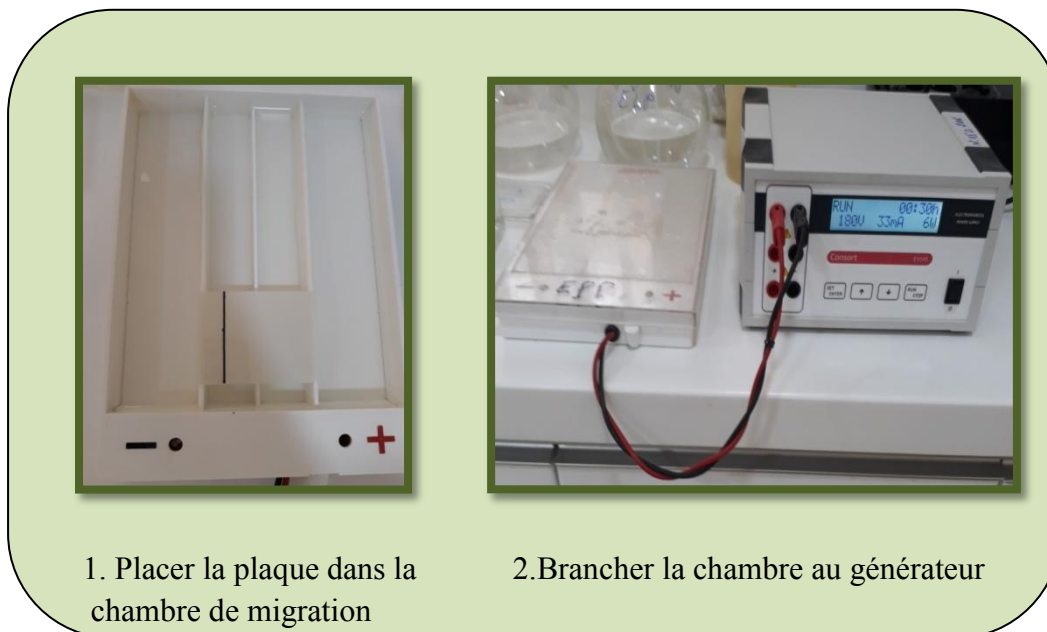


Figure 28: Migration des lipoprotéines

- Coloration (30 minutes) :

A 5 minutes avant la fin de la migration , mélanger 34 ml du colorant rouge oro avec 10 ml de NaOH puis agiter , placer la plaque d'acétate de cellulose dans la solution de coloration et laisser 30 minutes.

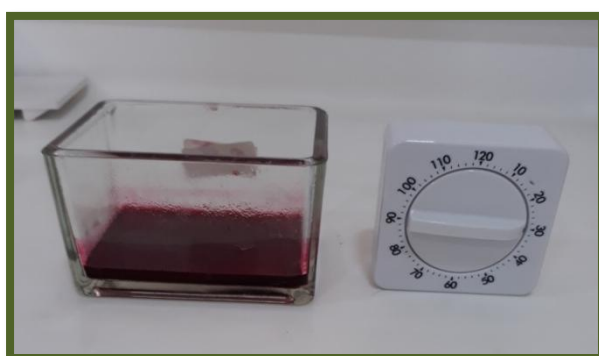


Figure 29: Coloration des lipoprotéines

- Lavage de la plaque d'acétate de cellulose :

Laver la plaque avec l'eau du robinet et tapoter délicatement à l'aide d'un coton pour éliminer les grumeaux.

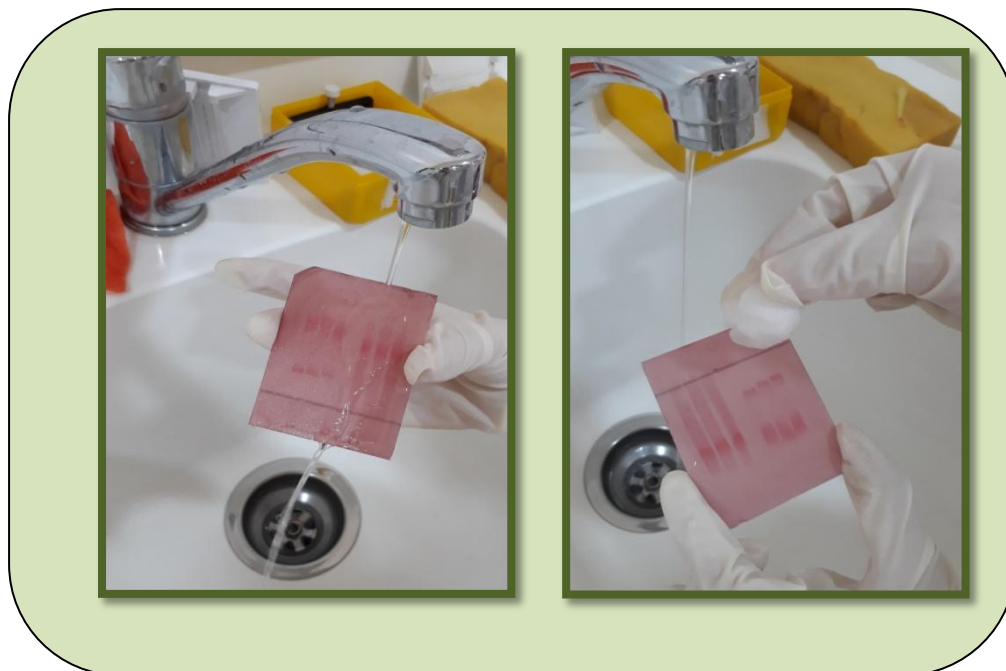


Figure 30: Lavage de la plaque d'acétate de cellulose

- Scan de la plaque d'acétate de cellulose :
Après lavage, la plaque est séchée entre deux papiers buvard et placée dans un scanner puis enregistrer sous forme d'image.

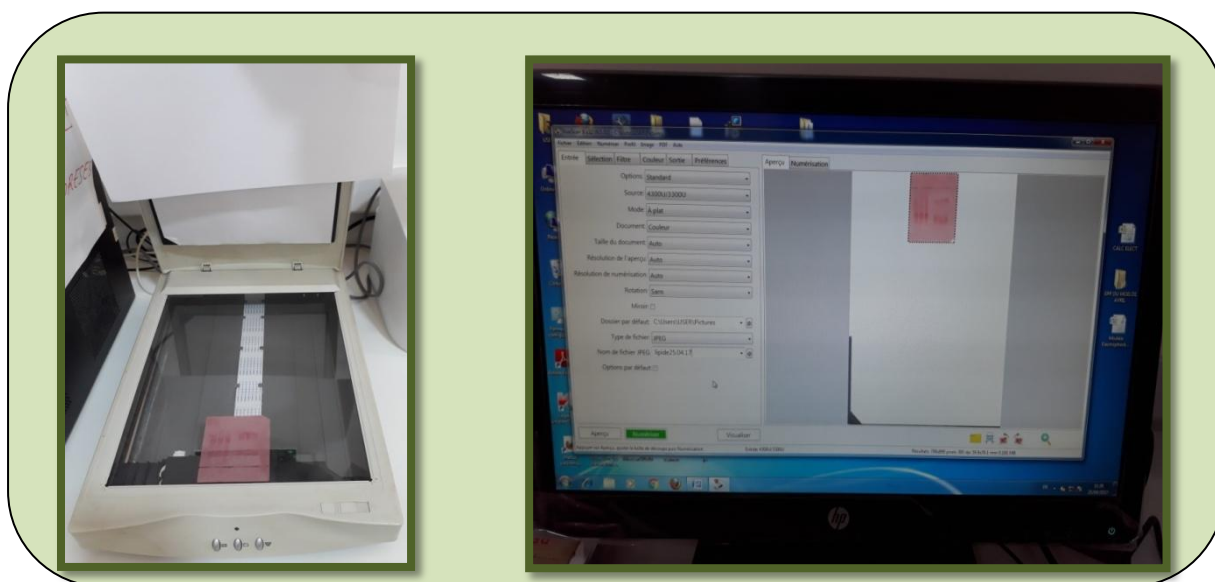


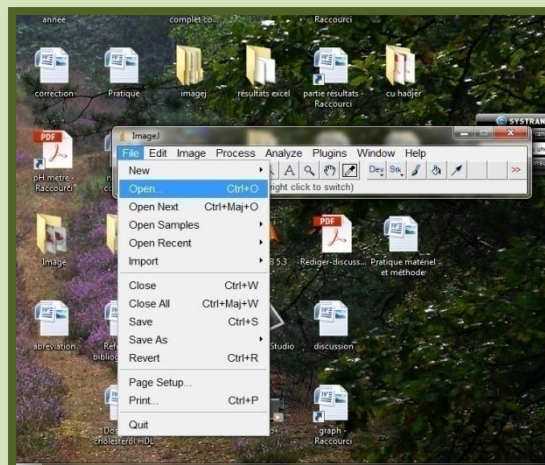
Figure 31: Scan de la plaque d'acétate de cellulose

- Conservation de la plaque d'acétate de cellulose :

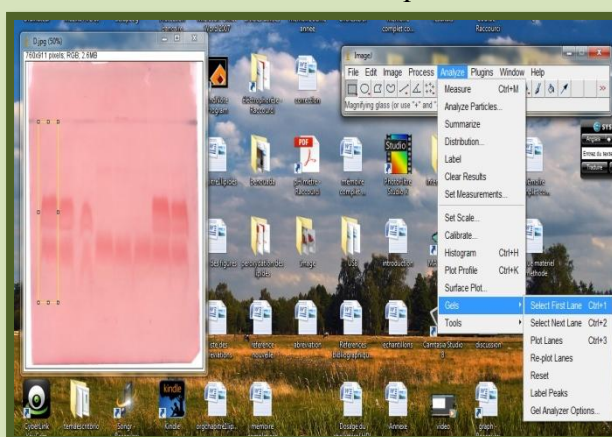
La plaque d'acétate de cellulose est plongée environ 10 minutes dans une solution contenant 9 ml de glycérine et 1 ml de méthanol.

- Lecture :

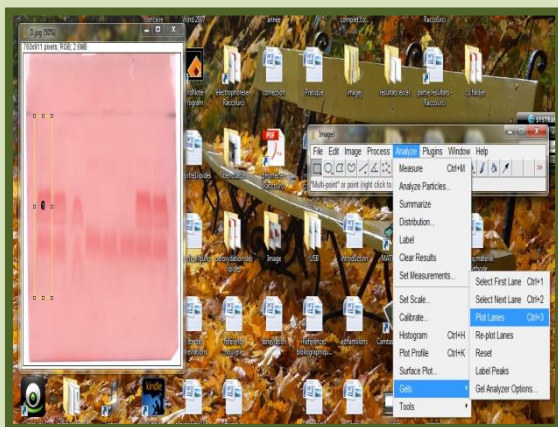
Le traitement et l'analyse de la plaque se sont fait par le logiciel « imagej » qui permet de traduire l'intensité de la coloration sous forme de courbe.



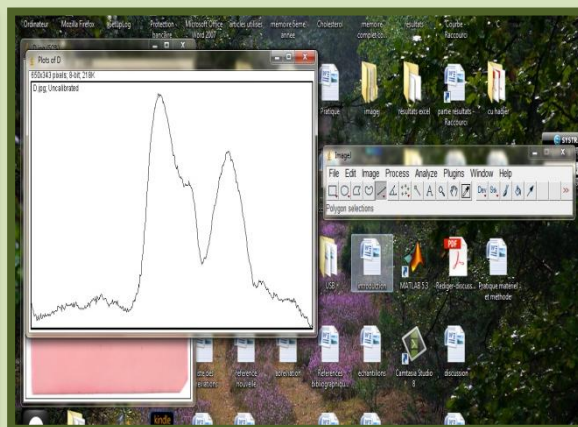
1. Ouvrir le fichier à étudier en cliquant sur **File >Open**



2. Sélectionner le rectangle encadrant la bande électrophorétique puis cliquer Sur **Analyse >Gels >Select First Line**



3. Cliquer sur **Analyse > Gels >Plot Lines**



4. Un nouveau cadre d'image apparaît contenant un densitogramme

Figure 32: Etapes de lecture de la plaquette d'acétate de cellulose par le logiciel imagej

Chapitre 2 : Résultats et Discussion

1. Résultats :

Dans le cadre de notre étude de contribution à la mise en place d'un outil de diagnostic permettant d'évaluer l'état du stress oxydant, différents profils électrophorétiques sur plaques d'acétate ont été analysés. Par cette étude on est les premières à introduire cette méthode d'évaluation du stress oxydant au niveau du CHU de Tlemcen.

Le traitement de la plaque d'acétate de cellulose par le logiciel « imagej » nous a permis d'obtenir un profil électrophorétique mettant en évidence les trois principales lipoprotéines plasmatiques (LDL, VLDL et HDL) [figure33].

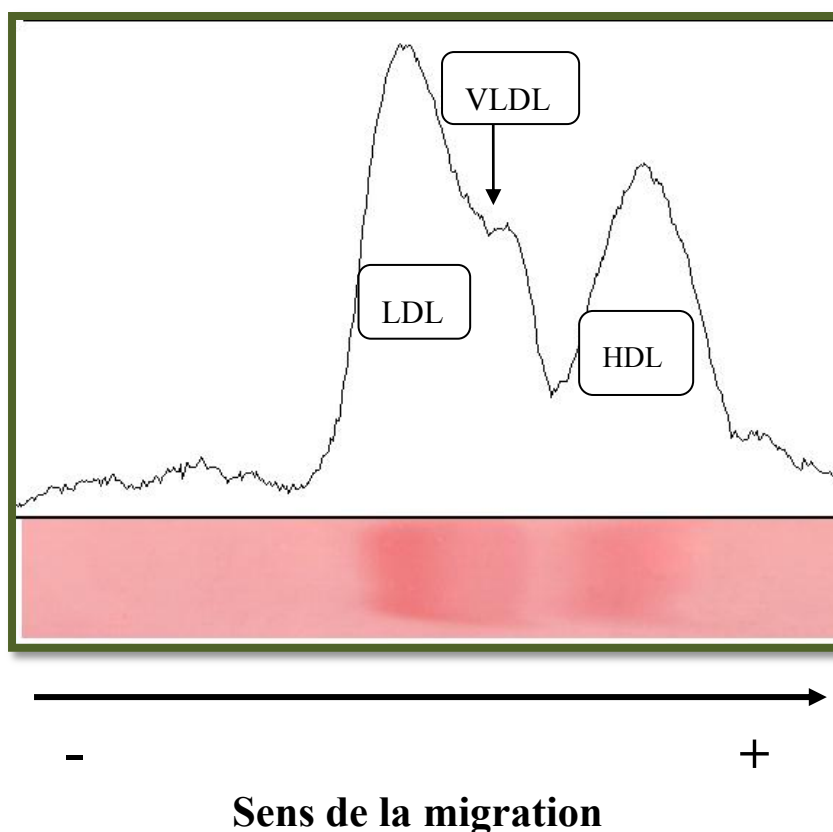


Figure 33: Profil électrophorétique des lipoprotéines sériques

On a évalué la différence entre les vitesses de migration de deux types de lipoprotéines LDL et HDL en superposant à l'aide du logiciel « MATLAB » le profil électrophorétique du sérum sain (témoin) avec ceux des échantillons traités, en premier lieu avec deux oxydants, CuSO_4 et H_2O_2 en utilisant deux concentrations (20 et $30\mu\text{mol/l}$) à la fois sur le sérum total et

sur les fractions séparées, puis en deuxième lieu avec deux antioxydants, la vitamine C et la vitamine E. Le temps d'incubation était de 24h et les vitesses de migration ont été calculées à partir des distances parcourues par les lipoprotéines et du temps de migration qui était de 30 minutes.

Les résultats obtenus nous ont permis de constater que pour l'ensemble des échantillons analysés la vitesse de migration des lipoprotéines oxydées était plus grande par rapport aux lipoprotéines non oxydées, on a aussi remarqué que les échantillons traités par la vitamine C et la vitamine E avaient subi les mêmes modifications que celles observées avec les oxydants. On n'a pas pu inclure les VLDL dans nos résultats car leurs pics correspondants n'apparaissent pas.

L'ensemble de nos résultats sont indiqués au niveau des figures et des tableaux représentés ci-dessous :

1.1 Effet des oxydants sur les lipoprotéines du sérum total :

1.1.1. Effet de CuSO_4 :

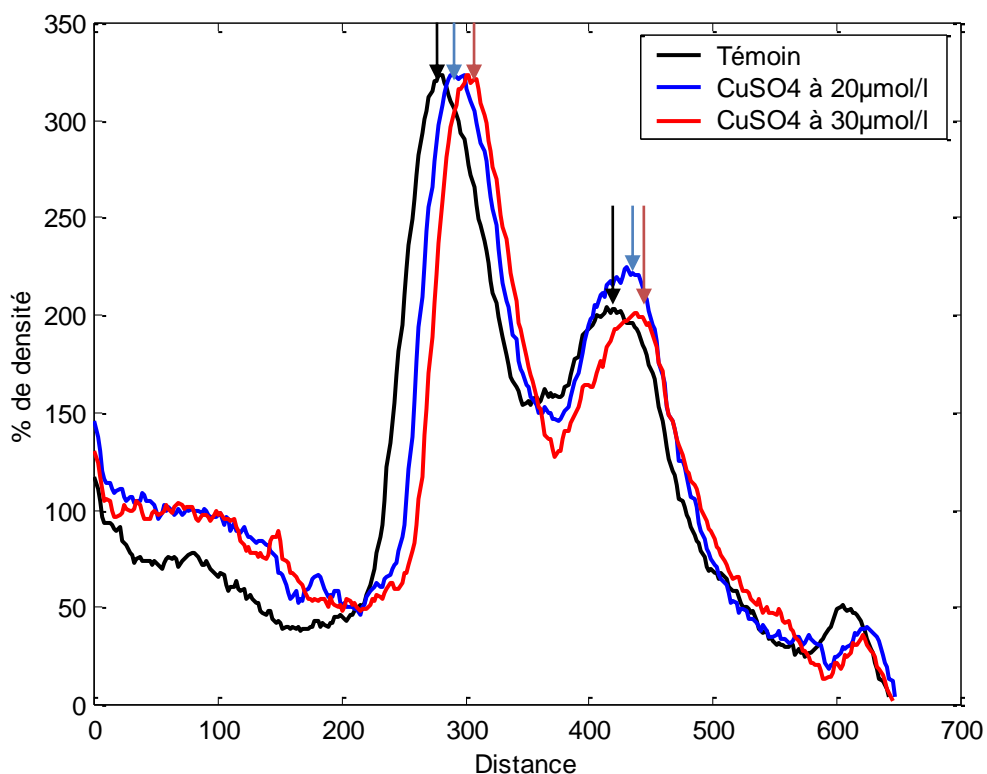


Figure 34: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de CuSO_4

Tableau 17: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines oxydées par CuSO₄

	Témoin		CuSO ₄ à 20µmol/l		CuSO ₄ à 30µmol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	4.52	6.79	4.76	7.03	4.99	7.18
Vitesse de migration (cm/h)	9.04	13.58	9.52	14.06	9.98	14.36

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 34, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par CuSO₄ à une concentration de 20 µmol/l avaient migré plus loin que celles du témoin et que les lipoprotéines traitées par CuSO₄ à 30 µmol/L avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par CuSO₄ à 20 µmol/L.
- Ces différents résultats obtenus ont été appréciés quantitativement après calcul des distances et des vitesses de migration relatives aux 3 profils électrophorétiques, on a remarqué ainsi que pour les LDL et les HDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de CuSO₄ et que cette augmentation est proportionnelle à la concentration en CuSO₄ comme nous le montre le tableau 17.

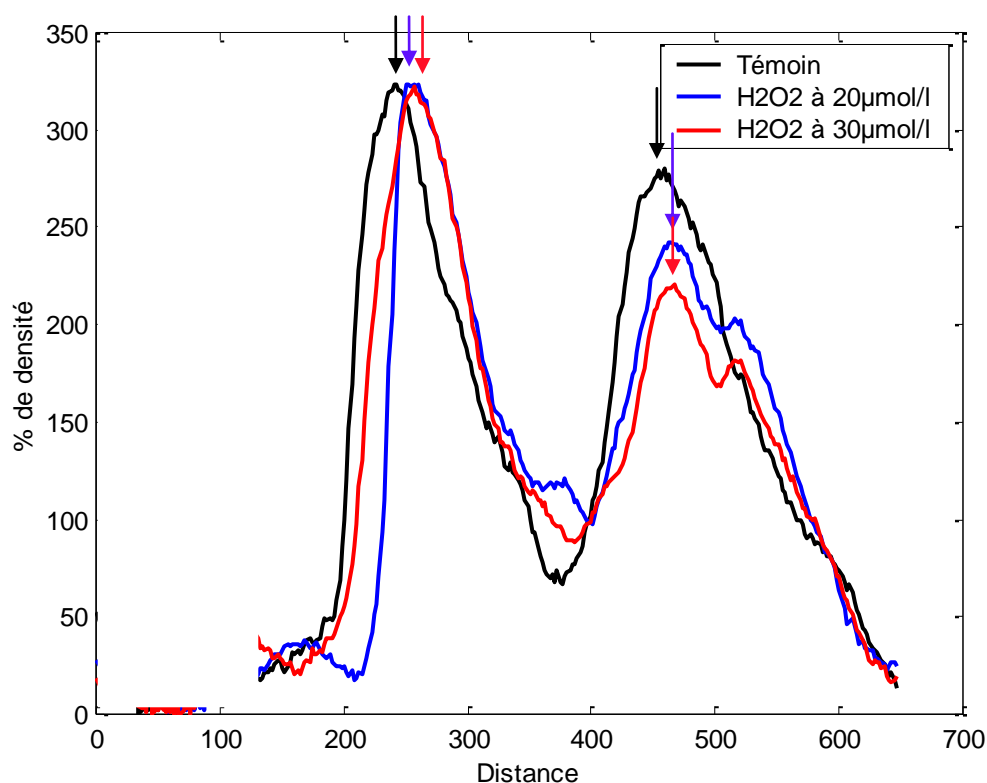
1.1.2 Effet de H₂O₂ :

Figure 35: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H₂O₂

Tableau 18: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines oxydées par H₂O₂

	Témoïn		H ₂ O ₂ à 20 µmol/l		H ₂ O ₂ à 30 µmol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	3.93	7.38	4.14	7.59	4.2	7.62
Vitesse de migration (cm/h)	7.86	14.76	8.28	15.18	8.4	15.24

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 35, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par H_2O_2 à une concentration de $20 \mu\text{mol/l}$ avaient migré plus loin que celles du témoin et que les lipoprotéines traitées par H_2O_2 à $30 \mu\text{mol/L}$ avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par H_2O_2 à $20 \mu\text{mol/L}$.
- On a remarqué aussi après calcul des vitesses de migration que pour les LDL et les HDL, elles augmentent en présence de H_2O_2 et que cette augmentation est également proportionnelle à la concentration en H_2O_2 comme nous le montre le tableau 18.

1.2. Effet des antioxydants sur les lipoprotéines du sérum total :

1.2.1. Effet de la vitamine C :

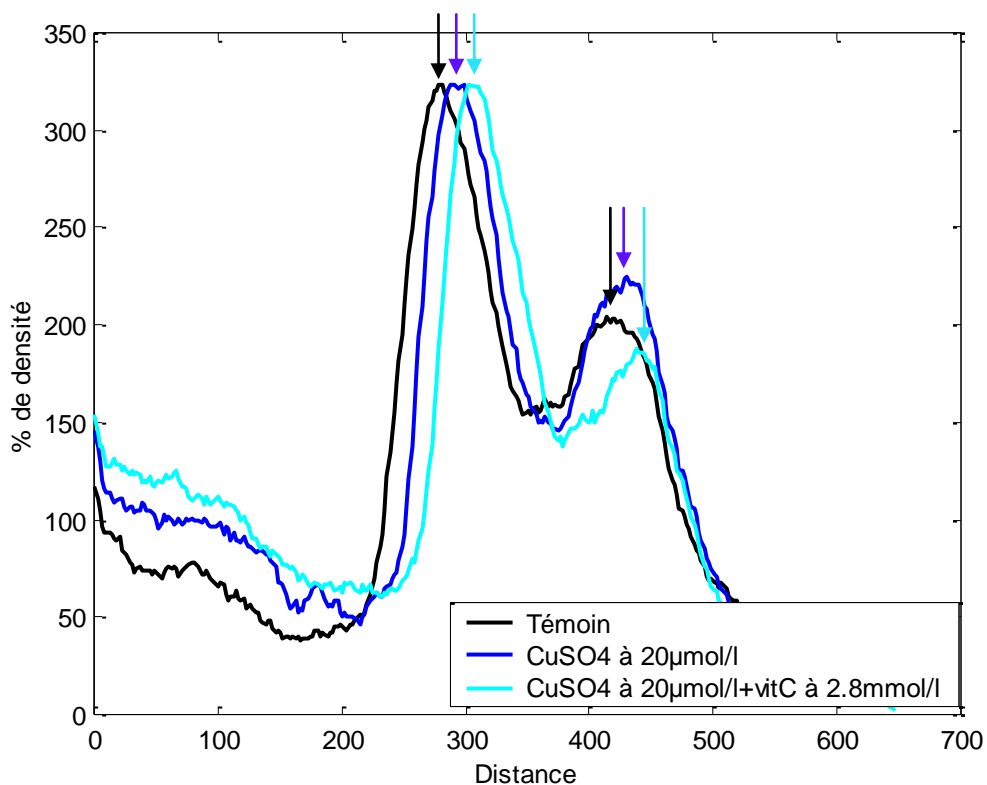


Figure 36: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de CuSO_4 et de vitamine C

Tableau 19 : Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins, lipoprotéines oxydées par CuSO_4 et des lipoprotéines en présence de CuSO_4 et de vitamine C

	Témoin		CuSO_4 à $20\mu\text{mol/l}$		CuSO_4 à $20\mu\text{mol/l}$ +vit C à 2.8 mmol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	4.52	6.82	4.76	7.03	4.99	7.27
Vitesse de migration (cm/h)	9	13.64	9.52	14.06	9.98	14.54

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 36, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par CuSO_4 à $20\mu\text{mol/l}$ en présence de vitamine C à 2.8mmol/L avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par CuSO_4 à $20\mu\text{mol/L}$ seul.
- On a en outre remarqué que pour les LDL et les HDL, les vitesses de migration en présence conjointe du CuSO_4 et de la vitamine C sont plus grandes par rapport à celles du témoin ainsi qu'à celles de l'échantillon en présence de CuSO_4 seul, comme nous le montre le tableau 19.

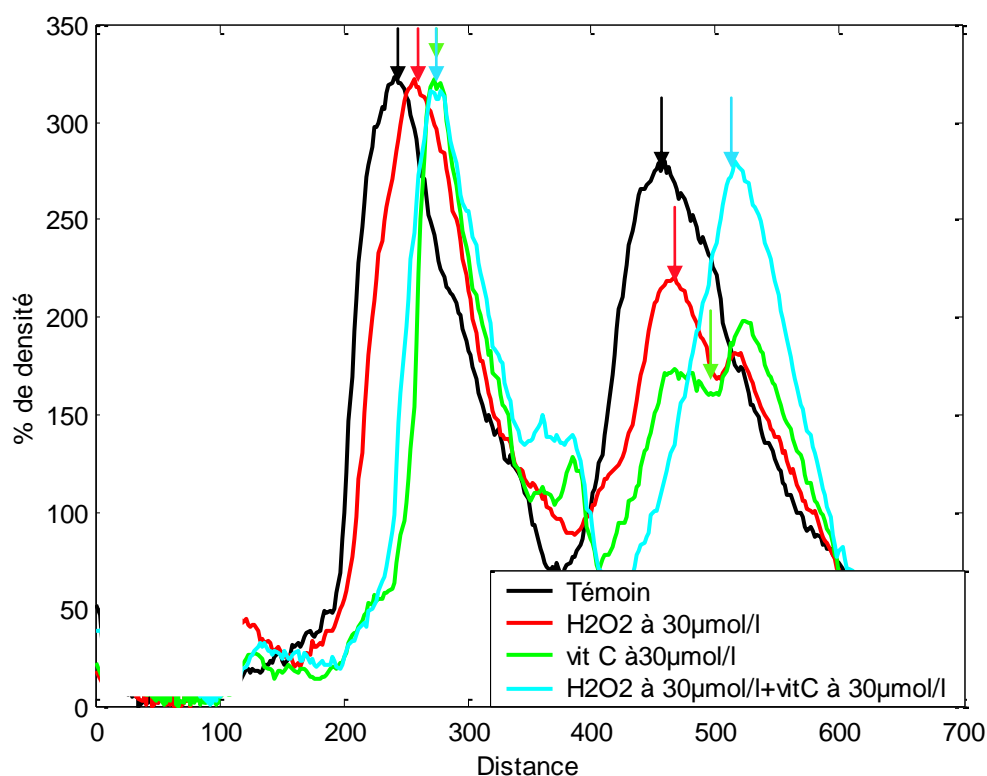


Figure 37: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H_2O_2 et de vitamine C

Tableau 20: Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoin, des lipoprotéines oxydées par H_2O_2 et des lipoprotéines en présence de H_2O_2 et de vitamine C

	Témoin		H_2O_2 à 30µmol/l		Vit C à 30µmol/l		H_2O_2 à 30µmol/l + vit C à 30µmol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	3.96	7.44	4.19	7.59	4.43	8.18	4.43	8.42
Vitesse de migration (cm/h)	7.92	14.88	8.38	15.18	8.86	16.36	8.86	16.84

- En comparant les 4 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 37, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par H_2O_2 à 30 $\mu\text{mol/l}$ en présence de vitamine C à 30 $\mu\text{mol/l}$ et celles en présence de vitamine C seule avaient migré plus loin que les lipoprotéines du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par H_2O_2 à 30 $\mu\text{mol/L}$ seul. On a aussi remarqué que les LDL du sérum traitées par H_2O_2 à 30 $\mu\text{mol/L}$ conjointement avec la vitamine C à 30 $\mu\text{mol/L}$ et celles de l'échantillon en présence de vitamine C seule avaient migré à la même position. Pour ce qui est des HDL on a remarqué que la vitesse de migration était légèrement supérieure pour le sérum traité par H_2O_2 à 30 $\mu\text{mol/L}$ conjointement avec la vitamine C à 30 $\mu\text{mol/L}$ par rapport à celles de l'échantillon en présence de vitamine C seule.

- On a en plus remarqué que pour les LDL et les HDL, les vitesses de migrations en présence de H_2O_2 et de la vitamine C et celles en présence de vitamine C seule sont plus grandes par rapport à celles du témoin et celles en présence de H_2O_2 seul. Quant aux LDL du sérum traitées par H_2O_2 en présence de la vitamine C et celles de l'échantillon en présence de la vitamine C seule avaient des vitesses de migration égales et ce contrairement aux HDL qui présentaient des vitesses de migrations légèrement supérieures lorsqu'elles sont traitées sous les mêmes conditions, comme nous le montre le tableau 20.

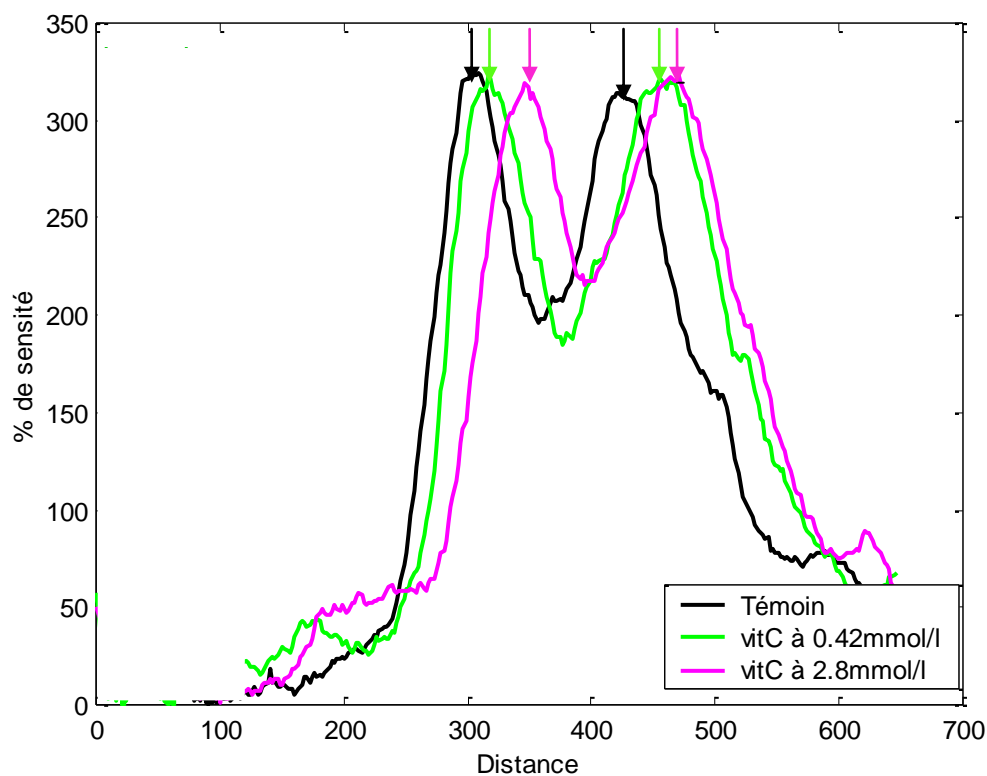


Figure 38: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de vitamine C

Tableau 21 : Distance et vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines en présence de vitamine C

	Témoin		Vit C à 0.42mmol/l		Vit C à 2.8 mmol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	4.96	6.94	5.17	7.41	5.7	7.61
Vitesse de migration (cm/h)	9.92	13.88	10.34	14.82	11.4	15.22

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 38, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par la vitamine C à une concentration de 0.42 mmol/l avaient migré plus loin que celles du témoin et que les lipoprotéines traitées par la vitamine C à 2.8mmol/l avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par la vitamine C à 0.42mmol/l.
- Après quoi on a remarqué que pour les LDL et les HDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de vitamine C et que cette augmentation est proportionnelle à la concentration, comme nous le montre le tableau 21.

1.2.2. Effet de la vitamine E :

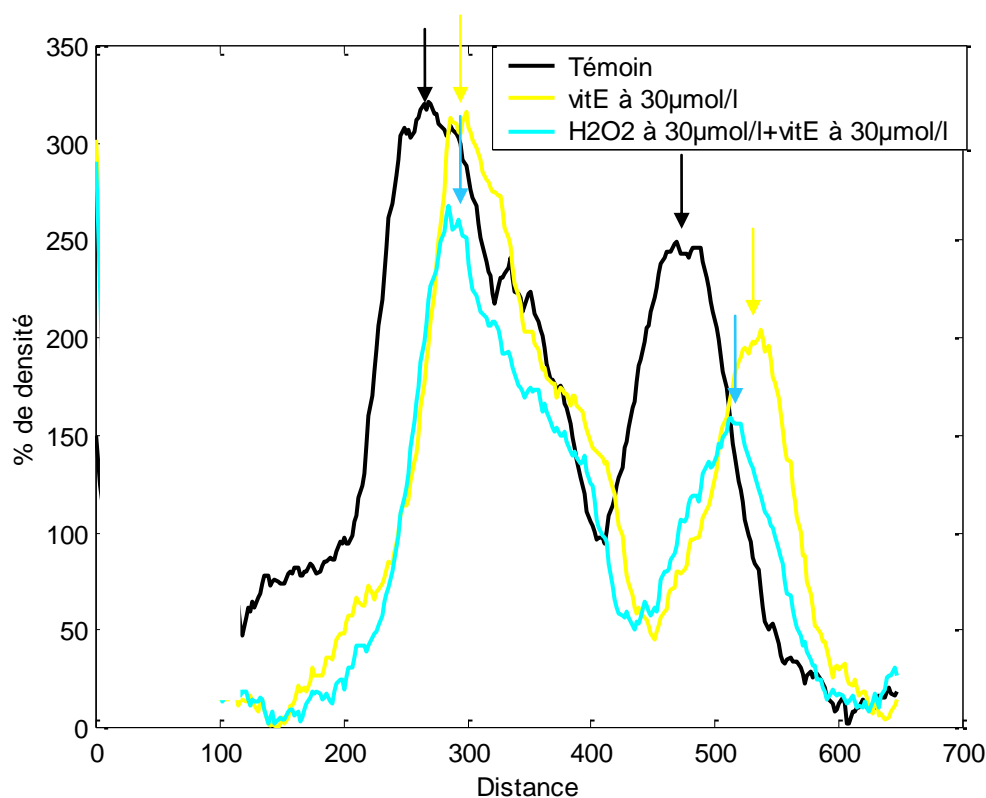


Figure 39: Profils électrophorétiques des lipoprotéines d'un sérum total en présence et en absence de H₂O₂ et de vitamine E

Tableau 22 : Distance vitesse de migration des lipoprotéines témoins et des lipoprotéines en présence de vitamine E

	Témoin		Vit E à 30 μ mol/l		H ₂ O ₂ à 30 μ mol/l +vit E à 30 μ mol/l	
	LDL	HDL	LDL	HDL	LDL	HDL
Distance de migration (cm)	4.34	7.77	4.84	8.71	4.67	8.45
Vitesse de migration (cm/h)	8.68	15.54	9.68	17.42	9.34	16.9

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des lipoprotéines LDL et HDL du sérum total de la figure 39, on a remarqué que les lipoprotéines traitées par la vitamine E à 30 μ mol/l avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par H₂O₂ à 30 μ mol/l en présence de vitamine E à 30 μ mol/l.
- On a aussi remarqué que pour les LDL et les HDL, les vitesses de migration en présence de vitamine E seule sont plus grandes par rapport à celles du témoin et à celles de l'échantillon en présence de H₂O₂ et de la vitamine E, comme nous le montre le tableau 22.

1.3. Effet des oxydants sur les lipoprotéines séparées :

1.3.1. Effet de CuSO_4 sur les LDL :

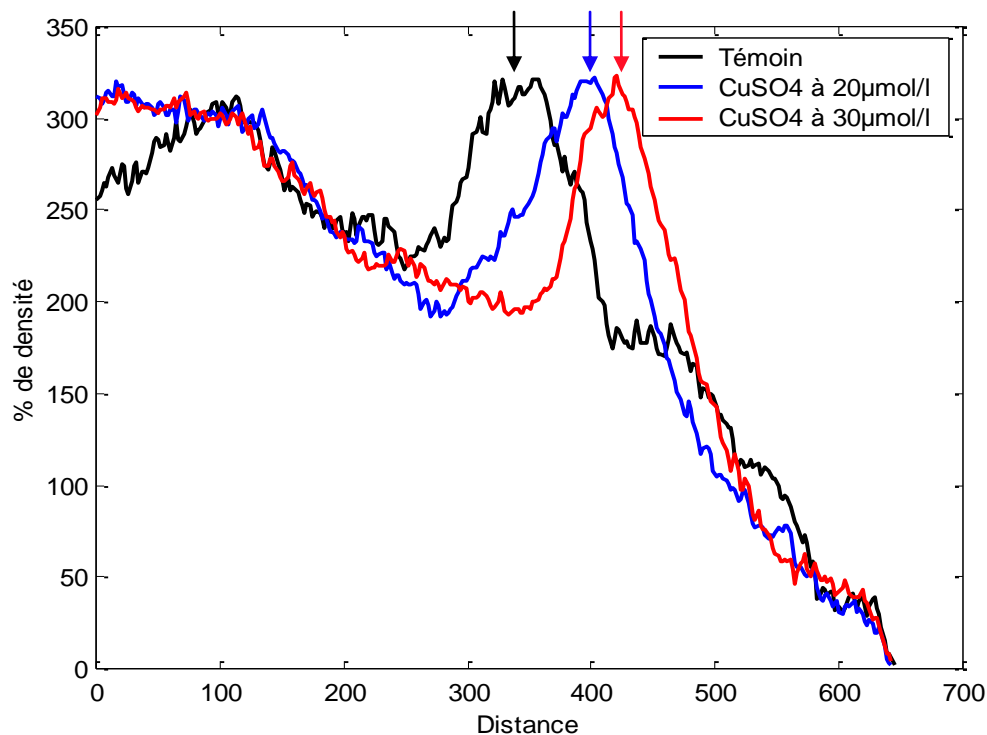


Figure 40: Profils électrophorétiques des LDL en présence et en absence de CuSO_4

Tableau 23: Distance et vitesse de migration des LDL témoins et des LDL oxydées par CuSO_4

	LDL		
	Témoïn	CuSO_4 à $20\mu\text{mol/l}$	CuSO_4 à $30\mu\text{mol/l}$
Distance de migration (cm)	5.46	6.47	6.88
Vitesse de migration (cm/h)	10.92	12.94	13.76

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des LDL de la figure 40, on a remarqué que les LDL traitées par CuSO_4 à une concentration de $20 \mu\text{mol/l}$ avaient migré plus loin que celles du témoin et que les LDL traitées par CuSO_4 à $30 \mu\text{mol/l}$ avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traitées par CuSO_4 à $20 \mu\text{mol/l}$.
- On a en plus remarqué que pour les LDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de CuSO_4 et que cette augmentation est proportionnelle à la concentration en CuSO_4 comme nous le montre le tableau 23.

1.3.2. Effet de CuSO_4 sur les HDL :

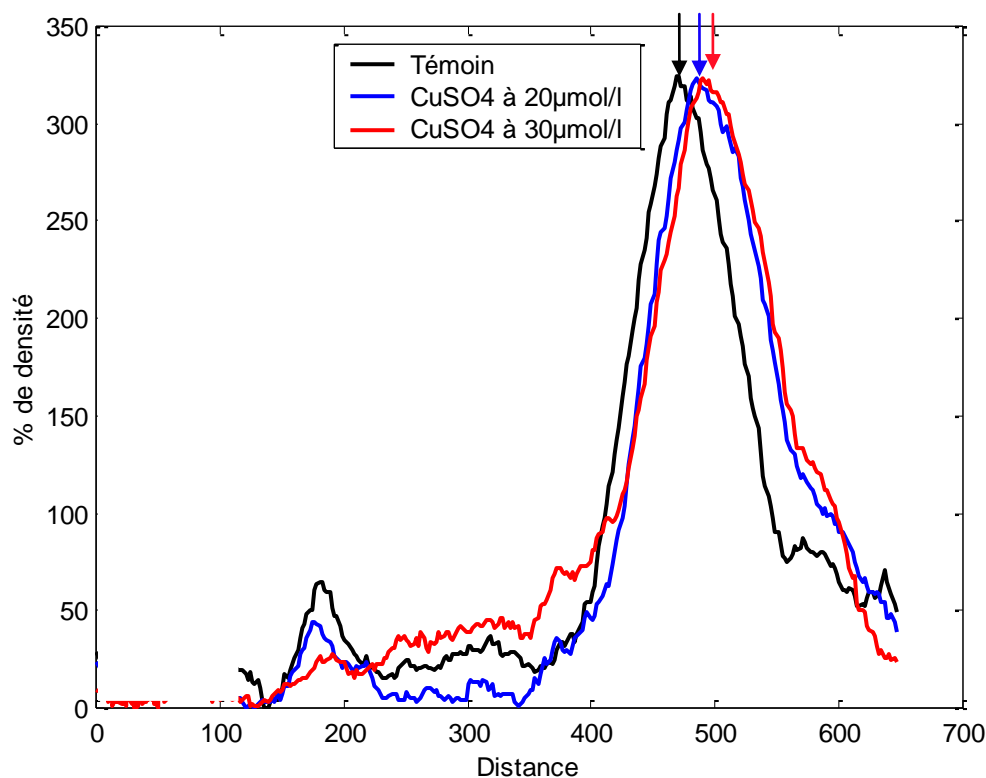
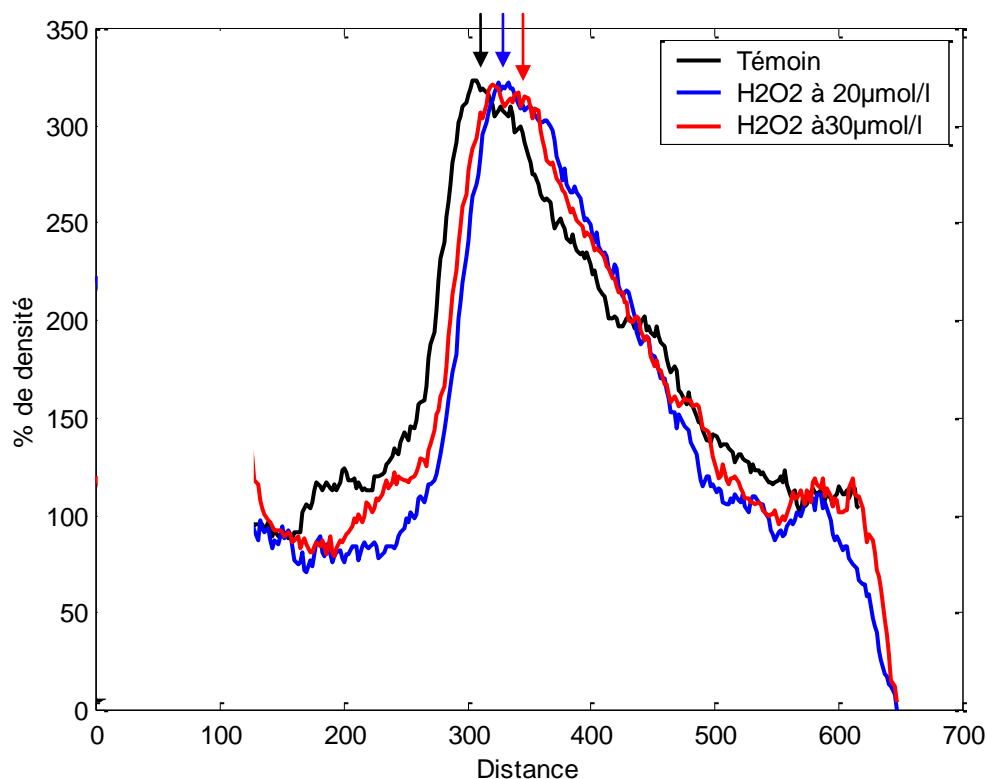


Figure 41: Profils électrophorétiques des HDL en présence et en absence de CuSO_4

Tableau 24 : Distance et vitesse de migration des HDL témoins et des HDL oxydées par CuSO₄

	Témoin	CuSO ₄ à 20µmol/l	CuSO ₄ à 30µmol/l
Distance de migration (cm)	7.68	7.92	8.06
Vitesse de migration (cm/h)	15.36	15.84	16.12

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des HDL de la figure 41, on a remarqué que les HDL traitées par CuSO₄ à une concentration de 20 µmol/l avaient migré plus loin que celles du témoin et que les HDL traitées par CuSO₄ à 30 µmol/L avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par CuSO₄ à 20 µmol/l.
- On a remarqué que pour les HDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de CuSO₄ et que cette augmentation est proportionnelle à la concentration en CuSO₄ comme nous le montre le tableau 24.

1.3.3. Effet de H₂O₂ sur les LDL :Figure 42: Profils électrophorétiques des LDL en présence et en absence de H₂O₂Tableau 25 : Distance et vitesse de migration des LDL témoins et des LDL oxydées par H₂O₂

	Témoïn	H ₂ O ₂ à 20µmol/l	H ₂ O ₂ à 30µmol/l
Distance de migration (cm)	4.99	5.32	5.47
Vitesse de migration (cm/h)	9.98	10.64	10.94

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des LDL de la figure 42, on a remarqué la même modification qu'avec le CuSO_4 , les LDL traitées par H_2O_2 à une concentration de $20 \mu\text{mol/l}$ avaient migré plus loin que celles du témoin et que les LDL traitées par H_2O_2 à $30 \mu\text{mol/l}$ avaient migré plus loin que celles du témoin ainsi que celles de l'échantillon traité par H_2O_2 à $20 \mu\text{mol/l}$.
- On a remarqué là aussi que pour les LDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de H_2O_2 et que cette augmentation est proportionnelle à la concentration en H_2O_2 comme nous le montre le tableau 25.

1.3.4. Effet de H_2O_2 sur les HDL :

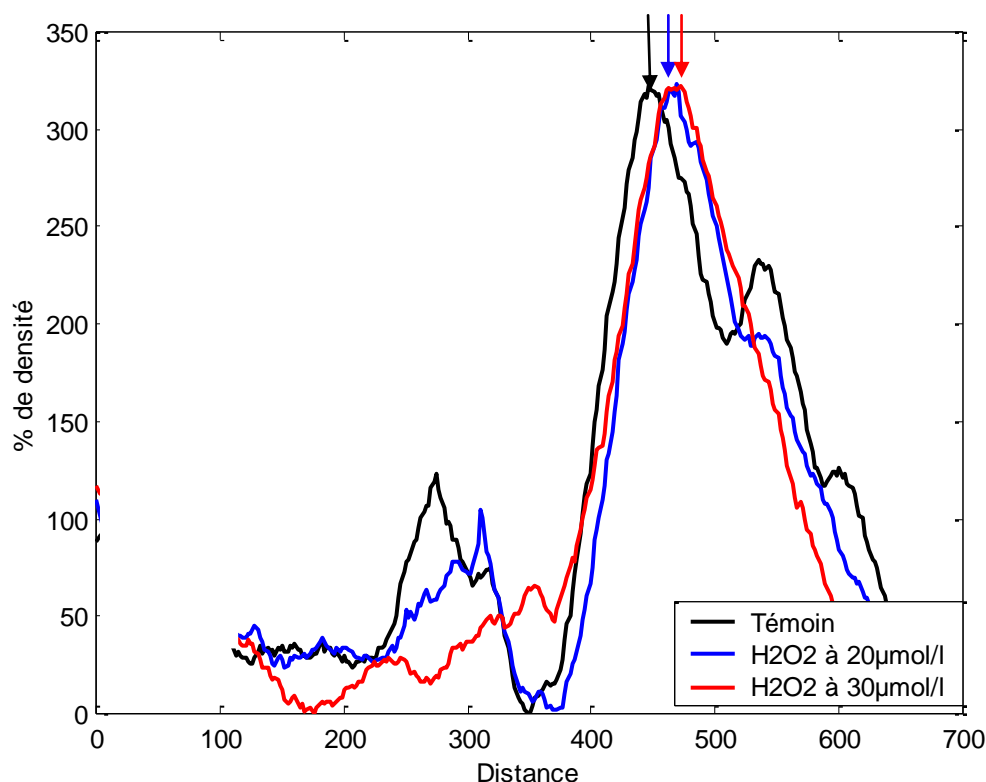


Figure 43: Profils électrophorétiques des HDL en présence et en absence de H_2O_2

Tableau 26 : Distance et vitesse de migration des HDL témoins et des HDL oxydées par H₂O₂

	Témoin	H ₂ O ₂ à 20µmol/l	H ₂ O ₂ à 30µmol/l
Distance de migration (cm)	7.21	7.59	7.62
Vitesse de migration (cm/h)	14.42	15.18	15.24

- En comparant les 3 profils électrophorétiques des HDL de la figure 43, on a remarqué que les HDL traitées par H₂O₂ à une concentration de 20 µmol/L et celles de l'échantillon traité par H₂O₂ à 30 µmol/L étaient presque superposables et que les deux avaient migré plus loin que celles du témoin.
- On a en outre remarqué que pour les HDL, les vitesses de migrations augmentent en présence de H₂O₂ et que pour des concentrations différentes on a eu presque des vitesses égales, comme nous le montre le tableau 26.

2. Discussion :

La découverte du stress oxydant et son implication dans de nombreuses pathologies humaines a bouleversé notre compréhension des mécanismes biologiques. Les lipides sont à l'épicentre de ce phénomène du fait de leur importante implication dans la génération des produits peroxydés qui sont d'excellents marqueurs des dommages oxydatifs. Cependant, l'analyse de la peroxydation lipidique, *in vitro* ou *in vivo*, est encore complexe faisant ainsi l'objet de plusieurs recherches.

L'objectif escompté de cette étude est d'induire une oxydation *in vitro* qui reflète le stress oxydant et d'évaluer l'effet de cette oxydation sur les lipoprotéines sériques par électrophorèse sur acétate de cellulose.

Effet de CuSO_4 :

Le Cu^{2+} est le catalyseur le plus couramment utilisé dans les études qui s'intéressent à l'oxydation des lipoprotéines *in vitro*, comme nous le montre la plupart des articles rédigés à ce sujet [97-104]. L'une des explications les plus acceptées pour la toxicité cellulaire induite par le cuivre vient de l'hypothèse que le cuivre peut interférer avec plusieurs voies métaboliques et induire ainsi différentes réponses cellulaires. Ce métal a été bien décrit comme un promoteur du stress oxydant en catalysant la formation des ERO [105] [106]. Le cuivre libre ou le complexe de cuivre de faible poids moléculaire est capable de catalyser la réaction entre l'anion superoxyde et H_2O_2 produisant le radical hydroxyle (Réaction de Fenton et d'Haber-Weiss) [107].

Les résultats de notre étude ont montré que l'oxydation des lipoprotéines par Cu^{2+} *in vitro* évaluée par la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose a entraîné une augmentation de la vitesse de migration qui est proportionnelle à la concentration en Cu^{2+} . La vitesse de migration des LDL du sérum total oxydées par 20 $\mu\text{mol/l}$ de Cu^{2+} ainsi que celle oxydées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de Cu^{2+} a augmenté de 5.3% et de 10.4% respectivement par rapport aux LDL

témoins. Alors que pour les LDL séparées par précipitation, on a obtenu une augmentation de la vitesse de migration de 18.5% et de 26% pour les mêmes concentrations en Cu^{2+} .

Pour les HDL du sérum total la vitesse de migration de l'échantillon oxydées par 20 $\mu\text{mol/l}$ de Cu^{2+} ainsi que celles oxydées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de Cu^{2+} , a augmenté de 3.5% et de 5.7% respectivement par rapport aux HDL témoins. alors que pour les HDL séparées par précipitation, on a obtenu une augmentation de la vitesse de migration de 3.1% et de 5% pour les mêmes concentrations en Cu^{2+} .

Effet de H_2O_2 :

Après l'obtention de résultats significatifs avec le CuSO_4 , on a voulu essayé un autre oxydant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui possède un fort pouvoir oxydant participant indirectement à la toxicité de l'oxygène et est capable d'induire la réaction de Fenton générant ainsi des radicaux libres [108]. Cet oxydant non radicalaire a la propriété d'altérer la structure protéique des lipoprotéines et spécialement celles qui comportent des groupement sulfhydryle (SH) tels que la méthionine et la cystéine.

Les résultats ont montré une augmentation de la vitesse de migration qui est proportionnelle à la concentration en H_2O_2 . La vitesse de migration des LDL du sérum total oxydées par 20 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 ainsi que celles oxydées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 a augmenté de 5.3% et de 6.9% respectivement par rapport aux LDL témoins. Alors que pour les LDL séparées par précipitation, on a obtenu une augmentation de la vitesse de migration de 6.6% et de 9.6% pour les mêmes concentrations en H_2O_2 .

Pour les HDL du sérum total, la vitesse de migration de l'échantillon oxydé par 20 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 ainsi que celles oxydées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 a augmenté de 2.9% et de 3.3% respectivement par rapport aux HDL témoins. Alors que pour les HDL séparées par précipitation, on a obtenu une augmentation de la vitesse de migration de 5.3% et de 5.7% pour les mêmes concentrations en H_2O_2 .

Sur la base des résultats obtenus après utilisation des 2 oxydants, on peut dire que :

L'augmentation de la vitesse de migration après oxydation des lipoprotéines par CuSO_4 et H_2O_2 est probablement due à une augmentation de la charge négative, ceci étant évoqué par plusieurs auteurs. Selon Jean Louis Paul et al, l'oxydation des LDL débute par la

peroxydation des AGPI portés par les LDL, AGPI qui estérifient le cholestérol, les phospholipides (PL) et les triglycérides, ceci conduit à la fragmentation de ces AGPI avec notamment la production de cétones, qui sont éliminées, et d'aldéhydes qui se fixent sur les résidus Lysine de l'apoB100 augmentant ainsi sa charge négative [109]. Cela étant appuyer par d'autres chercheurs comme Steinberg [110].

D'autres travaux ont aussi montré que l'oxydation des LDL induit un débobinement partiel de la structure secondaire de l'Apo B, ce débobinement est corrélé à l'augmentation de charges négatives des LDL oxydées [111].

La vitesse de migration des LDL oxydées après précipitation est plus grande que celle des LDL oxydées du sérum total, ce qui est probablement due au pouvoir protecteur des HDL qui s'oppose à l'oxydation des LDL. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont suggéré que les HDL empêchent l'oxydation des LDL en chélatant les ions Cu^{2+} ou Fe^{2+} utilisés comme oxydants [112], [113]. Selon Hinsberg et al, l'incubation des LDL en présence de HDL pendant l'oxydation par Cu^{2+} ou Fe^{2+} empêche légèrement l'augmentation de la mobilité électrophorétique des LDL ainsi que la formation des substances réactives au TBA et des peroxyde lipidiques [114].

Selon Mackness et al, plusieurs lignes de preuve suggèrent que les HDL agissent de manière enzymatique pour prévenir l'oxydation des LDL. Il ne faut pas non plus négliger que les HDL est l'espèce dominante de lipoprotéines dans l'ensemble du fluide tissulaire et qu'il pourrait donc avoir un rôle plus omniprésent dans la protection des tissus contre les produits de peroxydation des lipides cytotoxiques autres que les LDL, qui ont été impliqués dans une grande variété de maladies [115].

On peut aussi suggérer que cette différence de vitesse est due à la présence de l'albumine dans le sérum total, qui est considéré comme l'antioxydant majeur et prédominant dans le plasma, capable d'inhiber l'oxydation des lipoprotéines induite par les métaux de transition.

Jiri Neuzil et al ont démontré que le complexe albumine-bilirubine associé aux lipoprotéines peut protéger efficacement les lipides de la peroxydation. Ceci est probablement réalisé par l'interaction du α -tocophérol (vitamine E) des lipoprotéines avec la bilirubine [116].

Effet de la vitamine C :

Il existe plusieurs antioxydants biologiquement pertinents qui agissent pour restaurer l'équilibre oxydatif dans l'environnement cellulaire. En ce qui concerne notre étude nous avons utilisé la vitamine C qui est facile à obtenir et agit efficacement contre la peroxydation lipidique, les résultats ont montré que l'incubation des lipoprotéines avec la vitamine C à différentes concentrations, en présence et en absence d'oxydants pendant 24h avaient entraînés une augmentation de la vitesse de migration qui est proportionnelle à la concentration en vitamine C, ceci ne correspondaient pas à l'effet antioxydant attendu de la vitamine C qui aurait du entraîner une diminution de la vitesse de migration des lipoprotéines oxydées.

En premier lieu le traitement du sérum avec 2.8mmol/L de vitamine C en présence de 20 μ mol/l de CuSO_4 a donné une augmentation de la vitesse de migration des LDL de 10.9% par rapport aux LDL témoins et une augmentation de 5.1% par rapport aux LDL oxydées par le CuSO_4 en absence de vitamine C.

Pour les HDL, soumis aux mêmes conditions que les LDL, nous avons eu une augmentation des vitesses de migration de 6.6% par rapport aux HDL témoins et 3.5% par rapport aux HDL oxydées.

En second lieu le traitement du sérum avec $30\mu\text{mol/l}$ de vitamine C en présence de $30\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 a donné une même vitesse de migration des LDL que celle en présence de vitamine C seule, et une augmentation de 11.8% par rapport aux LDL témoins et de 6% par rapport aux LDL oxydées par le H_2O_2 en absence de vitamine C.

Pour les HDL nous avons obtenus une augmentation de la vitesse de migration de 3.3% en présence de $30\mu\text{mol/l}$ de vitamine C et de H_2O_2 par rapport aux HDL en présence de vitamine C seule et de 13.2% par rapport aux HDL témoins et enfin de 11.2% par rapport aux HDL en présence de H_2O_2 seul.

En dernier lieu le traitement du sérum par la vitamine C seule à deux concentrations différentes a donné comme résultat une augmentation de la vitesse de migration de 4.2% des LDL en présence de 0.42mmol/l de vitamine C et de 14.9% en présence de 2.8mmol/L de vitamine C par rapport aux LDL témoins.

Pour les HDL nous avons obtenus une augmentation de la vitesses de migration de 6.7% pour des concentration de 0.42mmol/l de vitamine C et de 9.6% pour des concentrations de 2.8mmol/l de vitamine C par rapport aux HDL témoins.

A partir des résultats cités ci-dessus on peut émettre en avant les hypothèses suivantes :

L'acide ascorbique en présence du tampon véronal à pH alcalin (8.6) se retrouve sous forme d'anion ascorbate chargé négativement ainsi en se liant aux lipoprotéines plasmatiques, ce dernier leurs confères probablement des charges négatives supplémentaires induisant alors une augmentation de la vitesse de migration.

Au cours des dernières années, en plus du rôle antioxydant de l'ascorbate, plusieurs études ont exploré aussi ses propriétés pro-oxydantes. Les préoccupations ont été soulevées, principalement par rapport aux effets pro-oxydants médiés par des ions de métal de transition potentiellement délétères. Un rapport récent sur l'effet pro-oxydant de l'interaction du fer et de la vitamine C in vivo a révélé qu'un supplément combiné quotidien de fer (100 mg sous forme de fumarate) et de vitamine C (500 mg d'ascorbate) au troisième trimestre de grossesse a entraîné une augmentation de 20% de l'oxydation des lipides du plasma [105].

L'acide ascorbique est un excellent agent réducteur. Il est capable de réduire les métaux rédox-actifs tels que le cuivre et le fer, augmentant ainsi l'activité pro-oxydante de ces métaux. Les niveaux de traces de métaux de transition peuvent participer à la réaction d'Haber / Weiss et catalyser l'oxydation de l'acide ascorbique. Ainsi, l'acide ascorbique peut servir à la fois de pro-oxydant et d'antioxydant in vitro selon les conditions expérimentales, à de faibles concentrations, l'acide ascorbique est susceptible d'être un pro-oxydant, et à des concentrations élevées, il a tendance à être un antioxydant. Cet effet de croisement est en fonction de la concentration du métal catalytique. [117].

Yin et al ont observé une activité pro-oxydante à pH 7.4 et pH 1.2, ce résultat indique que l'acide ascorbique non dissocié et l'ion ascorbate monobasique peuvent s'associer avec Cu^{2+} pour initier la production de radicaux libres. La réduction de Cu^{2+} à Cu^+ par la vitamine C s'accompagne d'une production du radical ascorbyle. Ces résultats indiquent également que pour certains antioxydants, tels que la vitamine C, l'activité pro-oxydante associée au cycle redox est évidente lorsque le rapport antioxydant à l'ion métal est relativement faible [118].

Effet de la vitamine E :

La vitamine E « α -tocophérol» est un antioxydant qui a été connu pour agir comme un purificateur de radicaux puissant et pour supprimer efficacement l'oxydation de la chaîne des radicaux libres.

Les résultats du traitement des lipoprotéines du sérum total par la vitamine E ont montré le même effet inattendu qu'avec la vitamine C, au lieu d'avoir une diminution de la vitesse de migration, on a constaté plutôt une augmentation de la vitesse des LDL traitées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de vitamine E de 11.52 % et de 7.6% pour celles traitées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 et de vitamine E par rapport aux LDL témoins

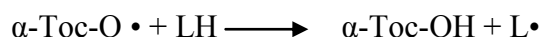
Pour les HDL du sérum total traitées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de vitamine E, la vitesse de migration a augmenté de 12.74 % et de 8.8 % pour celles traitées par 30 $\mu\text{mol/l}$ de H_2O_2 et de vitamine E par rapport aux HDL témoins .

A partir de ces résultats, on peut émettre en avant les hypothèses suivantes :

On a utilisé la vitamine E commercialisée au niveau des officines, ceci peut être à l'origine de l'effet oxydant qui est probablement du à un ou plusieurs excipients de la forme capsulée de l' α -tocophérol.

Cependant des études ont montré que la vitamine E pouvait avoir un rôle pro-oxydant.

Il a d'abord été suggéré au début des années 90 que le radical α -tocophéroxyde peut servir de pro-oxydant lors de l'oxydation des LDL. Bowry et ses collègues ont proposé le modèle de peroxydation par l' α -tocophérol des LDL, dans lequel le processus est initié par l'extraction d'un atome d'hydrogène à partir d'un groupe méthylène bis-allylique dans un AGPI par le radical α -Toc-O \cdot , bien qu'il soit extrêmement lent [119].



Abuja et al ont constaté qu'en présence d'ions Cu, la vitamine E peut se comporter comme un pro-oxydant dans certaines conditions in vitro [120]. En outre Burkitt et al ont observé que l'augmentation de la quantité d' α -tocophérol dans les LDL peroxydées montrent une susceptibilité accrue à l'oxydation [119], d'autres études ont montré que lorsque l'ion libre de cuivre (II) est présent à proximité d' α -tocophérol, il pourrait bien interagir avec l' α -tocophérol pour donner l'ion cuivre (I). Dans ces circonstances, L' α -tocophérol peut agir comme un pro-oxydant, mais un tel effet peut ne pas être important in vivo, où la quasi-totalité de l'ion cuivre est séquestré [121].

Limite de l'étude :

Pour réaliser ce travail nous avons été confrontés aux différents aléas et difficultés :

- disponibilité très limitée des plaques d'acétates de cellulose
- Difficulté à trouver un seul donneur pour la totalité de l'étude en raison des quantités de sang à prélever régulièrement.
- Difficulté pour l'adaptation du protocole aux conditions du laboratoire.

Conclusion :

Un risque cardiovasculaire élevé est souvent associé à un profil lipoprotéique plasmatique perturbé avec des LDL augmentées et des HDL diminuées. De nombreux travaux ont montré que les LDL modifiées et en particulier les LDL oxydées étaient hautement athérogènes.

En utilisant l'électrophorèse , méthode physico-chimique simple, facile d'accès et peu onéreuse pour un laboratoire de biologie clinique de pays à faible revenus, nous avons pu déterminer l'électronégativité des lipoprotéines sériques oxydées in vitro.

Les résultats obtenus après traitement des lipoprotéines par des antioxydants qui sont la vitamine C et la vitamine E sont quelque peu surprenant, en effet on a obtenu un résultat comparable à celui du traitement par les oxydants, ceci nous laisse perplexe devant l'effet antioxydant de ces vitamines sur les lipoprotéines et si c'est la technique d'électrophorèse qui ne permet pas d'apprécier leur rôle antioxydant ou bien qu'à certaines concentration on a un effet pro-oxydant.

Ce travail préliminaire qui doit être complété par d'autres études clinico-biologiques à large échelle pourraient confirmer l'utilité ou la pertinence de l'index d'électronégativité des lipoprotéines comme index de risque cardiovasculaire. D'autre part, des travaux utilisant des modèles animaux pourraient permettre de déterminer les approches thérapeutiques appropriées pour réduire notamment les fractions LDL négatives dangereuses.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

1. **Murray , Granner, Mayes,Rodwell.** Biochimie de Harper 25ème édition américaine revue et mise à jour traduite .
2. **Semmame Ouarda**, mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en génétique des pathologies humaines , thème étude des marqueurs biologiques (lipides , homocysteines , CRP) et génétique (MTHFR) dans l'infarctus du myocarde IDM **2008/2009** pp16 .
3. **Simon Beaumont** , biochimie cours , exercices , annales et QCM corrigés , Dunod paris **2005** pp 55.
4. **Pierre Peycru , Bernard Augère , Jean-claude Baehr , Didier Grandperrin , Christian Perrier** , biologie tout en un 1^{ère} année BCPST , Dunod , paris **2006** , pp 60 .
5. **Jean-michel Petit , Sébastien Arice , Raymond Julien.** Mini manuel de biologie cellulaire , Dunod Paris **2007** , pp 28 .
6. **Serge Weinman , Pierre Méhul** .Toute la biochimie , Dunod octobre **2004** , pp81.
7. **Jaques-Paul Borel et Michel Stenberg.** Biochimie et biologie moléculaire illustrée , édition Frison-Roche Paris **2000** , pp46.
8. **Bernadette et Philippe Hecketsweiler** , voyage en biochimie 3^{ème} édition Elsevier **2004** , pp25.
9. **Claude audignié , François Zonszain** , Biochimie structurale , 6^{ème} édition Doin , tirage **2007** , pp223
10. **Florian Horn , Gerd Lindenmeier , Christian Grillhosl , Isabelle Moc . Sill Berghold , Nadine Scheneider , Brigit Munster** .Biochimie humaine , edition Flammarion, avril **2005** , pp141
11. **William J. Marshall , Stephan K. Bangert.** Biochimie médicale physiopathologie et diagnostic , édition Elsevier **2005** pp 244 .
12. **Daniel Richard , Patrick Chevalet , Sylvie Fournel , Nathalie Giraud , Frédéric Gros, Patrick Laurenti , Fabienne Pradère , Thierry Soubaya** , biologie 2^{ème} édition Dunod Paris **2012** , pp 223.
13. **Moussard** Biochimie et biologie moléculaire , édition de boeck , 2ème tirage **2011** , pp 159,160 .
14. **Genot C , Michalski M** , impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments , Revue carrefour de l'innovation agronomique **2010** .
15. **P. Kammoun , A. Lavoinne , H.Deverneuil** et la collaboration de **M.Darmon et J.Demotes-Mainard.** Biochimie et biologie moléculaire , édition Flammarion **2003** , pp 67 .
16. **François Quentin , Paul-François Gallet , Michel Guilloton , Bernadette Quintard** .Biochimie en 83 fiches , Dunod Paris **2011** , pp 165.
17. **Christian Moussard** , biochimie structurale et métabolique , 2^{ème} édition de boeck **2004** , pp 194.
18. **G. Schapira , J-C. Dreyfus** et collaborateurs. Pathologie moléculaire , Masson et CIE **1975.**

19. **Geneviève Durand , Jean-Louis Beaudeau.** Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives , édition Lavoisier **2008**, pp 117.
20. **Abbas Kawther et Djermoun Manel** , mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master académique , thème étude de l'effet de l'extrait aqueux de *Portulaca oleracea* sur l'obésité chez les souris de wistar , **2014/2015** .
21. **N. Mallikarjuna Rao.** Medical Biochemistry, 2nd edition New Age International(P) Limited Publishers , **2006**, pp 116.
22. **Geneviève Durand , Jean-Louis Beaudeau.** Biochimie médicale marqueurs actuels et perspectives , 2ème édition **2011** , pp 143.
23. **Barry Lewis**, from the department of Chemical Pathologie and Lipid Disorders Clinic, Royal Postgraduate Medical school , Hammersmith hospital London , classification of lipoproteins and lipopr²oteins disorders journal of Clinical Pathologies **1973**.
24. **Allan Garo ; Michael J .Murphy ; Robert A .Gowan ; Denis St J .O'Reilly Michael J .Stewart, James Shepherd** , coordination scientiphique de l'édition française Michel Vaubourdolle ; Biochimie clinique ; Edition Elsevier septembre **2004** , pp 126.
25. **Zidda Hadia.** Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en génétique moléculaire ; Thème : Polymorphisme de l'appoproteine E dans l'infarctus du myocarde et dans la population générale de Constantine **2005/2006** .
26. **A . Raisonnier** ; Université Pierre et Marie Curie ; Lipides et lipoproteines 2003/2004
27. **Ghizlane Gaougaou.** Mémoire présenté comme exigence partielle de la maitrise de biologie ; Effet de l'activation de l'AMPK sur le métabolisme des lipoproteines chez la souris ; université du Québec à Montréal ; mai **2013**.
28. **Neale D.Ridgway, Roger.S.Macleod,** Biochemistry of lipids , lipoproteins and membranes, 6ème edition ELSEVIER , **2016**, pp 438.
29. **Geoffrey Zobay.** Biochemistry Adisson-Wesley Publishing Company, **1983**, PP559.
30. **Reiner westermeyer** electrophoresis in practice fifth edition **2016** Wiley-VCH
31. **Pr jean-pierre Wainsten** ,le Larousse médical **2009** édition Larousse.
32. **Arne W.K.Tiselius.** Electrophoresis and adsorption analysis as aids in investigations of large molecular weight substances and their breakdown products Nobel Lecture, December 13, **1948**.
33. **Michael Cooke Colin F.Poole, Ian D.Wilson Edward R.Adlard.** Encyclopedia of separation science edition academic press **2000**.
34. **Jan-Christer Janson** protein purification, principles, high resolution methods, and applications volume 54 edition WILEY **2011**.
35. **M. Beljean-Leymarie, C.Bourlioux, C.Doutremepuich, R.Farinotty, J.Y.LeTalayer, D.Porquet.** Biochimie structurale métabolique et clinique éditions Groupe Liaisons SA, **2001**.
36. **Bernard Hainque , Bruno Baudin , Philippe Lefebvre** . Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire , édition Flammarion Médecine-Science **2008** , pp 275.
37. **Lawrence A. Kaplan . Amadeo J.Pesce.** Clinical chemistry theory,analysis,correlation **1996** by Mosby-year Book.
38. **N. Ressler, R. Springgate, J. Kaufman.** A method of lipoprotein electrophoresis journal of chromatography **1961**.
39. **Sathochi Asano , Katsuhiko Suzuki and Kazutoshi Minamitani** .Comparative study of serum lipoproteins separated by the method of cellulose acetate membrane electrophoresis in human and rats **1987** pergamon journals Ltd.

- 40. George C.Klein and Gerald R.Cooper** . Center for Disease Control, Atlanta, Georgia Electrophoretic Determination Of Serum Lipoproteins. Standart Methods of Clinical Chemistry Volume 6,1970.
- 41. R.H.Burdon and P.H.van Knippenberg.** A guidebook to lipoprotein technique Elsevier Science 1984.
- 42. Yazukazu Yoshida , Aya Umeno , Yoko Akazawa , Mototada Shichiri , Kazutoshi Murotomi and Masanori Horie** . Chemistry of Lipid Peroxidation Products and Their Use as Biomarckers in Early Detection of Diseases .
- 43. Dominique Bonnefont Rousselot,** Stress oxidant et vieillissement , Spectra Biologie, 2007.
- 44. Christian Rioux** , Stress Oxydatif et prevention des maladies chroniques , 2009.
- 45. J Pincemail ,M Meurisse ,R Limet et JO Defraigne** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention.
- 46. J.Haleng, J.Pincemail,J.O.Defraigne,C.Charlier ,J.P.Chapelle.** Le stress oxydant.
- 47. Hayet Ramdani , Dalel Mengouchi,** Dissertaton Submitted to the department of Pharmacy for the Degree of Doctor in Pharmacy , Oxidative stress and Obesity ,2016.
- 48. Doudi Dalal et Atia Noura** , Evaluation du métabolisme de fer, de cuivre et de stress oxydatif chez des femmes enceintes dans la région d'El-OUED , 30 mai 2015
- 49. malgorzata Nita , andrzej Grzybowski.** The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults journal Oxidative medicine and cellular longevity 2016
- 50. Joël Pincemail , Karine Bonjean , Karine Cayeux , Jean-Olivier Defraigne.** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante Physiological action of antioxidant defences Nutrition clinique et métabolisme ,2002 , édition Elsevier.
- 51. Alain Favier** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique l'actualité chimique - novembre-décembre 2003.
- 52. subrata kumar, biswas,** does the independence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox, journal Oxidative medicine and cellular longevity 2016.
- 53. Xavier Leverage.** Oxidative, stress and antioxidants? Médecine et nutrition édition Elsevier et Masson 2009.
- 54. Meryem Allioua** , Statut nutritionnel et desordre metaboliques chez les patients atteints de lymphome non hodgkinien, Fevrier 2011
- 55. Okezie I. Aruoma.** Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease OICA International, Saint Lucia, West Indies, and Pharmacology Group, 1998 AOCS Press.
- 56. Valérie Marcil.** Rôle de la peroxydation lipidique dans le développement de l'a thérosclérose Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctorae . En Nutrition fevrier 2008
- 57. Catherine vergely , Luc Rochette.** Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire , John libbey eurotext , Juillet-septembre 2003
- 58. Fabiana Andréa Moura,' Kívia Queiroz de Andrade, Juliana Célia Farias dos Santos,Orlando Roberto Pimentel Araújo, and Marília Oliveira Fonseca Goulart** Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? ,Redox biology , 23 october 2015 , Elsevier .

- 59. Helmut Sies.** Physiological society symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Functions in Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants Experimental Physiology **1997**
- 60. Aurelia Magdalena Pisoschi, Aneta Pop.** The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a Review European Journal of Medicinal Chemistry **2015**.
- 61. Yunbo Li.** Antioxidants in biology and medicine , essentials, advances, and clinical applications nova biomedical **2011**
- 62. John M.C. Gutteridge.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, Clinical chemistry **1995**
- 63. Antonis Zampelas, Renata Micha.** Antioxidants in health and disease CRC Press **2015**
- 64. M. Valko , C.J.Rhodes , J.Moncol , M.Izakovic , M. Mazur.** Free radicals , metals and antioxydants in oxidative stress induced cancer , Chemico- Biological Interactions **2006**, ELSEVIER .
- 65. Klaus Apel and Heribert Hirt** ,Reactive oxygen species : Oxidative stress , and Signal Transduction , Annual Reviews **2004** .
- 66. Amrit Kaur Bansal and G. S. Bilaspuri.** Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions.
- 67. Sivakumar Joghi Thatha Gowder.** Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress Edited by Published by AvE4EvA : 11 November, **2015** pp 44.
- 68. Marisa Repetto, Jimena Semprine and Alberto Boveris .** Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination , Lipid peroxidation, Edited by Angel Catala , August, **2012** pp14.
- 69. Anne Negre-Salvayre, Nathalie Auge, Victoria Ayala, Huveyda Basaga, Jordie Boada ,Rainer Brenck, Sarah Chapple, Guy Cohen, Janos Feher, Tilman Grune, Gabriella Lengyel, Giovanni E.Mann, Reinald Pamplona.** Pathological aspects of lipid peroxidation , Free Radical Research, October 2010 pp.1125–1171.
- 70. John A.Buege and Steven D. Aust.** Microsomal Lipid Peroxidation.
- 71. Peter M. Abuja , Riccardo Albertini.** Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, review Clinica Chimica Acta , ELSEVIER 19 janvier **2001**.
- 72. Etsuo Niki , Yasukazu Yoshida , Yoshiro Saito , Noriko Noguchi ,** Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects ,Review Biochemical and Biophysical Research Communications , Elsevier19 August **2005**.
- 73. Michael M. Gaschler a, Brent R. Stockwell .** Biochemical and Biophysical Research Communications **2017** Elsevier
- 74. Judith Berliner .** Lipid oxidation products and atherosclerosis , Vascular Pharmacology **2002**, 187– 191 Elsevier .
- 75. Tomris Ozben.** Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants Pathological and Physiological Significance , NATO ASI Series Advanced Science Institutes Series , May 24- June 4, **1997**, pp295.
- 76. Albert W. Girotti.** Mechanism of lipid peroxidation, Journal of Free Radicals in Biology and Medicine , **1985** Pergamon Press Ltd.
- 77. Philip Wexler,** Encyclopedia of toxicology third edition Academic Press is an imprint of Elsevier **2014**.
- 78. F.Gueraud, M. Atalay, N. Bresgen, A. Cipak , P. M. Eckl , L. Huc , I. Jouanin, W. Siems and K. Uchida.** Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products Free Radical Research, October **2010**.

- 79. John M.C. Gutteridge. Barry Halliwell.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems , Volume 15,, April **1990**, Pages 129-135
- 80. Josiane CILLARD , Pierre CILLARD .** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations , Laboratoire de biologie cellulaire et végétale, UPRESS EA 3891 « Groupe de Recherche en Thérapeutique Anticancéreuse, Faculté de pharmacie, Rennes.
- 81. Mark P. Mattson ,** Roles of the Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal in Obesity, the Metabolic Syndrome, and Associated Vascular and Neurodegenerative Disorders , NIH Public Access**2009** October.
- 82. Joseph P. Gaut and Jay W. Heinecke.** Mechanisms for Oxidizing Low-Density Lipoprotein Insights from Patterns of Oxidation Products in the Artery Wall and from Mouse Models of Atherosclerosis , Science Inc **2001** , Elsevier.
- 83. Christie M. Ballantyne.** Clinical lipidology : a companion to Braunwald's heart disease , 1st ed. **2009** by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- 84. Judith A. Berliner and Jay W. Heinecke.** The role of oxidized Lipoproteins in atherogenesis, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 20, No. 5, pp. 707-727, **1996** , Elsevier.
- 85. Eiji Matsuura, Kazuko Kobayashi ,1, Masako Tabuchi , Luis R. Lopez.** Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis Progress in Lipid Research ,**2006**, Elsevier.
- 86. Kelvin J. A. Davies,** Oxidative Damage and Repair Chemical, Biological and Medical Aspects Journal Free Radical Biology & Medicine **1991** Pergamon Press pic
- 87. Mihaela Ilie and Denisa Margină ,** Trends in the Evaluation of Lipid Peroxidation Processes , Lipid peroxidation , Edited by Angel Catala , August, **2012** , pp 130
- 88. Lucie Frémont, Leila Belguendouz and Serge Delpal ,**Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids, Life Sciences, Vol. 64, No. 26, pp. 2511-2521, ELSEVIER , March 11, **1999**.
- 89. Sampath Parthasarathy, Achuthan Raghavamenon, Mahdi Omar Garelnabi, and Nalini Santanam.** Oxidized Low-Density Lipoprotein , Free Radicals and Antioxidant Protocols ,Second Edition , **2010**, pp400.
- 90. Mariarosaria Napolitano, Roberto Rivabene , Michael Avella, Laura Amicone , Marco Tripodi, Kathleen M.Botham, and Elena Bravo.** Oxidation affects the regulation of hepatic lipid synthesis by chylomicron remnants, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 30, No. 5, pp. 506–515, **2001**, Elsevier .
- 91. Etsuo Niki .** Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers BioFactors, **2008**.
- 92. Y. Dotan¹, D. Lichtenberg, I. Pinchuk.** Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stressProgress in Lipid Research **2004**, Elsevier.
- 93. Albert.W. Girotti,** Mechanism of lipid peroxidation, Journal of Free Radicals in Biology and Medicine. Vol, I. pp. 87-95. 1985, Elsevier.
- 94. M. Guichardant, S.Bacot , P. Molière, M. Lagarde.** Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique.
- 95. Etsuo Niki , , Yasukazu Yoshida , Yoshiro Saito , Noriko Noguchi .**Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects , Biochemical and Biophysical Research Communications **2005**, 668–676, Elsevier .
- 96. J Pincemail , M Meurisse , R Limet et JO Defraigne ,** Méthodes d'évaluation du stress oxydatif chez l'homme: importance en matière de prévention , Medisphere, avril **1999**.

- 97. Yasukazu Yoshida , Satoshi Furuta , and Etsuo Niki**, Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron, *Biochimica et Biophysica* **1993** ,81-88 Elsevier.
- 98. Hermann Esterbauer , Janus Gebicki, Herbert Puhl, and Gunther Jirgens**. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL Free Radical Biology & Medicine, Vol. 13, pp. 341-390.
- 99. Gunther Jurgens , Astrid Fell , Gerhard Ledinski , Qi Chen , Fritz Paltauf**. Delay of copper-catalyzed oxidation of low density lipoprotein by in vitro enrichment with choline or ethanolamine plasmalogens. *Chemistry and Physics of Lipids* (1995) 25-31 ,Elsevier.
- 100. Elena Maggi, Roberto Chiesa, Germano Melissano, Renata Castellano, Domenico Astore, Adalberto Grossi, Giorgio Finardi, Giorgio Bellomo** . LDL Oxidation in Patients With Severe Carotid Atherosclerosis A Study of In Vitro and In Vivo Oxidation Markers **1994** American Heart Association, Inc.
- 101. Thorny Chanu Thounaojam, P. Pandaa, P. Mazumdar , Devanand Kumar, G.D. Sharma, L. Sahoo,S.K. Panda** . Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice . *Plant Physiology and Biochemistry* **2012** , Elsevier.
- 102. Gerhard Sandmann and Peter Boger** .Copper-mediated Lipid Peroxidation Processes in Photosynthetic Membranes, *Plant Physiol.* **1980**, 797-800.
- 103. Vincent A. Rifici, Avedis K. Khachadurian** . Effects of dietary vitamin C and E supplementation on the copper mediated oxidation of HDL and on HDL mediated cholesterol efflux, *ELSEVIER Atherosclerosis* **1996**, 19- 26.
- 104. B. Kalyanaraman , William E. Antholine and Sampath Parthasarathy**. Oxidation of low-density lipoprotein by Cu²⁺ and lipoxygenase: an electron spin resonance study, *Biochimica et Biophysica Acta*,**1990**, 286-292 ,Elsevier.
- 105. M. Valko, H. Morris and M.T.D. Cronin. Metals**. Toxicity and Oxidative Stress , *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 1161-1208 .
- 106. Wilfried Sanchez, Olivier Palluel, Laurent Meunier, Marina Coquery, Jean-Marc Porcher ,Selim Ait-Aissa** . Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels , *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2005**, 177–183.
- 107. Janet Y. Uriu-Adams , Carl L. Keen**. Copper, oxidative stress, and human health, *Molecular Aspects of Medicine* **2005**, 268–298, Elsevier.
- 108. Patrick Lacolley, Dominique Babuty, Chantal Boulanger, Bijan Ghaleh, Gervaise Loirand, Florence Pinet, Janelise Samuel** . *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux* , **2008** .
- 109. Jean-Louis Paula, Bruno Baudin** . *Physiopathologie de l'athérosclérose et marqueurs précoces. Marqueurs biochimiques des maladies cardiovasculaires*, Février **2009**, Elsevier et Masson.
- 110. To Quyen Truong** . Thèse présentée comme exigence partielle du doctorat en biologie .Importance de la cavéoline-I , du récepteur scavenger de la classe B , Type 1 et du cluster de différenciation-j6 dans le métabolisme des lipoprotéines natives et oxydées au niveau des cellules hépatiques.
- 111. Shobini Jayaraman, Donald L. Gantz and Olga Gursky**. *Biochemistry* **2007**, 46 (19 pp 5790-5797).
- 112. Stevent T. Kunitack, Michael R. Jarvis, Robert L. Hamilton And John P. Kane**. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: Inhibition of oxidation of low density lipoproteins, Communicated by Richard J. Havel, April 1, **1992**.
- 113. Sampath Parthasarathy, Joellen Barnett and Loren G, Fong** . High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein, *Biochimica et Biophysica Acta***1990**, 275-283, Elsevier.

- 114. Takao Ohta, Kyoko Takata, Seikoh Horiuchi, Yoshimasa Merino and Ichiro Matsuda.** Protective effect of lipoproteins containing apoprotein A-I on Cu²⁺ catalyzed oxidation of human low density lipoprotein Volume 257, 435-438 November **1989**.
- 115. Michael .Mackness, Caroline Abbot, Sharon Arrol and Paul N. Durrington .**The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation, *Biochem. J.* **1993**.
- 116. Jiri Neuzil and Roland Stocker.** Free and Albumin-bound Bilirubin are Efficient Co-antioxidants for α -Tocopherol, Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation, *The journal of Biological Chemistry by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.* **1994**.
- 117. Lisa M. Gaetke , Ching Kuang Chow .**Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology* **2003**, 147_ 163, Elsevier.
- 118. Jun-Jie Yin, Peter P. Fu, Herman Lutterodt, Yu-Ting Zhou, William E. Antholine, and Wayne Wamer.** Dual Role of Selected Antioxidants Found in Dietary Supplements: Crossover between Anti- and Pro-Oxidant Activities in the Presence of Copper, *Journal of Agriculture And Food Chemistry* , **2012**.
- 119. Mark J. Burkitt .** A Critical Overview of the Chemistry of Copper-Dependent Low Density Lipoprotein Oxidation: Roles of Lipid Hydroperoxides, α -Tocopherol, Thiols, and Ceruloplasmin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol. 394, October 1, pp. 117–135, **2001**.
- 120. Peter M. Abuja, Peter Liebmann, Marianne Hayn, Konrad Schauenstein, Hermann Esterbauer .** Antioxidant role of melatonin in lipid peroxidation of human LDL, *Federation of European Biochemical Societies.* **1997**, 289-293.
- 121. Yasukazu Yoshida , Jyunichi Tsuchiya, Etsuo Niki .** Interaction of α -tocopherol with copper and its effect on lipid peroxidation , *Biochimica et Biophysica Acta* **1994**, 85-92, Elsevier.

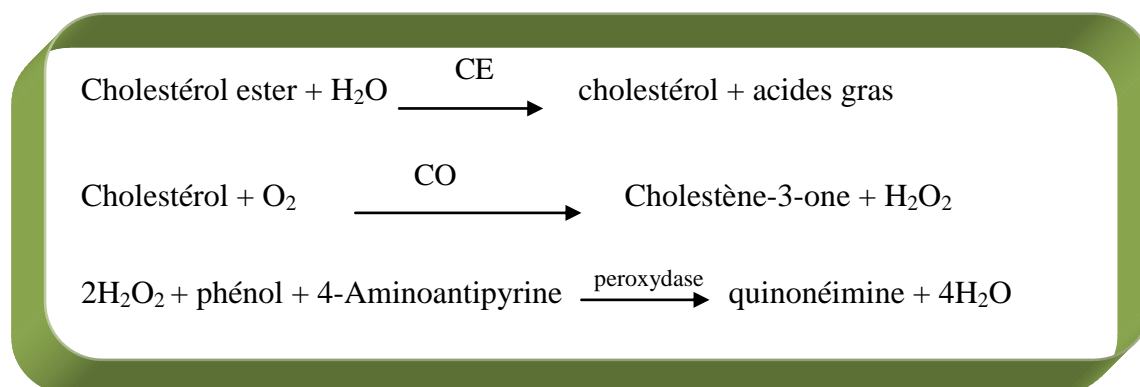
Annexes

Annexe 1 :

Dosage des paramètres biochimiques de control :

➤ Cholesterol total :

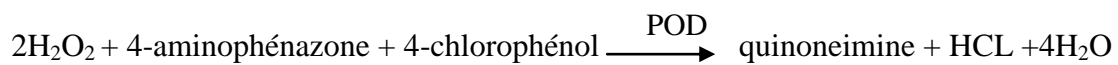
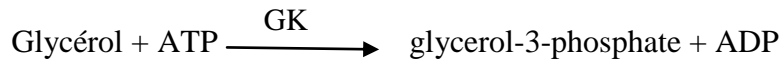
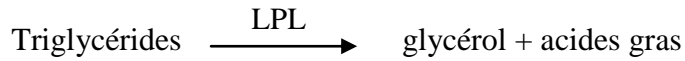
Le dosage du cholestérol total se fait par des méthodes enzymatiques, après dissociation des lipoprotéines. Dans un premier temps, une cholestérol estérase(CE) hydrolyse la liaison ester qui lie le cholestérol et l'acide gras dans les molécules de cholestérol estérifié. Ensuite une cholestérol oxydase (CO) oxyde le cholestérol devenu libre et le cholestérol non estérifié. Cette réaction aboutit à la libération de molécules de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).. L'indicateur quinoneimine est formé par le peroxyde d'hydrogène et la 4-aminoantipyrine en présence de phénol et de peroxydase. La concentration en quinoneimine est directement proportionnelle à la concentration du cholestérol total et est mesurée selon une méthode polychromatique point final (452, 540, 700nm).



➤ Triglycérides :

Le dosage des TG est basé sur des méthodes enzymatiques, Les triglycérides incubés avec la lipoprotéine lipase (LPL) libèrent du glycérol et des acides gras libres, ensuite une glycérol kinase (GK) catalyse la réaction de phosphorylation du glycérol par l'adenosine-5-triphosphate (ATP) en glycérol-3-phosphate, la glycérol-3-phosphate-oxydase (GPO) oxyde la glycérol-3-phosphate en dihydroxyacétone phosphate et libère du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'action catalytique de la peroxydase (POD) à partir du peroxyde d'hydrogène, de l'aminopyrine et du 4-Chlorophenol forme une quinoneimine colorée dont l'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la quantité total du glycérol et ses précurseurs

dans l'échantillon et est mesurée à l'aide d'une technique bichromatique point final (510, 700nm).



➤ Dosage du cholestérol HDL :

Après précipitation des chylomicrons, des LDL et des VLDL par le dextran sulfate, en présence d'ions magnésium, les HDL, contenues dans le surnageant ont été dosées par méthode enzymatique en utilisant le réactif pour le dosage du cholestérol total.

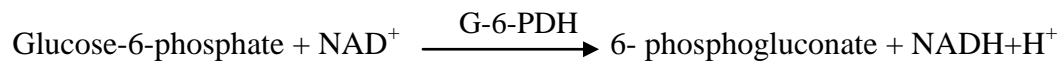
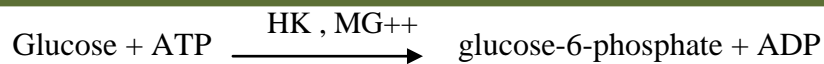
➤ Calcul du cholestérol LDL :

La concentration du cholestérol LDL est obtenue après calcul par la formule de Friedwald :

$$\text{LDL-Chol (mg/dl)} = \text{Cholesterol total (mg/dl)} - [\text{HDL-Chol (mg/dl)} + \text{TG}/5] \text{ (mg/dl)}.$$

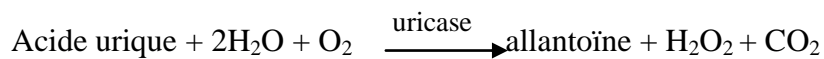
➤ Glycémie :

Il s'agit d'une méthode à l'hexokinase (HK), enzyme qui catalyse la phosphorylation du glucose en présence d'ATP et d'ions magnésium pour former du glucose-6-phosphate et l'adénosine di-phosphate (ADP). La glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH) oxyde le glucose 6-phosphate de façon spécifique pour produire du gluconate 6-phosphate ; NAD^+ est simultanément réduit en NADH. L'augmentation de l'absorbance à 340nm est proportionnelle à la concentration en glucose de l'échantillon.



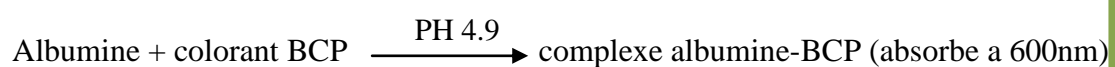
➤ Acide urique :

L'acide urique, qui absorbe la lumière à 293 nm, est converti par l'uricase en allantoïne, qui est non absorbant à 293nm. La variation de l'absorbance à 293nm en raison de la disparition de l'acide urique est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique dans l'échantillon et est mesurée à l'aide d'une technique bichromatique point final (293, 700nm).



➤ Albumine :

La méthode de dosage de l'albumine est une adaptation de la méthode de liaison au colorant pourpre de bromocrésol BCP. En présence d'un agent solubilisant, le BCP se lie à l'albumine au pH 4.9. La quantité du complexe albumine-BCP est directement proportionnelle à la concentration en albumine. Le complexe absorbe à 600 nm et est mesuré à l'aide d'une technique polychromatique point final (600, 540, 700 nm).



➤ Protéines totales :

C'est une méthode au réactif de biuret , L'ion cuivrique réagit avec les liaisons peptidiques des protéines dans une solution basique. Le complexe protéines-cuivre coloré en bleu ainsi formé est proportionnel à la concentration totale de protéines dans l'échantillon et est mesuré à l'aide d'une technique bichromatique point final (540, 700 nm).



Annexe 2 :

Bilan biochimique des 4 donneurs du sang :

	Sérum N°1	Sérum N°2	Sérum N° 3	Sérum N°4	Normes
Cholestérol total (g/l)	1.78	1.69	1.78	1.43	1.3 – 2
Triglycérides(g/l)	0.83	0.43	0.64	0.74	0.4 – 1.5
HDL cholestérol (g/l)	0.5	0.7	0.45	0.4	0.4 – 0.7
LDL cholestérol (g/l)	1.11	0.9	1.09	0.88	0.5 – 1.3
Glycémie (g/l)	0.94	0.95	0.97	0.97	0.7 – 1.1
Albumine (g/l)	42.3	37.1	44		34 – 48
Protéines totales (g/l)	84.4	70.6	73.8	80.5	64 – 82
Acide urique (mg/l)	49	28.2	44		26 – 72

Annexe 3 :

Préparation de la solution de précipitation des LDL :

Les étapes suivies pour préparer un volume de 100ml de la solution de précipitation sont :

- Préparation de la solution citrate trisodique 1 M :

Peser 14.7 g de citrate trisodique à l'aide d'une balance électronique puis l'introduire dans une fiole jaugée de 50 ml contenant environ 20 ml d'eau distillée à l'aide d'un entonnoir , mélanger la solution , ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéiser

- Prélever 6.4 ml de la solution citrate trisodique 1M à l'aide d'une pipette graduée puis l'introduire dans un bécher
- Mesurer à l'aide d'une éprouvette 80 ml d'eau distillée , puis verser dans le bécher contenant la solution de citrate trisodique
- Prélever à l'aide d'une pipette graduée 2 ml d'héparine , puis l'introduire dans le bécher contenant le mélange
- Ajuster le pH de la solution entre 5.04 et 5.12 qui correspond au point isoélectrique des LDL permettant ainsi leur précipitation dans le sérum

Pour la réalisation de cette technique , on utilise un pH mètre constitué de 2 électrodes , l'une standard dont le potentiel est constant et connu (appelé électrode de référence) , l'autre à potentiel variable (appelé électrode de verre). L'appareil est étalonné au moyen de deux solutions tampon à pH 4 et 7 . Le pH de la solution de précipitation est ajusté en ajoutant goutte à goutte une solution pure d'acide chlorhydrique HCl

- Ajouter à la solution de précipitation 2 mg d'azide de sodium afin d'éviter une contamination microbienne
- Verser la solution de précipitation dans une fiole jaugée de 100 ml et ajuster le volume jusqu'au trait de jauge

Préparation de la solution de précipitation des VLDL : -

Les étapes suivies Pour préparer un volume de 100ml de la solution de précipitation sont :

- Préparation d'une solution de chlorure de lithium LiCl 2M :

Peser 4.24 g de chlorure de lithium LiCl à l'aide d'une balance électronique puis l'introduire dans une fiole jaugée de 50 ml contenant environ 20 ml d'eau distillée à l'aide d'un entonnoir , mélanger la solution , ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéisé .

- Prélever à l'aide d'une micropipette 200 μ l de la solution de LiCl puis l'introduire dans une fiole jaugée de 100 ml
- Préparation d'une solution de chlorure de magnésium MgCl₂ 2M :

Peser 4.07 g de chlorure de magnésium MgCl₂ à l'aide d'une balance électronique puis l'introduire dans une éprouvette de 50ml contenant environ 5 ml d'eau distillée à l'aide d'un entonnoir , mélanger la solution , ajuster le volume jusqu'à 10 ml et homogénéisé

- Prélever à l'aide d'une micropipette 3 ml de la solution de chlorure de magnésium MgCl₂ 2M et l'introduire dans la fiole contenant la solution de LiCl
- Ajouter aux 2 solutions 4 ml d'héparine puis ajuster le volume jusqu'au trait de jauge

Préparation de la solution de précipitation des HDL :

Les étapes suivies pour préparer un volume de 5ml de la solution de précipitation sont :

- Dans un flacon stérile , verser 1.25 ml de MgCl₂ 2M
- Ajouter 50 mg de dextran sulfate
- Introduire 3.75 ml d'eau distillée puis ajouter 2.5 mg d'azide de sodium

Préparation de la solution de solubilisation des lipoprotéines :

Les étapes suivies pour préparer un volume de 50 ml de la solution de précipitation sont :

- Préparation de la solution de chlorure de sodium NaCl à 150mmole/l :

Peser 4.38 g de chlorure de sodium NaCl à l'aide d'une balance électronique puis l'introduire dans une fiole jaugée de 500 ml contenant environ 200 ml d'eau distillée à l'aide d'un entonnoir , mélanger la solution , ajuster le volume jusqu'au trait de jauge et homogénéiser

- Mesurer 43.33 ml de la solution de chlorure de sodium NaCl à 150 mmole/l à l'aide d'une éprouvette puis l'introduire dans une fiole jaugée de 50 ml
- Ajouter à l'aide d'une pipette graduée 5.5 ml de la solution de citrate trisodique 1M
 - Ajuster le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge

Annexe 4 :

Précipitation des lipoprotéines :

- précipitation des HDL :

- Prélever à l'aide d'une micropipette 200µl du sérum et l'introduire dans un tube sec
- Ajouter 20 µl du précipitant HDL , puis mélanger a l'aide d'un vortex
- Incuber a température ambiante pendant 15 min
- Centrifuger a 4000 Tr/min pendant 15min
- Récupérer le surnagent contenant les HDL

- Précipitation des LDL :

- Prélever a l'aide d'une micropipette 200µl du sérum et l'introduire dans un tube sec
- Ajouter 2 ml du précipitant des LDL , puis mélanger a l'aide d'un vortex
- Incuber a température ambiante pendant 15 min
- Centrifuger a 4000 Tr/min pendant 15min
- Séparer le surnageant du culot contenant les LDL
- Solubiliser le culot par 200µl de la solution de solubilisation

- Précipitation des VLDL :

- Prélever 1 ml du surnageant obtenu après précipitation des LDL et l'introduire dans un tube sec
- Ajouter 1ml du précipitant des VLDL, puis mélanger a l'aide d'un vortex

- Incuber a température ambiante pendant 15 min
- Centrifuger a 4000 Tr/min pendant 15min
- Séparer le surnageant du culot contenant les VLDL
- Solubiliser le culot par 200µl de la solution de solubilisation

Résumé : Radicaux libres, stress oxydant, espèces réactives d'oxygène, antioxydants sont devenus des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé .Un intérêt sans cesse croissant est porté à l'étude des lipides véhiculés par les différentes lipoprotéines plasmatique exposé en permanence au stress oxydant qui est la cause d'apparition de diverses pathologies. tout ceci à requis et requiert encore la mise au point de méthodes et d'outils performants permettant d'évaluer, le plus correctement possible, le statut de stress oxydant chez un individu. L'objectif principal de cette étude est d'induire une oxydation in vitro qui reflète le stress oxydant et d'évaluer l'effet de cette oxydation sur les lipoprotéines plasmatiques par électrophorèse sur acétate de cellulose puis d'étudier l'effet de la vitamine C et E sur ces lipoprotéines oxydées, en mesurant les vitesses de migration des lipoprotéines normales et oxydées. Les résultats ont montrés une augmentation de la vitesse de migration à la fois en présence d'oxydant et d'antioxydants. Ce qui nous pousse à conclure que la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose nous à permis d'évaluer l'impact de l'oxydation in vitro sur les lipoprotéines plasmatiques ce qui n'est pas le cas concernant l'effet antioxydant de la vitamine C et E. L'ensemble de ces recherches combinées à d'autres pourrait nous permettre d'introduire la technique d'électrophorèse sur acétate de cellulose comme outils d'analyse qui peut aider à diagnostiquer un état de stress oxydatif précoce et aussi comme un index thérapeutique dans le suivi de l'évolution des maladies liées au stress oxydant. **Mots clés :** lipoprotéines, électrophorèse, peroxydation lipidique, stress oxydant.

ملخص : أصبحت الجذور الحرة، الإجهاد التأكسدي، أنواع الاكسجين التفاعلية، ومضادات الأوكسدة مألوفة بشكل متزايد لدى العاملين في مجال الصحة. و يوجد إهتمام مستمر لدراسة الدهون المنقولة بواسطة مختلف البروتينات الدهنية المتواجدة في البلازما و المتعرضة بشكل دائم للأوكسدة التي هي السبب في حدوث العديد من الأمراض وقد تطلب هذا ولا يزال يتطلب تطوير أساليب وأدوات فعالة لتقييم وبأكبر قدر ممكن وضع الإجهاد التأكسدي لدى الفرد. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو خلق أكسدة في المختبر تعكس حالة مرضية في جسم المريض التي هي الإجهاد التأكسدي و تقييم تأثير هذه الأوكسدة على البروتينات الدهنية في البلازما من قبل تقنية كهترتهجير على خلايا السليلوز ومن ثم دراسة تأثير فيتامين س و ه على هذه البروتينات الدهنية المؤكسدة، عن طريق قياس سرعات هجرة البروتينات الدهنية العادية و المؤكسدة. أظهرت النتائج زيادة في معدل الهجرة سواء في وجود أكسدة أو مضادات الأوكسدة مما يدفعنا للاستنتاج بأن تقنية خلايا السليلوز الكهربائي سمح لنا بتقييم تأثير أكسدة البروتينات الدهنية الموجودة في البلازما في المختبر لكن هذا لم يكن الحال بالنسبة لتأثير مضادات الأوكسدة من فيتامين س و ه جنباً إلى جنب مع دراسات أخرى، يمكن أن نقدم تقنية كهترتهجير على خلايا السليلوز كأداة تحليلية التي يمكن أن تساعد على تشخيص الإجهاد التأكسدي في وقت مبكر وأيضاً بمثابة مؤشر علاج في رصد تطور الأمراض المتعلقة بالإجهاد التأكسدي. **كلمات البحث:** البروتينات الدهنية، كهترتهجير، بيروكسيد الليبيد، الإجهاد التأكسدي.

Abstract: Free radicals, oxidative stress, reactive oxygen species, antioxidants have become increasingly familiar terms for health professionals. There is an increasing interest in the study of the lipids carried by the different plasma lipoproteins, which is constantly exposed to oxidative stress, that is the cause of various pathologies. All this has required and still requires the development of effective methods and tools to evaluate, as accurately as possible, the status of oxidative stress of each individual. The main objective of this study is to create an in vitro oxidation that reflects an oxidative stress and to evaluate the effect of this oxidation on plasma lipoproteins by cellulose acetate electrophoresis and then to study the effect of vitamin C and E on these oxidized lipoproteins, by measuring the migration rates of normal and oxidized lipoproteins. The results showed an increase in the migration rate both in the presence of oxidant and antioxidants. This leads us to conclude that the electrophoresis technique on cellulose acetate allowed us to evaluate the impact of oxidation in vitro on plasma lipoproteins, which is not the case with the antioxidant effect of Vitamin C and E. Combined with other studies, we could introduce the cellulose acetate electrophoresis technique as an analytical tool that can help to diagnose an early oxidative stress and also as a therapeutic index in the monitoring of the evolution of diseases related to oxidative stress.

Keywords: lipoproteins, electrophoresis, lipids peroxidation, oxidative stress.

